

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS PROGRAMMA

Lunasīna un proteīnu līmeņu korelācija tritikālē

MAĢISTRA DARBS

Autors: Kaspars Antonovičs

Stud. apl. Nr. **Ka09014**

Darba vadītāja: **Dr.habil.biol., prof. Ruta Muceniece**

Rīga 2014

ANOTĀCIJA

Lunasīns ir 43 aminoskābju ķēdes peptīds, kuru sākotnēji atklāja sojas pupās, bet vēlāk arī kviešos, rudzos, tritikālē un miežos. Lunasīnu ekstrahē no miltiem ar nātrija fosfātu buferētu nātrija hlorīda šķīdumu, kurā šķīst arī ūdenī šķīstošie proteīni.

Pētījuma mērķis bija noskaidrot, vai lunasīna saturs korelē ar proteīnu saturu tritikāles graudos. Atrasts, ka visi tritikāles genotipi satur vidēji ap 12% mitruma. Ar Kjeldāla metodi noteiktais kopproteīna daudzums sešu tritikāles genotipu graudos vidēji ir no 11,4 līdz 16,8%. Vislielākais tas ir genotipam 0006-31, kas satur vismazāk lunasīna peptīda. Ar WST-8 metodi izmērītais ūdenī šķīstošo proteīnu daudzums vidēji ir 30-50% no kopproteīna daudzuma, kas noteikts ar Kjeldāla metodi. Ir augsta korelācija starp kopproteīna un ūdenī šķīstošo proteīnu daudzumiem, bet netika atrasta korelācija starp kopproteīna daudzumu tritikāles graudos, ūdenī šķīstošo proteīnu frakcijas daudzumu un lunasīna saturu.

Atslēgas vārdi: lunasīns, proteīni, tritikāle

SUMMARY

Lunasin a 43 amino acid chain long peptide originally was found in soy beans but later in wheat, rye and barley. Lunasin is extracted from flour with sodium phosphate buffered sodium chloride solution containing also other water soluble proteins.

The aim of the study was to determine whether the content of lunasin correlates with the content of protein detected in triticale grain. It has been found that all genotypes of triticale contain around 12% of moisture. The Kjeldahl method shows that the crude protein content in grains of six triticale genotypes is approximately 11.4 to 16.8%.

The genotype 0006-31 contains the biggest protein content but the smallest content of the lunasin. Measured by WST-8 method amount of water-soluble proteins in average was 30-50% of that of the crude protein determined by the Kjeldahl method. We found a high correlation between the levels of total protein and soluble protein. No correlation was found between the crude protein, water-soluble protein fraction in triticale grains and the amount of the lunasin.

Key words: lunasin, proteins, triticale

SATURS

ANOTĀCIJA	2
SUMMARY	3
SATURS	4
IEVADS	5
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	7
1.1. PĀRTIKAS AUGU GALVENĀS UZTURVIELAS	7
1.2. GRAUDU BIOĶĪMISKAIS SASTĀVS	8
1.3. SOJAS PROTEĪNI	11
1.4. LUNASĪNA ATKLĀŠANA UN IZPLATĪBA	11
1.5. LUNASĪNA PRETVĒŽA EFEKTI	13
1.6. LUNASĪNA PRETIEKAISUMA DARBĪBA	15
1.7. LUNASĪNA IEDARBĪBA UZ SIRDS-ASINSVADU SISTĒMU	16
1.8. LUNASĪNA CNS EFEKTI	16
1.9. PROTEĪNU KONCENTRĀCIJAS NOTEIKŠANAS METOŽU RAKSTUROJUMS.....	17
1.9.1. Kjeldāla (Kjeldahl) metode	17
1.9.2. UV spektroskopijas metodes.....	19
1.9.3. Izgulsnēšanas metodes.....	20
1.9.4. Standartlīknes iegūšanai izmantotie proteīni	20
1.9.5. Proteīnu noteikšanas metožu salīdzinājums	20
2. METODES UN MATERIĀLI.....	22
2.1. MATERIĀLI	22
2.2. MITRUMA % NOTEIKŠANA MILTOS	22
2.3. GRAUDU EKSTRAKTU SAGATAVOŠANA PEPTĪDA LUNASĪNA IZDALĪŠANAI	23
2.4. TOTĀLĀ PROTEĪNA DAUDZUMA NOTEIKŠANA AR WST-8 METODI	23
2.5. PROTEĪNU DAUDZUMA NOTEIKŠANA AR KJELDĀLA METODI.....	26
2.6. DATU ANALĪZE.....	27
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	28
3.1. MITRUMA DAUDZUMS TRITIKĀLES MILTOS	28
3.2. LUNASĪNA UN TOTĀLĀ PROTEĪNA SATURS PĒC KJELDĀLA METODES TRITIKĀLES GENOTIPOS.....	29
3.3. LUNASĪNA UN TOTĀLĀ PROTEĪNA SATURS PĒC WST-8 METODES TRITIKĀLES GENOTIPOS ...	30
4. SECINĀJUMI.....	37
5. PATEICĪBAS.....	38
6. LITERATŪRAS SARAKSTS	39
7. Dokumentārā lapa.....	45

IEVADS

Graudaugu selekcionāri cenšas radīt šķirnes, kas nodrošina cilvēkus un dzīvniekus ar kvalitatīvu barību. Tomēr pārtikas augi satur ne tikai pamatbarības vielas – proteīnus, lipīdus, ogļhidrātus, bet daudzas bioloģiski aktīvas vielas kādā no pamatvielu frakcijām. Tās var atrast lipīdu, ogļhidrātu vai proteīnu frakcijās. Augos atrodamas vairākas bioaktīvas vielas, kas ir nozīmīgas ne tikai augiem dažādos auga augšanas posmos, bet arī dzīvnieku un cilvēku organismiem, piemēram, bioaktīvās vielas uzrādītie farmakoloģiskie efekti (pretiekaisuma aktivitāte, pretdrudža aktivitāte, pretvēža aktivitāte un citi efekti) ir nozīmīgi cilvēka veselībai.

Lunasīns ir 43 aminoskābju garš peptīds, ko 1996.g. nejauši atklāja sojas pupās Alfredo Galvezs Dr. de Lumen's UC Berkeley laboratorijā, mēģinot uzlabot sojas proteīna īpašības. Sojas pupās atklātas vairākas fitoķīmiskas vielas, kurām piemīt bioloģiska aktivitāte. Sojas proteīna koncentrāts, izolāts un hidrolizāts attiecīgi satur 2,81 + / - 0,30 , 3,75 + / - 0,43 un 4,43 + / - 0,59 lunasīna/100 g miltu, bet sojas milti un sojas pārslas satur 1,24 + / - 0,22 g lunasīna / 100 g miltu. Ar izoflavoniem bagātināti sojas produkti satur ļoti maz vai nemaz lunasīna. Šādas lunasīna koncentrācijas svārstības sojas (*Glycine max, L.*) sugās liecina, ka bioaktīvo peptīdu līmeni var ģenētiski modificēt. Turklāt sojas proteīnu izolāti un hidrolizāti satur lunasīnu augstākās koncentrācijās (de Meija 2004).

Iepriekš izstrādātajā autora bakalaura darbā tika izmērīts lunasīna saturs vairākos tritikāles genotipos, bet palika nenoskaidrots jautājums, vai lunasīna saturs ir atkarīgs no proteīnu daudzuma graudos, kā arī, vai tritikāles genotipiem ir atšķirīgs proteīnu saturs.

Darba mērķis: noskaidrot, vai lunasīna saturs graudos ir atkarīgs no proteīnu daudzuma tajos.

Darba uzdevumi:

- Izmērīt totālā proteīna koncentrāciju tritikāles sešu genotipu graudu ekstraktos, kuros ir atrasts un izmērīts lunasīna daudzums.

- Izmērīt mitruma saturu tritikāles miltos.
- Salīdzināt proteīnu daudzuma tritikālē mērījumus, mērot proteīnu saturu ar divām metodēm - Kjeldāla metodi un WST-8 metodi.
- Salīdzināt proteīnu daudzumu dažādos tritikāles genotipos.
- Analizēt korelāciju starp lunasīna un proteīnu saturu tritikāles genotipos.

Lunasīna noteikšanas metode izstrādāta un lunasīna satura pētījumi dažādos graudaugu genotipos veikti Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē sadarbībā ar Ķīmijas fakultātes Hromatogrāfijas laboratorijas pētnieci Dr. ķīm. Ilvu Nakurti.

Proteīnu koncentrācija noteikta Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē.

Tritikāles graudi un milti saņemti no Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūta pētniekiem.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Pārtikas augu galvenās uzturvielas

Cilvēka uzturam un īpaši augu valsts diētai ir svarīga loma diabēta, dažādu audzēju, sirds un asinsvadu slimību profilaksē. Šīs slimības Latvijā ir ļoti izplatītas, iespējams, ka mēs nesekojam līdzi savam uzturam, tas nav daudzveidīgs un varētu teikt, ka mēs ēdam neveselīgi. Nākas atzīt, ka Āzijas valstīs, kas uzturā vairāk lieto rīsus un citus graudaugu produktus, saslimšana ar vēzi ir daudz retāka, salīdzinot ar Eiropas un Amerikas rādītājiem. Latvijas Centrālās statistikas pārvaldes dati nav iepriecinoši, jo Latvijā vidējais maizes un to izstrādājumu patēriņš pa gadiem uz vienu cilvēku turpina samazināties. Pēc zinātnieku aprēķiniem cilvēkam dienā būtu jāapēd vismaz 170g pilngraudu produktu. Latvijā cilvēks vidēji patērē vien ap 70% no vēlamā daudzuma, pie tam lielākā daļa šo produktu ir „balto” miltu izstrādājumi. Iespējams, ka Latvijas iedzīvotājiem trūkst zināšanu par graudu uzturvērtību un to nozīmi slimību profilaksē, kas mudinātu cilvēkus izvēlēties tieši pilngraudu produktus. Latvijas iedzīvotājiem, kā pasaulē pazīstamiem graudu audzētājiem un eksportētājiem, būtu svarīgi novērtēt pašu izaudzētā produkta vērtību un rūpēties par savu un savas ģimenes veselību maksimāli izmantot visu labo, ko graudu produkti var mums dot. Graudu izmantošanas iespējas ir atkarīgas no daudziem bioķīmiskiem rādītājiem, bet labības sugas robežās šie rādītāji var variēt, atkarībā no šķirnes un audzēšanas apstākļiem (Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūts, Andreoli and Tellarini 2000; Horrigan et. al. 2002).

Latvijā, tāpat kā citur pasaulē, graudaugu selekcijas programmās galvenā vērtība tiek pievērsta saimnieciski un tehnoloģiski nozīmīgām pazīmēm, bet ļoti maz ir pētījumu, kuros graudu kvalitāte vērtēta arī pēc bioloģiski aktīvo vielu daudzuma tajos (Bleidere et. al. 2012).

Pilngraudu raksturojums. Ar vārdu pilngraudu saprot graudu, kāds tas ir iegūts no tīruma. Pilngraudu realizācijas termiņš ir daži mēneši, jo grauda dīglis ir bagāts ar bioloģiski aktīvām vielām, kas padara miltu vidi skābu un rada apstākļus baktēriju un mikroskopisko sēņu attīstībai (Berga un Zute 2013). Šāds realizācijas termiņš nav izdevīgs ražotājiem, tāpēc veikalos pieejamie milti un to produkti tiek ražoti tikai no tām graudu daļām, kas maksimāli ilgi uzglabājas. Balto miltu ražošanas procesā no graudiem tiek atdalīts ārējais apvalks un

daļa dīgļa. Zem grauda ārējā aizsargājošā apvalka - plēksnes- atrodas četri līdz pieci grauda apvalka slāņi, piemēram, ārējais un iekšējais slānis un aleironu slānis, kurš pārstrādes procesā veido kliju daļu. Ārējais graudu apvalks aizsargā graudu no vides ūdens, mikroorganismu un kaitēkļu nelabvēlīgās ietekmes. Zem vairākām graudu kārtām grauda kodolā atrodas endosperma, kurā uzkrājas galvenās barības rezerves, piemēram, ciete, kas ir galvenais enerģijas avots, graudiem dīgstot, pārējo endospermas daļu veido proteīni, šūnu sienīņu polimēri, vitamīni, minerālvielas un šķiedrvielas. Graudu dīglis veido salīdzinoši nelielu daļu no grauda masas. Attīstītajās valstīs no grauda dīgļiem ražo produktus zīdaiņu uzturam (Bankina u.c., 2012; Magkos et.al., 2003).

1.2. Graudu bioķīmiskais sastāvs

Grauda bioķīmisko struktūru veido ogļhidrāti, olbaltumvielas jeb proteīni, tauki jeb lipīdi, mikroelementi, vitamīni, ūdens un šķiedrvielas. Graudā visvairāk ir ciete (ap 50-70%), proteīns (ap 8-30%), tauki (3-10%), šķīstošās un nešķīstošās šķiedrvielas (5-15%) (Stendes selekcijas stacija).

Grauda bioķīmiskais sastāvs dažādām sugām ir būtiski atšķirīgs. Bet tas salīdzinoši daudz var variēt arī starp vienas sugas šķirnēm. To ietekmē gan šķirņu ģenētiski noteiktās īpašības, gan audzēšanas apstākļi. Visvērtīgākās vielas ir bioloģiski aktīvās vielas – minerālvielas, vitamīni un citi bioķīmiski savienojumi. Tiem ir liela nozīme ne tikai grauda dzīvības procesu uzturēšanā, bet arī cilvēku veselības uzlabošanā. Piemēram, B grupas vitamīniem ir būtiska nozīme vielmaiņas procesā, jo tie veicina enerģijas atbrīvošanu, kuru iegūstama no olbaltumvielām, taukvielām un ogļhidrātiem. B grupas vitamīni stabilizē nervu sistēmas darbību. B grupas vitamīni svarīgi daudzos dzīvībai svarīgos organisma procesos (Capozzi et.al. 2012; Zhang et al., 2012).

Grauda bioķīmiskais sastāvs tā atsevišķās daļās ir dažāds, lielākā daļā vitamīnu un minerālvielu atrodas dīglī un grauda apvalkos. Piemēram, kviešu graudā procentuāli visvairāk B grupas vitamīnu un minerālvielu atrodas dīglī un aleirona slānī. Tā kā miltu gatavošanas procesā apvalki un dīglis tiek atdalīti, minerālvielu un vitamīnu gala produktā ir

ievērojami mazāk nekā veselā graudā. Pilngraudi ir bagāti ar fermentējamiem (sagremojamiem) ogļhidrātiem, šķiedrvielām, cieti un oligosaharīdiem. Salīdzinot dažādu graudu (auzu, rudzu, miežu) šķiedrvielu saturu, apmēram vienu trešdaļu veido šķīstošās šķiedrvielas, atlikušo daļu nešķīstošās šķiedrvielas. Atdalot grauda apvalku, tiek atdalīts vairums nešķīstošo šķiedrvielu, ievērojami samazinot, diētisko šķiedrvielu kopējo apjomu. Bet šķiedrvielas ir vajadzīgas cilvēka organisma veiksmīgai funkcionēšanai, jo tās veicina gremošanas trakta darbību, uzlabo vielmaiņu, līdzsvaro zarnu mikrofloru, novērš aptaukošanos. Cilvēka uzturā liela loma ir uzņemtajiem taukiem - taukskābju veidam un daudzumam. Piemēram, piesātināto taukskābju uzņemšana veicināta „sliktā” holesterīna līmeņa pieaugums asinīs. Ja uzturā saņemam pārsvarā nepiesātinātās taukskābes – efekts ir pretējs. Tāpēc dietologi uzsver nepiesātinātās taukskābes kā svarīgu uztura sastāvdaļu. Kopējais tauku daudzums graudos ir 3 – 10%, no tiem aptuveni 75% graudu lipīdu (tauku) ir nepiesātināti, ko vienādās daļās veido oleīnskābe un linolskābe un 1-2% linolēnskābes. Vēl viens bieži lietots termins uztura mācībā ir antioksidanti. Antioksidanti ir vitamīni, minerālvielas un proteīni, kas spēj paātrināt ķīmiskas reakcijas dzīvajos organismos un aizsargāt pret brīvo radikāļu izraisītajiem šūnu bojājumiem. Antioksidanti stiprina organisma imūnsistēmu, kā arī, pēc zinātnieku domām, palēnina novecošanās procesu. Pētījumi parāda, ka antioksidanti spēj samazināt risku saslimt ar vēzi, kas ir saistīts ar organisma šūnu bojāeju. Graudaugi ir dabīgs antioksidantu avots. Pilngraudu produktos ir salīdzinoši augstāka antioksidantu aktivitāte. Maizes gatavošanas procesā graudu produktu antioksidatīvās īpašības palielinās (Bleidere et. al. 2012; Bleidere et.al. 2012a; Magkos et. al., 2006)

Graudi ir dabīgs E vitamīna avots cilvēkam. E vitamīns ir antioksidants, kas veselos graudos ir 3-9 mg gramā sausas. Tas ir antioksidants, kas cilvēka organismā spēj darboties šūnu līmenī, aizsargājot to apvalkus no brīvo radikāļu ietekmes, kā arī kontrolē selēna daudzumu organismā. Graudos sastopami arī lignāni - augu ķīmiskās struktūras - fitoestrogēni, kas ir auga hormons ar antioksidantu īpašībām. Lignānu nav iespējams noteikt „attīrītos” graudos, jo tas koncentrējas galvenokārt tikai grauda ārējā pavalkā. Visvairāk lignāni sastopami pilngraudu kviešu, auzu un rudzu miltos. Arī ķirbju, linu, ķimeņu un saulespuķu sēklas satur lignānu. Pilngraudu maize ir labākais veids, lai saņemtu lignānus uzturā, jo tiem ir liela loma

vēža, osteoporozes, sirds un asinsvadu slimību risku un to simptomu mazināšanā (Grauda et.al, 2012; Bourn and Prescott 2002).

Fitosteroli, saukti arī kā augu steroli, ir specifiski ķīmiski savienojumi augos, līdzīgi pārtikas holesterīnam, tikai tie neabsorbējas cilvēka organismā, bet spēj regulēt cilvēka organismā esošā holesterīna daudzumu. Visvairāk fitosterolu sastopami tieši diedzētos graudos. Graudi satur daudz minerālvielu, kas, nonākot cilvēka organismā, arī darbojas kā antioksidanti. Piemēram, selēns ir svarīgs mikroelements cilvēka organismam. Selēna nepietiekamība ir saistīta ar samazināto imūno šūnu skaitu un paātrinātu infekcijas slimības progresēšanu, tas palīdz aizsargāt šūnas pret brīvajiem radikāļiem, tāpēc potenciāli palēnina slimību attīstību. Selēna daudzums pārtikās produktā ir proporcionāls selēna daudzumam augsnē, kurā grauds audzēts. Fosfora saturs ir augstāks 3 - 5 g/kg sausnas. Fosfors graudos daļēji ir pārstāvēts vienkāršu neorganisku savienojumu veidā, bet lielākā tā daļa atrodas organisku kompleksu – fitātu, veidā (Legzdiņa et. al. 2008; Kristofersen and Zariņa 2002).

Daudzas bioloģiski aktīvās vielas ir kopīgas vairākiem augu pārtikas produktiem, piemēram, fitāti (antioksidants – viens no galvenajām fosfora uzkrāšanās formām augos, īpaši kviešos, tiek sagremots tikai atgremotāju kuņģī) vai fenola rindas savienojumi, bet dažas ir unikālas tieši graudu produktiem kā auzām fitoaleksīni, kas ir uzskatāmi par augu valsts antibiotiku. Tā atbild par augstu antioksidantu aktivitāti pilngraudu produktos. Augu antibiotikas, kas atrodas graudu sastāvā, pieder arī pie gremošanas fermentu (proteāžu un amilāžu) aktivitātes samazinātājiem jeb inhibitoriem. Ir pierādīts, ka proteāzes inhibitori samazina risku saslimt ar resnās zarnas un krūts vēzi. Amilāzes inhibitori samazina glikozes līmeni plazmā, kā arī insulīna un holesterīna līmeni. Visbiežāk par diētiski augstvērtīgiem graudiem tiek uzskatīti auzas, rudzi, speltas (plēkšņu) kvieši, kas satur visvairāk bioloģiski aktīvo vielu. Šiem graudiem piemīt augsta diētiska vērtība. Tieši salīdzinoši augstā bioloģiski aktīvo vielu koncentrācija ļauj tos rekomendēt uzturā, lai profilaktiski palīdzētu cīnīties ar vēzi un vīrusu izraisītām infekcijām, novērstu sirds un asinsvadu slimību riskus un samazinātu holesterīna līmeni asinīs, labvēlīgi ietekmētu ķermeņa svaru. Zinātniski, turpinot pētījumus ar graudaugiem, atklāj ar vien jaunus, cilvēkam nozīmīgus savienojumus tajos. To daudzums bieži vien šķiet niecīgs, bet ietekme uz dzīvībai svarīgiem procesiem – nenovērtējama. Lai arī mūsdienu tehnoloģijas ļauj cilvēkam sintezēt jebkuru zināmo, dabā sastopamo ķīmisko

savienojumu, tās vielas un savienojumi, ko cilvēks uzņem no dabas radītiem produktiem, vienmēr būs cilvēka organismam atpazīstamākie, piemērotākie un ilgtermiņā – efektīvākie (Belicka and Legzdiņa 2002; Grauda et.al. 2012) .

1.3. Sojas proteīni

Sojas proteīni ir izolēti no sojas pupām. No sojas gatavo 3 veidu proteīnproduktus: sojas miltus, sojas koncentrātu un izolātu. Tie atšķiras ar proteīnu saturu un iegūšanas veidu. Sojas proteīnu koncentrāts ir izgatavots no sojas miltiem, kas attīrīti no taukiem. Tajā ir saglabātas šķiedrvielas un to tirgo kā miltus, granulas un izžāvētu izsmidzinātu materiālu. Koncentrāts satur ap 50% proteīnu. Sojas proteīna izolāts pārtikā ir izmantots kopš 1959. gada savu funkcionālo īpašību dēļ. Sojas proteīnu izolāts ir ļoti attīrīts pulveris ar 90% proteīnu, rēķinot uz sausni. Sojas hidrolizāts ir enzimatiski attīrīts, ūdenī šķīstošs proteīnu komplekss, kuru pēc sterilizēšanas izmanto kā mikroorganismu barotni zinātniskos pētījumos. Nesterilu pulveri izmanto kā cāļu, teļu un citu dzīvnieku barības sastāvdaļu.

Sojas proteīni sastāv no uzglabāšanas proteīnu frakcijām 2S, 7S, 11S un 15S. 2S frakcija ir vispopulārākā, jo ir vismazāk alerģiska un satur arī proteāžu inhibitorus, piemēram, Bowman-Birk un Kunitz ģimenes proteīnus. Nesen sojas proteīna 2S popularitāte ir vēl pieaugusi, jo tajā atklāja jaunu bioloģiski aktīvu peptīdu lunasīnu. Tātad lunasīns ir jaunatklāts sojas proteīnu ingredients. Pie proteīnu frakcijas pieder arī globulīnu ģimene ar proteīniem legumīnu, vicilīnu, glicinīnus un beta-konglicinīnu. Sojas pupas satur arī citus bioloģiski aktīvus funkcionālos proteīnus, piemēram, tripsīna inhibitorus, hemaglutinīnu, cisteīna proteāzes, kas ir ļoti līdzīgas papānam, un fitoestrogēnus, kas organismā saistās ar estrogēnu receptoriem (Scott et al., 1992).

1.4. Lunasīna atklāšana un izplatība

Lunasīns ir 43 aminoskābju garš peptīds, ko 1996.g. nejauši atklāja sojas pupās Alfredo Galvezs *Dr. de Lumen's UC Berkeley* laboratorijā, mēģinot uzlabot sojas proteīna īpašības. Lunasīnu atklāja, izmēģinot šūnu transfekciju ar dažādu sojas proteīnu un peptīdu

gēniem. Izrādījās, ka lunasīna gēna ekspresija izraisa mitozes bloķēšanu un šūnu nāvi. Lunasīna formula ir S K W Q H Q Q D S C R K Q K Q G V N L T P C -EKHIMEKIQG-RGD-DDDDDDDD, kura C-gala struktūra atgādina hromatīna-saistošo proteīnu stabili saglabāto rajonu (de Lumen, 2005; de Meija et al. 2004; Jeong et al. 2009).

Pavisam nesen lunasīnu atklāja arī miežu, kviešu un rudzu graudos. Drīz pēc tam sekoja jauni pētījumi un lunasīns tika atklāts tritikālē un auzās (Nakurte et al. 2012; Nakurte et al. 2013). Lunasīns tika atrasts, izmantojot LC-MS/MS analīzes metodi. Hromatogrammas un masas spektri tika iegūti no pieciem auzu genotipiem un salīdzināti ar sintētisko lunasīna peptīdu. Tika mērīts lunasīna daudzums divu gadu ražas graudos un konstatēts, ka visi auzu genotipi saturēja lunasīnu. Tomēr tika novērots, ka lunasīna daudzums starp genotipiem atšķīrās. Vidēji agrā auzu šķirne Ivory saturēja vislielāko lunasīna daudzumu $0,197 \pm 0,01$ mg/g graudu 2010.gadā un $0,195 \pm 0,009$ mg /g graudu 2011. gadā. Pētījumā iekļautajos auzu genotipos tika mērīts proteīnu, β -glikānu, tauku, cietes un mitruma daudzums graudos. Tomēr netika atrasta korelācija starp lunasīna daudzumu un β - glikānu vai proteīnu saturu. No auzām izolētais lunasīns uzrādīja tādas pašas antioksidatīvas īpašības kā sintētiskais lunasīns. Lunasīna atklājums auzās papildina auzu bioaktīvo vielu sarakstu un atbalsta ieteikumus lietot auzu produktus uzturā (Nakurte et al., 2013).

Reizē ar ziņojumu par lunasīna atklāšanu tritikālē Latvijas pētnieki (Nakurte et al. 2012) parādīja, ka arī Ziemeļeiropā audzētos ziemas rudzu un kviešu genotipos atrodas lunasīns. Šie dati ir jaunums, jo iepriekš publicētie dati par lunasīna saturu labībā tika iegūti no Korejā audzētiem genotipiem. Lunasīna saturs graudos tika noteikts ar LC-MS/MS metodi. Pētnieki secināja, ka tritikāle ir ar peptīdu lunasīnu visbagātākais graudaugs. Tās genotipi uzrādīja dažādu lunasīna saturu: genotips 0002-26 > Dinaro > DSGU 10/94 > 0213-22 > 0317-14 > 0006-31. Lielākais lunasīna saturs bija tritikāles genotipam 0002-26 un tas bija 6,46 mg/g graudu. Salīdzinājumam augstākais lunasīna saturs rudzu šķirnē Dankovske Diament bija 1,5 mg/g un visaugstākais lunasīna saturs ziemas kviešu šķirnē Fredis bija tikai 0,23 mg/g. Tika secināts, ka tritikāli varētu izmantot kā nozīmīgu komponentu funkcionālajā pārtikā un ir vērts pētīt kā palielināt tritikāles produktu izmantošanu cilvēku un dzīvnieku uzturā (Nakurte et al. 2012).

1.5. Lunasīna pretvēža efekti

Sojas pupās atklātas vairākas fitoķīmiskas vielas, kurām piemīt pretvēža aktivitāte. Starp tām izoflavoni, proteāžu inhibitori un vēlāk atklātais lunasīns. Lunasīns ir jauns un inovatīvs pretvēža peptīds, kas oriģinālā veidā iegūts no sojas. Dažādās sojas, miežu, kviešu un rudzu šķirnēs atšķiras lunasīna daudzums līdz ar to agronomiem un augu ģenētiķiem ir iespējams selekcijas darbs, izveidojot tādas šķirnes, kurās ir maksimāli daudz lunasīna (Galvez et al., 2001). Lunasīnam pierādīja pretvēža darbību *in vitro* vēža šūnu kultūrās citotoksicitātes testā un profilaktisko darbību ķīmisko karcinogēnu izraisīto zīdītāju šūnu transformāciju modelī, kā arī pret melanomas aktivitāti *in vivo* peļu modelī (Jeong et al. 2003). Peptīda profilaktisko darbību novēroja ķīmisko karcinogēnu izraisīto zīdītāju šūnu transformāciju modelī, kā arī pret melanomas aktivitāti *in vivo* ādas vēža peļu modelī (Hernández-Ledesma et al., 2011). Peļu modelī lunasīnu aplikāciju veidā uzlika uz ādas dažādās devās. Novēroja, ka lunasīns 250 µg/nedēļā samazināja ķīmisko karcinogēnu ādas vēža izraisīšanu par 70%. Lunasīna profilaktiskie efekti izpaudās arī par divām nedēļām attālinot papilomas rašanos kairinājuma vietā. Šūnu proliferācijas testā lunasīns palēnināja epidermas šūnu dalīšanos eksperimenta un kontroles peļu ādā (Hernández-Ledesma et al., 2009).

Pelēm, žurkām un cilvēkiem ir pierādīta orālā lunasīna biopieejamība. Lunasīns internalizējas šūnās dažu minūšu laikā, bet kodolā lokalizējas apmēram 18 stundu laikā. Šūnas kodolā lunasīns inhibē histonu acetilēšanos un, sabojājot histonu acetilēšanās/deacetilēšanās dinamiku, izraisa šūnu apoptozi. Uz šo defektu vispirms reaģē ātri augošas šūnas, kādas ir vēža šūnas. Lunasīnam pierādīta pretvēža darbību *in vitro* vēža šūnu kultūrās citotoksicitātes testā. Šūnas kodolā lunasīns inhibē histonu acetilēšanos un, sabojājot histonu acetilēšanās/deacetilēšanās dinamiku, izraisa šūnu apoptozi. Ap 35% ar tritiju iezīmētais lunasīns dzīvniekos tiek absorbēts un izplatās daudzos audos pēc 6 stundām pēc perorālas uzņemšanas. Asinīs un aknās nonākušais lunasīns nav metabolizējies un no aknām vai asinīm izolēts ir bioloģiski aktīvs *in vitro* testos. Lunasīns ir aktīvāks pret tiem vēža veidiem, kas notiek ar hromatīna modifikācijām. Tomēr mehānisms, kā tieši lunasīns inhibē histonu acetilēšanos, nav īsti skaidrs. Domā, ka lunasīns saistās pie deacetilētā histona ar negatīvi lādēto poli-D ķēdīti peptīda molekulas C-galā, jo, ja šo fragmentu noņem, tad

antimitotiskie lunasīna efekti pazūd. Peptīda N-galam varētu būt nozīme deacetilēto histonu atrašanai. Tas, ka lunasīns saglabājas bioaktīvs organismā, nodrošina tam ideāla profilakses līdzekļa īpašības. Vēl ļoti svarīgs atklājums ir tas, ka bez ķīmisko karcinogēnu klātbūtnes lunasīns neietekmē šūnu morfoloģiju un proliferāciju (Jeong *et al.*, 2007a; Jeong *et al.*, 2007b). Lunasīna ietekmi uz histonu acetilēšanas salīdzināja, pētot sintētisko lunasīnu un ekstrahēto no kviešiem. Lai izmērītu galveno histonu acetilēšanu lietoja neradioaktīvo histonu acetiltransferāzi. Eksperimentālās žurkas barojot ar kviešiem, kuri ir bagāti ar lunasīnu, novēroja tā uzkrāšanos žurku aknās. Kviešos lunasīna daudzumu noteica ar hromatogrāfijas metodi un jonizācijas masas spektrometriju. Lunasīns tika izolēts no dažādu kviešu genotipu sēklām un ar šo ekstraktu barotām žurkām pēc dekapitācijas no aknām izdalīja lunasīnu, kura bioloģisko aktivitāti pārbaudīja histonu acetilēšanas/deacetilēšanās testā. Secināja, ka žurku aknās atrastais lunasīns ir bioaktīvs, jo spēj inhibēt histonu acetilēšanas. Lunasīna histonu acetilēšanās inhibīcija par 25% novērojama jau 10 nM koncentrācijā, bet 80% inhibīcija tiek sasniegta 1 μM koncentrācijā (de Kok, *et al.*, 2008; Galvez *et al.*, 2001).

Krūts vēzis ir visbiežāk sastopamais vēža paveids un vadošais nāves cēlonis sievietēm visā pasaulē. Ir pierādīts, ka dažādi uztura bagātinātāji spēj aizsargāt pret šo vēža formu. Nesen atklāja, ka lunasīns ir toksisks MDA- MB- 231 šūnu kultūrai, jo tas kavē kancerogēno šūnu augšanu un vairošanos un uzrāda pretvēža darbību pelēm ar transplantētu krūts vēža audzēju. Uzskata, ka lunasīnam ir pretvēža darbība pret ER- negatīvo krūts vēzi. Iegūtie pētījumu rezultāti ir ļoti labi un lunasīns var pretendēt uz jaunās paaudzes pretvēža līdzekļa statusu. Tomēr vēl pirms tam ir jāveic ļoti daudz izpētes darbu klīnikās un ar brīvprātīgajiem (Helferich *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2011; De Assis and Hilakivi-Clarke, 2006).

Pētījumā ar mērķi noskaidrot lunasīna spējas veicināt apoptozi cilvēka resnās zarnas vēža šūnu mitohondrijos izmantoja HT-29 šūnu līniju. Lunasīns izraisīja HT-29 šūnu dalīšanās cikla apstāšanos G2M fāzē, vienlaicīgi stimulējot proteīna p21 ekspresiju. Peptīds izraisīja apoptozes un nekrozes regulējošā proteīna BCL- 2 samazinājumu. Bcl-2 gēna bojājums ir identificēts kā cēlonis vairākiem vēža veidiem, ieskaitot melanomu, krūts, prostatas, hroniskas limfocitozes un plaušu vēzi, kā arī, iespējams, ir cēlonis šizofrēnijas un autoimunitātes attīstībai. Tas var būt arī rezistences pret vēža ārstēšanu iemesls. Pētnieki

secināja, ka lunasīns stimulēja apoptozi HT- 29 šūnās, aktivējot apoptisko mitohondriju ceļus (Dia and Mejia, 2010).

1.6. Lunasīna pretiekaisuma darbība

Iekaisums ir daļa no mūsu organisma dabīgajiem aizsardzības mehānismiem pret dažādām traumām un kaitīgiem faktoriem, tomēr ilgstošs iekaisums ir saistīts ar hronisku saslimšanu, piemēram, vēzi. Lunasīns ir unikāls peptīds, kas parāda potenciālu pretvēža aktivitāti zīdītāju vēža šūnu līnijās, bet tam atklāja arī pretiekaisuma darbību. Pretiekaisuma darbības mehānismus lunasīnam un lunasīnam līdzīgajiem peptīdiem pētīja, izmantojot makrofāgu šūnu līnijas kā in vitro modeli (de Mejia and Dia, 2009). Mūsdienās ir pierādīta lunasīna pretiekaisuma darbība, jo tas ievērojami samazina dažādu iekaisuma marķieru līmeni. Oksidatīvais stress un iekaisums ir divi no viskritiskākajiem faktoriem, kas iesaistās kancerogenitātē un citos deģeneratīvos traucējumos. Ir izpētīts, ka lunasīns inhibē linolskābju oksidēšanos un darbojas kā 2,20 azinobis (3 – 6 sulfoskābe) diamonija sāls (ABTS) radikāļu uztvērējs. Turklāt, izmantojot ar baktēriju lipopolisaharīdiem (LPS) stimulētu RAW264.7 makrofāgu šūnu līniju, novēroja, ka lunasīns samazina reaktīvo skābekļa sugu (ROS) veidošanos. Lunasīns inhibē proiekaisuma citokīnu (audzēja faktors alfa [TNF- α] un interleikīnu-6 (IL-6) sekrēciju. Šie pētījumi apliecina plaša spektra lunasīna pretiekaisuma darbību (de Mejia and Dia, 2009).

Lunasīna antioksidatīva un aizsargājoša ietekme pret oksidatīvu stresu tika pētīta arī zarnu Caco-2 šūnu līnijā. Šīs šūnas izmanto farmakokinētikas pētījumos, lai noskaidrotu vielu absorbciju. Oksidatīvais stress ir viens no kritiskākajiem faktoriem, kurš iesaistīts daudzos kuņģa- zarnu trakta traucējumos, tādus kā zarnu trakta iekaisums un resnās zarnas vēzis. Šajā pētījumā tika pētīta in vitro lunasīna antioksidantu aktivitāte. Tika pierādīts, ka lunasīns spēcīgi iznīcina peroksil un superoksīdāzes radikāļus. Lunasīns aizsargā šūnas no oksidatīvā stresa un paildzina to dzīvotspēju. Pētījumā tika pierādītas tieša lunasīna spēja aizsargāt zarnu gļotādu no oksidatīviem bojājumiem (Garcia-Nebot et al., 2014).

1.7. Lunasīna iedarbība uz sirds-asinsvadu sistēmu

Lunasīns ir sēklu peptīds, kurš ir pazīstams ar savu pretvēža iedarbību un ar spējām samazināt sirds un asinsvadu slimības. Par to liecina tā antioksidatīvas īpašības. Bez tam lunasīnam atklāja holesterīna līmeni pazeminošo efektu, un galvenokārt šīs darbības dēļ zinātnieki un ārsti iesaka lietot pārtikā ar lunasīnu bagātus produktus (Jeong et al, 2009).

Pētījumi ir parādījuši, ka lunasīnam tiešām ir holesterīnu pazeminošas īpašības. Ilgākā laika posmā, ēdot sojas pupas un sojas produktus, pazeminās holesterīna līmenis, iespējams tāpēc, ka šie produkti satur lunasīnu. Lunasīns pazemina holesterīna līmeni, inhibējot aknās HMG - CoA reductāzes ekspresiju (Seber et al.,2012). Lunasīns palielina zema blīvuma lipoproteīnu receptoru mRNS transkripciju, kas ļauj samazināt zema blīvuma lipoproteīnu daudzumu. Sojas proteīni un to frakcijas jau ir ieguvuši FDA (*Food Drug Administration*) apstiprinājumu kā vielas, kas novērš sirds un asinsvadu slimības (Galvez 2012).

1.8. Lunasīna CNS efekti

Pagājušajā gadā sintētiskajam lunasīnam atklāja stipri izteiktu neuroleptisku un katalēptisku efektu, to ievadot intracisternāli devās 0,1-10 nmoli/pele C57BL/6peļu tēviņiem. Lunasīns ievērojami samazināja amfetamīna izraisīto hiperlokomotoro aktivitāti un nedaudz samazināja apomorfīna izraisīto peļu kāpelēšanas (*climbing*) uzvedības reakciju. Pētījumā netika novērota lunasīna ietekme uz ketamīna un bikukulīna izraisītiem CNS efektiem. Radioligandu receptoru saistīšanās pētījumi in vitro pierādīja nelielu lunasīna afinitāti pret dopamīna D1 receptoru ($K_i = 60 \pm 15 \mu\text{M}$), bet netika pierādīta lunasīna saistīšanās pie D2 receptoriem. Iegūtie dati liecina, ka lunasīns vismaz daļēji ir saistīts ar dopamīnerģisko D1 receptoru ceļiem. Tomēr iespējami vēl citi lunasīna centrālās darbības neidentificēti darbības mehānismi un turpmākie lunasīna CNS efektu pētījumi ir daudzsološi, īpaši ņemot vērā to, ka ir liela nepieciešamība pēc jauna veida antipsihotiskiem līdzekļiem (Dzirkale et al 2013).

1.9. Proteīnu koncentrācijas noteikšanas metožu raksturojums

Proteīnu daudzuma noteikšanai ir ieteiktas daudzas metodes un to var mērit:

1. Pēc optiskā blīvuma, ko dod peptīdu saites,
2. Peptīdu saites ķīmiskās reakcijas,
3. Ķīmiskās reakcijas, ar kurām pierāda kādu aminoskābi,
4. Krāsvielu sorbcijas uz proteīniem,
5. Nefelometriski - pēc duļķojuma,
6. Refraktometriski,
7. Pēc slāpekļa daudzuma (Kjeldāla metode).

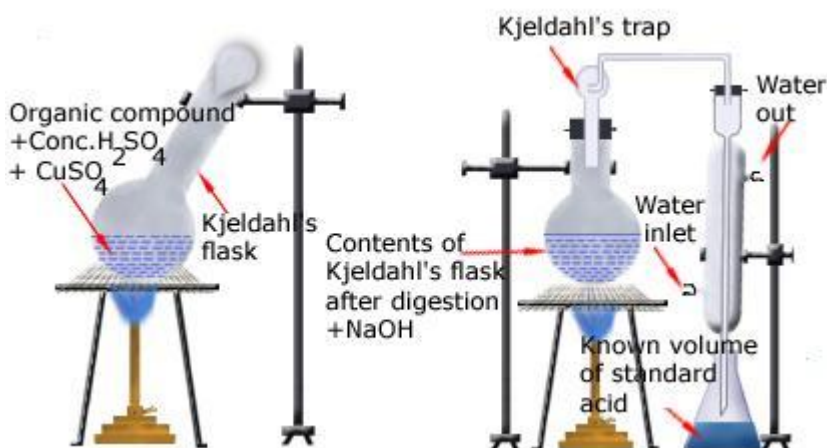
1.9.1. Kjeldāla (Kjeldahl) metode

Kjeldāla metode tika izstrādāta jau 1883. gadā Johanna Kjeldāla alus darītavā. Šajā metodē pārtikas produktu šķeļ ar stipru skābi, lai atbrīvotu slāpekli, ko nosaka ar piemērotu titrēšanas metodi. Šodien ir veikti vairāki uzlabojumi, lai paātrinātu reakciju un iegūtu precīzākus mērījumus (Rossi et al., 2004). Kjeldāla metode parasti tiek uzskatīta par proteīnu daudzuma standartnoteikšanas metodi lauksaimniecības produktos. Kjeldāla metodē nevērtē proteīna saturu tieši, bet izmanto pārrēķina koeficientu (F), kas ir nepieciešams, lai pārvērstu izmērīto slāpekļa koncentrāciju proteīnu koncentrācijā. Konversijas koeficients 6,25 (atbilst 0,16 g slāpekļa uz vienu gramu proteīnu), tomēr tā ir tikai vidējā vērtība un katram proteīnam ir dažādi konversijas faktori atkarībā no aminoskābju sastāva. Kjeldāla metodi var iedalīt trīs posmos: produkta gremošana, neitralizācija un titrēšana (Singh and Jambunathan, 1980). Produkta gremošana notiek kolbā, karsējot paraugu kopā ar sērskābi (oksidētājs, kas pārstrādā pārtiku), bezūdens nātrija sulfātu (lai paātrinātu reakciju, paaugstinot vārišanās punktu) un katalizatoru, piemēram, varu, selēnu, titānu (lai paātrinātu reakciju). Gremošana pārveido jebkuru pārtikas produkta slāpekli (izņemot to, kas ir nitrātu vai nitrītu veidā) par amonjaku un citas organiskās vielas sašķeļ līdz CO₂ un H₂O. Amonjaka gāze neatbrīvojas skābā šķīdumā, jo amonjaks ir amonija jonu formā (NH₄⁺), kas saistās ar sulfāta jonu

(SO₄²⁻) un tādējādi paliek šķīdumā: N (no pārtikas produkta) → (NH₄)₂SO₄. Pēc tam, kad gremošanu ir pabeigta, seko neutralizācija un reakcijas kolba ar cauruli tiek savienota ar citu kolbu, kurā šķelšanas šķīdumu pasārmina ar nātrija hidroksīdu, kas pārveido amonija sulfātu amonjakā: (NH₄)₂SO₄ + 2 NaOH → 2NH₃ + 2H₂O + Na₂SO₄. Amonjaka gāze, kas veidojas, iztvaiko no šķīduma uztvērēja kolbā, kur reaģē ar borskābes pārākumu. Zems šķīduma pH uztvērēja kolbā pārvērš amonjaka gāzi amonija jonā un vienlaicīgi pārvērš borskābi borātu jonos: NH₃ + H₃BO₃ (borskābe) → NH₄⁺ + H₂BO₃⁻ (borāts). Titrējot radušos amonija borātu ar standarta koncentrācijas sērskābes vai sālsskābes šķīdumu un, izmantojot piemērotu indikatoru, nosaka slāpekļa saturu.

$$\% N = \frac{x \text{ moles}}{1000 \text{ cm}^3} \times \frac{(v_s - v_b) \text{ cm}^3}{m \text{ g}} \times \frac{14 \text{ g}}{\text{moles}} \times 100$$

vs un vb ir parauga un tukšās kontroles titrēšanas tilpumi, 14g ir slāpekļa N molekulmasa. Pēc tam, kad slāpekļa saturs ir noteikts, tas tiek pārvērsts par proteīna saturu, izmantojot atbilstošu konversijas faktoru: % Proteīns = F% N. Tāpēc bieži proteīna saturs publikācijās ir norādīts %. Metode nav ideāla, jo slāpekli satur ne tikai aminoskābes un proteīni ir dažādi. Tomēr tā ir starptautiski pieņemta metode proteīnu mērīšanai pārtikas produktos.



Att.1. Kjeldāla metodes shēma (<http://www.tutorvista.com/content/chemistry/chemistry-iii/organic-compounds/quantitative-analysis.php#kjeldahl%27s-method>)

1.9.2. UV spektroskopijas metodes

Šīs ir visbiežāk laboratorijās izmantotās metodes proteīnu satura mērīšanai šūnās un citos bioloģiskos materiālos (Stoscheck, 1990). Proteīniem piemīt dabiska spēja absorbēt gaismu elektromagnētiskā spektra UV-rajonā un tos var ķīmiski vai fiziski modificēt, lai padarītu spējīgus absorbēt (vai izkliedēt) gaismu šajā reģionā. Pamatprincips šiem testiem ir līdzīgs. Triptofāns un tirozīns absorbē ultravioleto gaismu pie 280 nm. Aminoskābju triptofāna un tirozīna saturs daudziem proteīniem paliek nemainīgs, tāpēc var izmantot proteīna šķīdumu absorbciju pie 280nm, lai noteiktu proteīnu koncentrāciju. Procedūra ir ļoti vienkārša un nav nepieciešami īpaši reaģenti. Galvenais trūkums ir tas, ka nukleīnskābes arī absorbē gaismu pie 280 nm un tādējādi varētu traucēt proteīnu mērījumus. Lai pārvarētu šo problēmu, var mērīt absorbciju pie diviem dažādiem viļņa garumiem. Biureta metodē izmanto violeti purpura krāsas rašanos vara joniem (Cu^{2+}) reaģējot ar peptīdu saitēm sārmainā vidē. Biureta reaģentu komplekts satur visas ķīmiskās vielas, kas vajadzīgas, lai veiktu proteīnu satura analīzi.

Lovri (Lowry) metode apvieno biureta reaģentu ar citu reaģentu (Folin-Ciocalteu fenolu reaģents), kas reaģē ar tirozīna un triptofāna atlikumiem proteīnos. Reakcijā rodas zilgana krāsa, ko nolasa starp 500 - 750 nm atkarībā no nepieciešamās jutības. Šī metode ir jutīgāka par biureta metodi. Krāsvielas saistīšanas metodēs izmanto negatīvi lādētas iezīmes, kuras pievieno proteīnu šķīdumiem ar tā noregulētu pH lai proteīni ir pozitīvi lādēti. Proteīni veido nešķīstošu kompleksu ar krāsu, jo anjonu tipa krāsviela saistās ar katjonu grupām, kas pamatā ir aminoskābju atlikumi (histidīns, arginīns un lizīns). Nesaistītā krāsviela paliek šķīdumā un pēc nešķīstošā proteīns-krāsviela kompleksa nofiltrēšanas vai nocentrifugēšanas izmēra tās absorbciju. Proteīnu daudzums ir proporcionāls piesaistītās krāsvielas daudzumam (Stoscheck, 1990).

1.9.3. Izgulsnēšanas metodes

Proteīnu molekulas, kas parasti ir šķīstošas, var izgulsnēt, pievienojot dažas ķīmiskās vielas, piemēram, trihloretiķskābi. Nogulsnes saduļķo šķīdumu un var mērīt duļķainības pakāpi.

1.9.4. Standartlīknes iegūšanai izmantotie proteīni

Proteīni atšķiras pēc aminoskābju sastāva un katrs proteīns reaģē nedaudz atšķirīgi katrā no proteīna noteikšanas metodēm (Stoscheck, 1990). Tādēļ labākā izvēle būtu par standartu lietot analizējamā paraugā izplatītāko proteīnu. Tomēr to nav iespējams vienmēr izdarīt. Daudzos gadījumos mērķis ir tikai novērtēt kopējo proteīnu koncentrāciju un neliels proteīnu mainīgums ir pieņemams. Alternatīva ir kā standartu izvēlēties proteīnu, kas rada ļoti līdzīgu krāsu reakcijas līkni izvēlētajā proteīnu noteikšanas metodē un ir viegli pieejams jebkurā laboratorijā jebkurā laikā (Stich, 1990; Brenner and Harris, 1995).

Parasti izmanto liellopu seruma albumīnu (BSA), jo tas ir plaši pieejams ar augstu tīrību un salīdzinoši lēts. Arī liellopu gamma globulīns (BGG) ir labs standarts, nosakot antivielu koncentrāciju, jo BGG krāsu reakcijas līkne ir ļoti līdzīga imūnglobulīna G (IgG). Aprēķinot kopējo proteīnu koncentrāciju nepazīstamiem paraugiem, ir svarīgi iekļaut standarta līkni katru reizi, kad tests tiek veikts. Tas jo īpaši attiecas uz imunoloģisko testu metodēm, kas reizēm dod nelineāras standarta līknes. Kopumā mazāk punktu mērījumi ir vajadzīgi, lai izveidotu standarta līkni, ja krāsas atbilde ir lineāra.

1.9.5. Proteīnu noteikšanas metožu salīdzinājums

Pārtikas proteīnu pētniekiem bieži ir grūti izvēlēties īpašu tehniku, lai izmērītu proteīnu koncentrāciju. Pirmkārt jāizlemj kādam nolūkam informācija tiks izmantota. Ja analīze jāveic oficiālos nolūkos, piemēram, izpildot juridiskās vai marķēšanas prasības, tad ir svarīgi lietot oficiāli atzītu metodi. Kjeldāla metode un arvien vairāk Dumas metode ir oficiāli apstiprināta pārtikas produktu analīzēm (Blondel and Vian, 1993). Dumas metodē

paraugu sadedzina augstā temperatūrā (apmēram 900° C) skābekļa klātbūtnē. Tas noved pie oglekļa dioksīda, ūdens un slāpekļa izplūšanas. Gāzes pēc tam novada uz īpašām kolonnām, kas absorbē oglekļa dioksīdu un ūdeni. Kolonna, kas beigās satur siltuma vadītspējas detektoru, tiek izmantota, lai atdalītu slāpekli no atlikušā oglekļa dioksīda un ūdens. Tad tiek mērīts atlikušā slāpekļa saturs. Speciāls mērinstruments vispirms ir jākalibrē, analizējot materiālu, kas ir tīrs no piemaisījumiem un ir ar zināmu slāpekļa koncentrāciju. Signālu, kas noteikts ar siltuma vadītspējas detektoru nezināmā paraugā, pārveido par slāpekļa saturu. Tāpat kā Kjeldāla metodē izmanto pārrēķina koeficientus, lai noteiktu atbilstoši slāpekļa koncentrācijai paraugā kopproteīna saturu, kas ir atkarīgs no konkrētā proteīna aminoskābju secības. Dumas metode ir ātrāka par Kjeldāla, bet ļoti dārga. Mūsdienās Dumas metode ir pilnībā automatizēta un ar to var izmērīt proteīnu koncentrāciju paraugā 5 minūtēs, salīdzinot ar Kjeldāla metodi, kas paņem līdz 2 stundām (Miller et al, 2007).

Laboratorijas pētījumos priekšroku dod krāsvielu izmantošanai UV - redzamās spektroskopijas metodēs, jo tās sniedz ātrus un uzticamus mērījumus, ir jutīgas un ar tām var noteikt proteīnus zemā koncentrācijā (Akins and Tuan 1992; Bradford, 1976).

No otras puses, dažādās UV – redzamās gaismas metodes prasa darbietilpīgu paraugu sagatavošanu pirms analīzes. Proteīni jāiegūst no pārtikas produkta tādā veidā, lai būtu atšķaidīts caurspīdīgs šķīdums, kas parasti prasa laikietilpīgas sasmalcināšanas, ekstrakcijas ar šķīdinātāju, filtrēšanas un centrifugēšanas procedūras.

2. METODES UN MATERIĀLI

2.1. Materiāli

96 lauciņu plates

Pipetes ar maināmu tilpumu 10 µl un 200 µl

Daudzkanālu pipetes

Reaģentu komplekts (PQ02-10 Dojindo), kurā ietilpst:

WST-8 šķīdums

Standarta albumīna šķīdums 10 mg/ml

PBS buferis

Elektriskās dzirnaviņas *Falling Number Laboratory Mill* 3100 ar 0,5 mm sietu

Koniskas 50 ml kolbiņas

Magnēti

Magnētiskais maisītājs

Proteāžu kokteilis (Sigma)

0,1 M PBS buferis

50 ml centrifūgas stobriņi

Centrifūga

Filtrpapīrs

Termostats

Analītiskie svāri

Tehniskie svāri

ELISA mikroplašu lasītājs

2.2. Mitruma % noteikšana miltos

Uz analītiskiem svāriem nosvērti miltu paraugi termostatā 110⁰ C grādu temperatūrā tika žāvēti līdz konstantam svaram. Svāra zudums atbilst mitruma daudzumam. Atlikums ir sausais atlikums. Mitrumu izteicām % pret sākuma iesvaru.

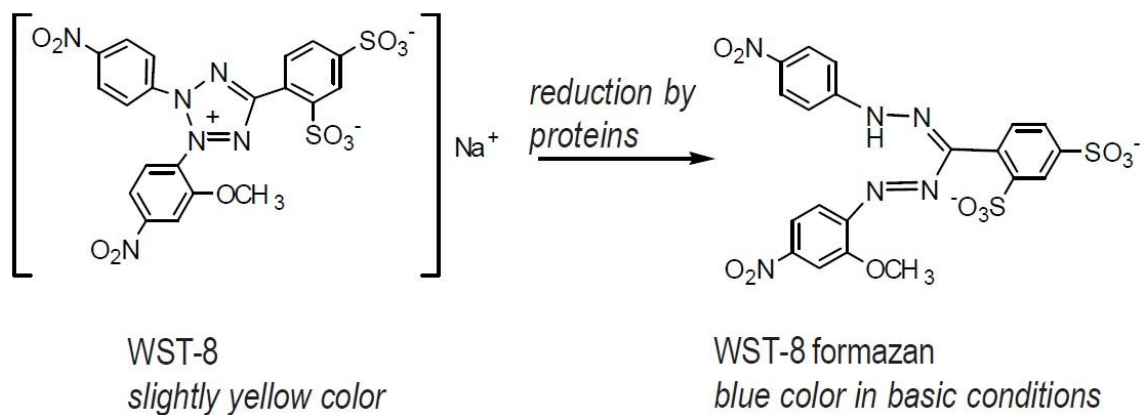
2.3. Graudu ekstraktu sagatavošana peptīda lunasīna izdalīšanai

Graudi tika samalti miltos, izmantojot elektriskās dzirnaviņas *Falling Number Laboratory Mill* 3100 ar 0,5 mm sietu.

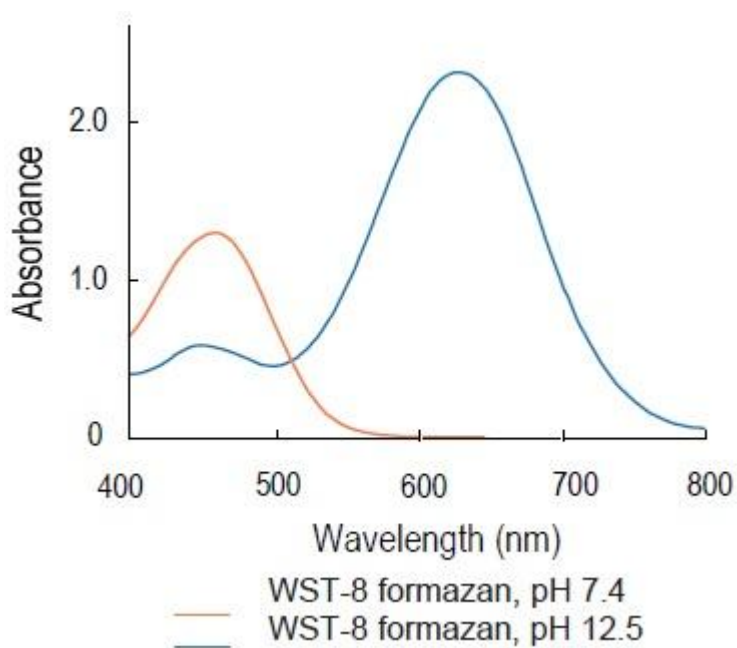
- Nosver 4 g miltu un ieber 50 ml koniskā kolbiņā,
- Pievieno attiecībā pret iesvaru 1:10 ml 0,1 M PBS bufera šķīduma
- Pievieno 0.1% proteāzes kokteiļa
- Ievieto magnētu
- Ekstrahē 48 h, novietojot kolbu uz magnētiskā maisītāja
- Ekstraktu pārlej 50 ml centrifūgas stobriņos
- Centrifugē 20 min 3000 apgr./min
- Iegūto ekstraktu filtrē caur papīra filtriem
- Iegūtajam filtrātam pievieno 10 ml heksāna, krata 5 min
- Centrifugē 5 min 3000 apgr./min
- Noņem augšējo heksāna slāni un 20 ml iegūto ekstrakta izmanto proteīnu daudzuma mērīšanai ar WST-8 reaģentu komplektu.

2.4. Totālā proteīna daudzuma noteikšana ar WST-8 metodi

Proteīnu koncentrāciju noteicām ar reaģentu komplektu *Protein quantification kit* (Dojindo Molecular Technologies, INC). Proteīna kvantitatīvai noteikšanai izmanto mikroplates ar 96-lauciņiem. Krāsu reakcija ir balstīta uz šķīstoša tetrazola sāls WST – 8 reakcijas ar proteīniem, kuras rezultātā veidojas formazāns (att..2.1). WST - 8 formazāna krāsa ir dzeltena pie neitrālu pH un kļūst zila augstākā (sārmainākā) pH līmenī. Lineāra standartlīkne ir no proteīnu koncentrācijas 50 µg/ ml līdz 5 mg /ml.

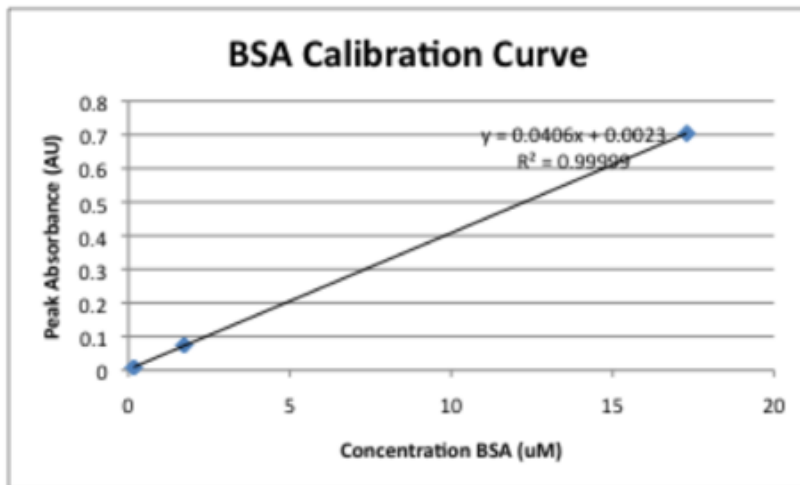


Att. 2.1. Reakcijas shēma krāsvielas WST-8 pārvēršanai formazānā



Att. 2.2. Absorbcijas viļņu garumi pie dažādiem pH

Kā standartu izmantojām liellopa seruma albumīnu (BSA) atšķaidījumos 1:2, sākot no 1 mg/ml. Visus eksperimentus atkārtojām trīs reizes ar paralēliem mērījumiem.



Att.2.3. Tipiska BSA kalibrācijas līkne

Darba gaita

Atšķaida BSA standartšķīdumu, sagatavojot atšķaidījumus buferī, kā augstāko koncentrāciju ņemot 1 mg/ml un atšķaidot divas reizes, ieguvām katru nākošo koncentrāciju.

Katrā lauciņā iemēra 180 μl bufera.

Pievieno 20 μl BSA atšķaidījumu, katru koncentrāciju triplikātos.

Pārējos lauciņos pievieno 20 μl triplikātos katra graudu miltu ekstrakta.

Samaisa.

Pievieno visiem lauciņiem WST-8 šķīduma 20 μl.

Samaisa.

Inkubē plati 37 C° 30 min tumšā vietā.

Ieliek plati mikroplašu lasītājā un nolasa optisko blīvumu (OD) pie 630-670 nm.

Pēc kalibrācijas līknes izrēķina proteīnu koncentrāciju paraugā.

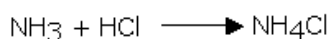
2.5. Proteīnu daudzuma noteikšana ar Kjeldāla metodi

Graudu paraugu apstrāde ar sērskābi un pārdestilēšana ir veikta Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā.

Titrēšana un slāpekļa satura pārrēķināšana proteīnu daudzumā veikta LU Medicīnas fakultātē.

Kolbiņā pie skābā amonjaka šķīduma pievieno pāris pilienu indikatora metiloranžā. Biretē ielej NaOH 0,1 N šķīduma. Lēni, atverot biretes krānu, titrē līdz indikators metiloranžais nomaina lašu krāsu uz oranžu krāsu.

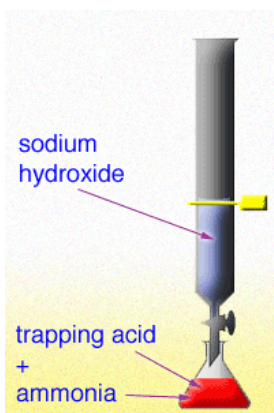
Nolasa amonjaka uztveršanai iztērētās skābes neitralizācijai iztērētā NaOH 0,1 N šķīduma tilpumu. Tas ir proporcionāls skābes daudzumam, kas ir palicis brīvs pēc amonjaka gāzes uztveršanas.



Pārrēķina atpakaļ uz eksperimenta sākumu, cik ml 1 N skābes ir izlietots.

Pēc masas nezūdamības likuma izriet, ka 1000 mL of 1 N HCL = 1000 mL 1 N NH₃ = 17g NH₃ = 14 g slāpekļa.

Slāpekļa daudzums amonjakā izteikts g = 14 x 1 (tāpēc, ka skābes normalitāte ir 1 N HCL) x skābes ml neitralizēšanai, dalīts ar 1000.



Att. 2.4. Titrēšanas shēma

Slāpekļa daudzums % = 1,4 x 1 (1N HCl) x HCl tilpums, kas bija vajadzīgs NH₃ neitralizēšanai (kas atbilst patērētā 0,1 N NaOH tilpumam) un dalīts ar iesvaru gramos.

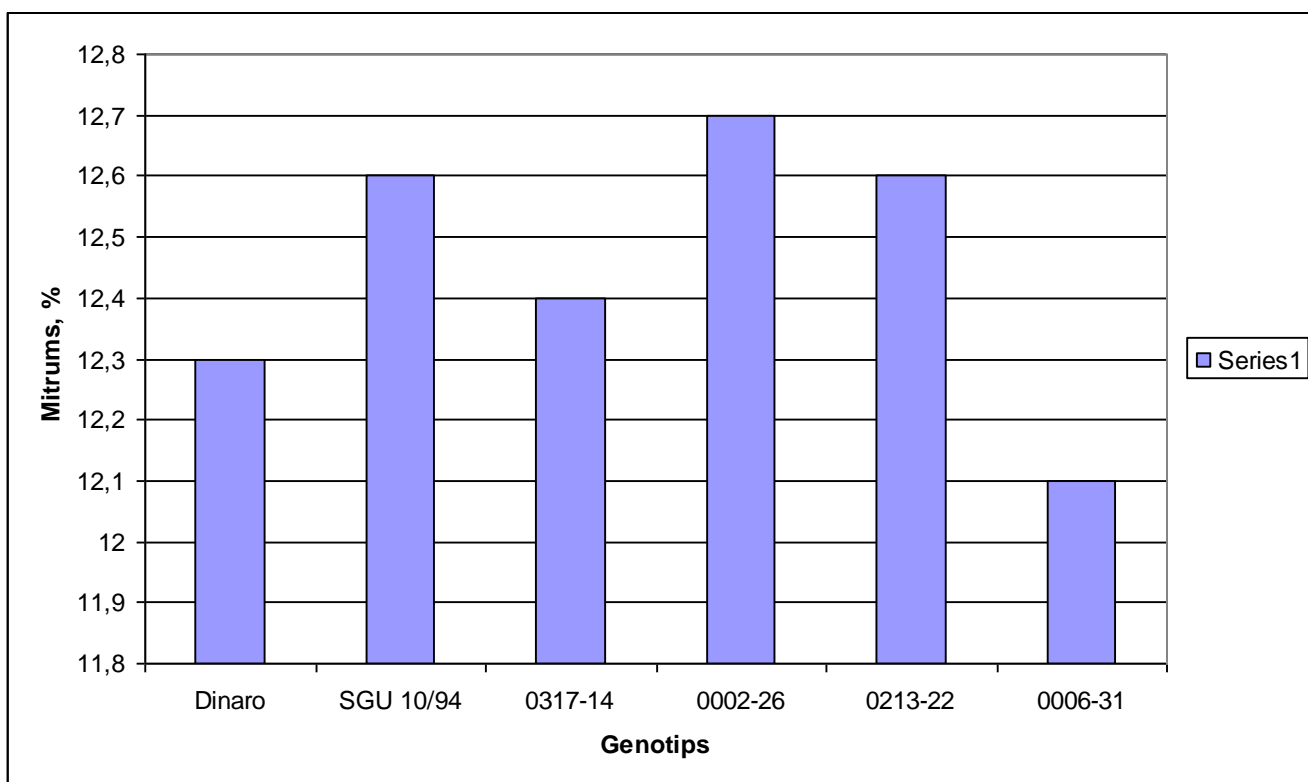
2.6. Datu analīze

Iegūtie proteīna daudzuma dati tika aprēķināti % un parādīti kā vidējie aritmētiskie lielumi \pm standartnovirze (S.D), izmantojot datorprogrammu Excel un Graph Pad Prism (GraphPad Software).

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Mitruma daudzums tritikāles miltos

Bakalaura darbā seši ziemas tritikāļu genotipi tika iekļauti analīzēs: Polijā radītā šķirne „Dinaro”, un Čehijā izveidotais tritikāles klons SGU 10/94 un četri Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā radītie tritikāļu genotipi. Visi genotipi tika audzēti Priekuļu konvencionālajā lauksaimniecības sistēmā.



Att. 3.1.1. Mitruma saturs % tritikāles genotipos

Attēlā redzams, ka visi tritikāles genotipi satur ļoti līdzīgu mitruma saturu. Tas ir ap 12%. Mitruma % salīdzinoši nedaudz vairāk ir 0002-26>0213-22=SGU 10/94> 0317-14> Dinaro>0006-31 genotipos.

3.2. Lunasīna un totālā proteīna saturs pēc Kjeldāla metodes tritikāles genotipos

Lunasīna saturs tika mērīts ar augsti-efektīvās šķidrums hromatogrāfijas masspektrometrijas tandēma metodi bakalaura darbā. Šajā pētījumā tas ir salīdzināts ar proteīnu saturu.

3.2.1. tabula

Lunasīna un totālā proteīna saturs tritikāles genotipos

Nr.	Tritikāles genotips	Lunasīns $\mu\text{g/g}$ miltu	Proteīna daudzums, %	Proteīna daudzums mg/g
1	Dinaro	3109,22 \pm 29,22	11,5	0,46 \pm 0,05
2	SGU 10/94	1324,39 \pm 15,1	12,2	0,49 \pm 0,04
3	0317-14	929,77 \pm 12,08	11,4	0,46 \pm 0,04
4	0002-26	6458,29 \pm 24,02	14,1	0,56 \pm 0,054
5	0213-22	1984,33 \pm 15,31	13,9	0,56 \pm 0,043
6	0006-31	429,97 \pm 10,06	16,8	0,67 \pm 0,05

Lunasīna satura mērījumu dati parādīti kā vidējais \pm standartnovirze (S.D.), n=3 (K. Antonovičs, Bakalaura darbs, 2012). Proteīnu saturs kā vidējais \pm standartnovirze (S.D.), n=3.

Ar Kjeldāla metodi tiek noteikts slāpekļa saturs, kurš pēc tam tiek konvertēts proteīna daudzumā. Totālais proteīna daudzums noteikts pēc Kjeldāla metodes liecina, ka pēc proteīna satura genotipi sarindojas: 0006-31>0002-26> 0213-22> SGU 10/94>Dinaro>0317-14.

Turpretī lunasīna satura ziņā tritikāles genotipi sarindojas: 0002-26>Dinaro>0213-22>SGU 10/94>0317-14>0006-31. Tabulā redzams, ka ar lunasīnu visbagātākajam genotipam 0002-26 nav vislielākais proteīnu saturs. Visvairāk proteīnu ir genotipam 0006-31, kuram ir viszemākais lunasīna daudzums. Netika novērota kopējā proteīna daudzuma korelācija ar lunasīna saturu.

3.3. Lunasīna un totālā proteīna saturs pēc WST-8 metodes tritikāles genotipos

Ūdenī vai ūdens šķīdumu buferos šķīstošie proteīni galvenokārt ir albumīni un globulīni. Tritikāle satur mazāk nešķīstošā glutēna kā rudzi un kvieši (Yu et al., 2013; Naeem et al., 2002). Tādēļ tā ir ne visai piemērota maizes un citu izstrādājumu cepšanai, kur lieto raugu, bet tritikāles miltus var izmantot makaronu, cepumu, biskvītu u.c. izstrādājumu ražošanā.

Literatūrā publicētie dati no Kanādas datu bāzes ([http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/fcd10575](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/fcd10575)) liecina, ka tritikālē proteīnu daudzums svārstās no 10 līdz 16%, bet šķīstošā proteīna frakcija ir liela un aizņem apmēram 30-50% no kopējā proteīnu daudzuma. Tritikāles graudos ir augsts lizīna saturs.

Table 4. Composition of triticale, wheat and rye grain (USA data, 1996)

	Triticale	Wheat	Rye
Protein	10.3 – 15.6	9.3 – 16.8	13.0 – 14.3
Starch	57 – 65	61 – 66	54.5
Crude fibre	3.1 – 4.5	2.8 – 3.9	2.6
Free sugars	3.7 – 5.2	2.6 – 3.0	5.0
Ash	1.4 – 2.0	1.3 – 2.0	2.1

% grain weight, dry weight basis

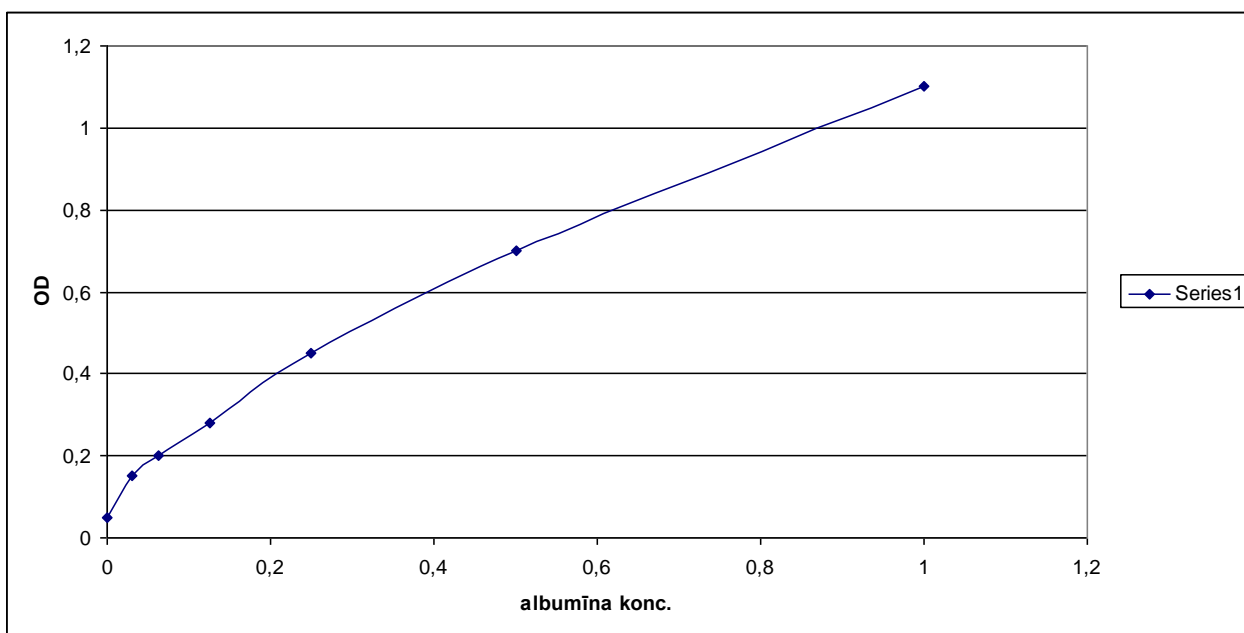
(*Cereal Food World, June 1996, American Association of Cereal Chemists*)

Interpretation: Triticale composition is comparable to that of other cereals, but with higher fibre

Att. 3.3.1. Galveno uzturvielu un pelnu saturs tritikālē, kviešos un rudzos

Tritikāles proteīnu saturs un īpašības ir plaši pētītas pagājušā gadsimta septiņdesmitajos gados (Chen and Bushuk, 1970). Atrastā tritikāles proteīnu un cietes bioloģiskā aktivitāte amilāzes testā ir līdzīga rudzu un kviešu proteīniem un cietei (Piasecka-Kwiatkowska et al., 2007).

Standartlīknes iegūšanai izmantojām liellopu albumīna šķīdumu un ar reaģentu komplektu WST-8 izmērījām proteīnu daudzumu miltu ekstraktos.



Att.3.3.2. Albumīna standartlīkne koncentrācijā no 0,03 līdz 1 mg/ml

Katram paraugam mērījām buferī šķīstošo proteīnu saturu triplikātos un aprēķinājām vidējo lielumu.

Lunasīna un ar WST-8 metodi noteiktais totālā proteīna saturs tritikāles genotipos

Nr.	Tritikāles genotips	Lunasīns $\mu\text{g/g}$ miltu	Proteīna daudzums, mg/g
1	Dinaro	3109,22 \pm 29,22	0,17 \pm 0,01
2	SGU 10/94	1324,39 \pm 15,1	0,25 \pm 0,01
3	0317-14	929,77 \pm 12,08	0,21 \pm 0,015
4	0002-26	6458,29 \pm 24,02	0,28 \pm 0,02
5	0213-22	1984,33 \pm 15,31	0,22 \pm 0,01
6	0006-31	429,97 \pm 10,06	0,4 \pm 0,02

Lunasīna satura mērījumu dati parādīti kā vidējais \pm standartnovirze (S.D.), n=3 (K. Antonovičs, Bakalaura darbs, 2012). Proteīnu saturs parādīts kā vidējais \pm standartnovirze (S.D.), n=3.

Aprēķinot kā korelē totālā ar Kjeldāla metodi noteiktā proteīna daudzums ar ūdenī šķīstošā proteīna daudzumu, atradām augstu korelāciju, jo pēc Pīrsona korelācijas $r= 0,903196$.

Proteīnu daudzuma tritikāles graudos salīdzinājums, nosakot ar Kjeldāla un WST-8 metodi

Nr.	Tritikāles genotips	Proteīnu daudzums pēc Kjeldāla metodes mg/g	Ūdenī šķīstošo proteīnu daudzums, mg/g	Ūdenī šķīstošo proteīnu % daudzums kopproteīnā
1	Dinaro	0,46±0,05	0,17±0,01	37
2	SGU 10/94	0,49±0,04	0,25±0,01	46
3	0317-14	0,46±0,04	0,21±0,015	51
4	0002-26	0,56±0,054	0,28±0,02	39
5	0213-22	0,56±0,043	0,22±0,01	50
6	0006-31	0,67±0,05	0,4± 0,02	59

Tomēr neatradām korelāciju starp lunasīna saturu un ūdenī šķīstošo proteīnu daudzumu. Pārrēķinot noapaļoto vidējo lunasīna saturu mg/g uz g ūdenī šķīstošo proteīnu, ieguvām pierādījumus tam, ka tritikāles proteīnu frakcija ir bagāta ar lunasīnu.

Vidējais lunasīna saturs mg/g uz ūdenī šķīstošajiem proteīniem

Nr.	Triticāles genotips	Lunasīns mg/g miltu	Lunasīns mg/g proteīnu
1	Dinaro	3,109	18,288
2	SGU 10/94	1,32	6,28
3	0317-14	0,929	3,716
4	0002-26	6,458	29,09
5	0213-22	1,984	7,085
6	0006-31	0,429	1,0725

2004. gadā tika publicēts pētījums par lunasīna saturu komerciāli pieejamos sojas produktos. Sojas proteīnā lunasīna koncentrācija bija 13–44 mg/g miltu, bet ar lunasīnu bagātos sojas miltos koncentrācijas sasniedza 27,3 mg/g miltu (de Mejia et al., 2004). Mēs izpētījām, ka dažiem tritikāles genotipiem lunasīna saturs ir salīdzināms ar sojas, rēķinot uz g proteīnu.

3.3.5. tabula

Lunasīna saturs sojas proteīna produktos (de Meija et al., 2004)

sample	mg lunasin/ g extracted protein		mg lunasin/ g flour	
	mean	SD	mean	SD
soy flour (48% protein)	20	4	14	3
soy flakes (50% protein)	16	3	13	2
soy flour (50% protein)	21	2	12	2
soy powder	34	3	14	2
soy protein concentrate (60–76% protein)	70	9	28	3
isolated soy protein (84.6–88.2% protein)	81	8	38	4
hydrolyzed soy protein (82% protein)	77	6	44	6

Kaut gan augos ir atrasts lunasīns, patlaban tiek meklēti jauni efektīvi un izmaksu ziņā izdevīgi citi lunasīna iegūšanas veidi. To veicina sintētiskā lunasīna ļoti augstā cena. Ir publicēta rekombinētā lunasīna iegūšanas metode, kurā lunasīna gēnu ievada *E. coli* baktērijās, lietojot T7 ekspresijas sistēmu (Liu and Pan, 2010). Tika uzsintezēts lunasīna gēns, pavairots ar polimerāzes ķēdes reakciju, ievietojot tajā poli-histidīna (histidīna aminoskābju sekvenca) iezīmi pie C- un N-termināla. Gēns tika ievietots pET29a plazmīdā un plazmīdas *E. coli* baktērijās. Pēc 4 stundām lunasīna koncentrācija Luria-Bertani barotnē sasniedza 4,73 mg/L. Pārbaudot rekombinētā lunasīna aktivitāti atklājās, ka tas darbojas analogiski sintētiskajam peptīdam un uzrāda tādas pašas īpašības. Molekulas svars kā prognozēts bija 11,35 kDa, kas ir lielāks par lunasīna monomēra svaru tāpēc, ka ir pievienotas histidīna aminoskābju iezīmes. Rekombinētais lunasīns ir 92-aminoskābju garš. Šīs liekās aminoskābes pagaidām neparāda izmaiņas bioaktivitātē, salīdzinot ar dabisko 43

aminoskābju garo lunasīnu un uzrāda tādas pašas īpašības. Salīdzinot ar citiem piedāvātiem lunasīna ekstrakcijas vai sintēzes veidiem, šī metode ir izdevīga.

Tomēr vislielāko neizpratni par lunasīna rašanos audos izraisīja 2 publikācijas, kurās autori apšaubā lunasīna sintēzi graudos un pamato šīs šaubas ar to, ka eksperimentos nespēja atrast lunasīna gēnu graudos (Dinelli et al., 2014; Mitchell et al., 2013). Lunasīna atklāšana sojā sākās ar gēnu analīzi proteīna 2S frakcijā. Sākotnēji sojas proteīnu 2S frakcijā tika atrasts gēns, kas kodē jaunu proteīnu, kura struktūru atšifrēja un nosauca par lunasīnu. Vēlāk lunasīnu atrada arī kviešos, rudzos, miežos, tritikālē, melnās naktenes un amaranta sēklīs, jau nemeklējot gēnu, bet proteīnu un tā identitāti noteica pēc hromatogrammas un masas spektra, salīdzinot ar sintētisko lunasīnu. Tomēr minētajās publikācijās autori raksta, ka analizētajos graudu genotipos nav lunasīna, nav atrasti pat lunasīnam līdzīgas aminoskābju secības peptīdi ar molekulāro svaru līdzīgu lunasīna standartam un nav atrasts lunasīna gēns DNS analīzēs. Šo pētījumi autori izsaka pieņemumu, ka lunasīns rodas mikroorganismu darbības vai bioķīmisku enzīmu reakcijas rezultātā. Šāds negaidīts pavērsiens lunasīna atklāšanas vēsturē prasa turpmākos pētījumus.

Iespējams tāpēc, ka lunasīna sintēze graudaugos nav pierādīta un nav saistīta ar proteīnu gēniem, mēs neatradām korelāciju starp lunasīna saturu un proteīnu daudzumu tritikālē. Tomēr neapšaubāmi lunasīns vai lunasīnam līdzīgi peptīdi ir graudos, jo par to liecina ekstraktos atrastā peptīda un sintētiskā lunasīna identiskie masas spektri un no graudiem izdalītā peptīda bioloģiskie efekti.

4. SECINĀJUMI

1. Visi tritikāles genotipi satur vidēji ap 12% mitruma. Attiecīgos genotipos mitruma % salīdzinoši ir: 0002-26>0213-22=SGU 10/94> 0317-14> Dinaro>0006-31.
2. Ar Kjeldāla metodi noteiktais kopproteīna daudzums sešu tritikāles genotipu graudos vidēji ir no 11,4 līdz 16,8%. Vislielākais tas ir genotipam 0006-31, kas satur vismazāk lunasīna peptīda.
3. Ar WST-8 metodi izmērītais ūdenī šķīstošo proteīnu daudzums vidēji ir 30-50% no kopproteīna daudzuma, kas noteikts ar Kjeldāla metodi. Ir augsta korelācija starp kopproteīna un ūdenī šķīstošo proteīnu daudzumiem.
4. Nav atrasta korelācija ne starp kopproteīna daudzumu tritikāles graudos, ne ūdenī šķīstošo proteīnu frakcijas daudzumu un lunasīna saturu. Lunasīna daudzums tritikāles graudos nekorelē ar proteīna daudzumu.

5. PATEICĪBAS

Pateicos Dr. ķīm. Ilvai Nakurtei par palīdzību lunasīna satura mērījumos ar šķidrums hromatogrāfu un masspektrometru. Pateicos Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūta pētniekiem par iedotajiem graudu paraugiem.

Izsaku lielu pateicību darba vadītājai prof. Rutai Mucenieci par pretimnākošo attieksmi un ieteikumiem darba tapšanas gaitā.

6. LITERATŪRAS SARAKSTS

1. **Akins, R.E., Tuan, R.S.** Measurement of protein in 20 seconds using a microwave BCA assay. *Biotechniques* 1992, 12(4), 496-499.
2. **Andreoli, M., V. Tellarini.** Farm sustainability evaluation: methodology and practice. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2000, 77 (1-2), 43-52.
3. **Bankina B., Kronberga A., Kokare A., Maļeckā S.** Triticāles un rudzu slimību ierobežošanas iespējas integrētā augu aizsardzībā. *Zinātniski praktiskas konferences raksti "Zinātne Latvijas lauksaimniecības nākotnei: pārtika, lopbarība, šķiedra un enerģija"*, Jelgava, 2012 106.-110.
4. **Belicka I., Legzdina L.** Hulled barley – the perspective cultivated cereal in organic farming. Scientific aspects of organic farming, *Proceedings of the conference held in Jelgava, Latvia, March 21-22, 2002*, 45-48 pp.
5. **Berga L., Zute S.** Kas graudos vērtīgākais? „*Agrotops*” 2013. gada augusts.
6. **Bleidere M., Vīcupa Z., Zute S.** Food grain quality traits in oat under organic and conventional growth conditions. *Safe Food. Proceedings of 16th International Eco-Conference*. Novi Sad, Serbia, 2012. 26.-29.09.2012, pp. 353-360.
7. **Bleidere M., Grunte I., Grauda D., Rashal I.** Morphological and agronomic characterization of spring barley variety ‘Austrijs’. *Acta Biol. Univ. Daugavp.*, 2012. 12 (1), 44 – 50.
8. **Bleidere M., Vīcupa Z., Zute S.** Food grain quality traits in oat under organic and conventional growth conditions. *Safe Food. Proceedings of 16th International Eco-Conference*. Novi Sad, Serbia, 2012. 26.-29.09.2012, pp. 353-360.
9. **Blondel P, Vian L.** Protein assay by the modified Dumas method applied to preparations of plasma proteins. *Annales pharmaceutiques françaises* 1993;51(6):292-298.
10. **Bourn D, Prescott J.** A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2002;42: pp. 1-34.

11. **Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
12. **Brenner, A.J., Harris, E.D.** A quantitative test for copper using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1995, 226, 80-84.
13. **Dia V.P., de Mejia E.G.** Lunasin promotes apoptosis in human colon cancer cells by mitochondrial pathway activation and induction of nuclear clusterin expression, *Cancer letters* 2010, 295, 44–53.
14. **Chen C. H., Bushuk W.** Nature of proteins in triticale and its parental species: I. solubility characteristics and amino acid composition of endosperm proteins. *Canadian Journal of Plant Science*, 1970, 50(1): 9-14.
15. **Capozzi V., Pasquale R., Dueñas, MT., López, P., Spano, G.** Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, 96 (6): 1383–1394. doi:10.1007/s00253-01
16. **Dinelli G, Bregola V., Bosi S, Fiori J., Gotti R., Simonetti E, Trozzi C., Leoncini E., Prata C, Massaccesi L., Malaguti M., Quinn R, Hrelia S.** Lunasin in wheat: A chemical and molecular study on its presence or absence, *Food chemistry*, 2014 May 15;151:520-525.
17. **Dzirkale Z, Rumaks J, Svirskis S, Mazina O, Allikalt A, Rinken A, Jekabsons K, Muceniece R, Klusa V.** Lunasin-induced behavioural effects in mice: focus on the dopaminergic system. *Behavioural Brain Research* 2013, 1;256:5-9.
18. **De Assis S, Hilakivi-Clarke L.** Timing of dietary estrogenic exposures and breast cancer risk. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006;1089:14-35.
19. **de Kok, T.M.; van Breda, S.G. & Manson, M.M.** (2008). Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. *European Journal Nutrition*, 2008, 47, Suppl. 2, 51-59, ISSN 1436-6207.
20. **de Lumen, B.O.** Lunasin: A cancer preventive soy peptide. *Nutrition Reviews*, 2005, 63, No. 1, 16-21, ISSN 0029-6643.
21. **de Mejia E.G. , Vasconez M., de Lumen B.O., Nelson R.** Lunasin concentration in different soybean genotypes, commercial soy protein, and isoflavone products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52, 5882-5887.

22. **de Mejia E.G., Dia V.P.** Lunasin and lunasin-like peptides inhibit inflammation through suppression of NF-kB pathway in the macrophage, *Peptides* 2009, 30, 2388–2398.
23. **Galvez AF, Chen N, Macasieb J, et al.** Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibit acetylation. *Cancer Research*, 2001;61:7473–7478.
24. **Galvez, A.** Identification of Lunasin as the Active Component in Soy Protein Responsible for Reducing LDL Cholesterol and Risk of Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2012, 126: A10693.
25. **García-Nebot M.J., Recio I., Hernández-Ledesma B.** Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells, *Food and Chemical Toxicology*. 2014, 65, 155-161.
26. **Grauda D., Strazdiņa V., Bleidere M., Žagata K., Rashal I.** Use of doubled haploids in cereal breeding in Latvia. *Diversity in Plant Breeding and Agriculture: Strategies for Healthy Lifestyle*. 2012. Talsi, Latvia, May 30-June 1, pp. 16-17.
27. **Helferich, WG.; Andrade, JE.; Hoagland, MS.** Phytoestrogens and breast cancer: a complex story. *Inflammopharmacology*. 2008; 16 (5): 219–226.
28. **Heng Zhang, Fang Lan, Yupeng Shi, Zhi-gang Wan, Zhen-feng Yue, Fang Fan, Yan-kui Lin, Mu-jin Tang, Jing-zhang Lv, Tan Xiao, Changqing Yi,** A “three-in-one” sample preparation method for simultaneous determination of B group water-soluble vitamins in infant formula using VitaFast® kits, *Food Chemistry*, 2012, 153, 371-337.
29. **Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO.** Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides*. 2009; 30(2):426-430.
30. **Hernández-Ledesma, B.; Hsieh C.-C. & de Lumen, B.O. (2011).** Relationship between lunasin’s sequence and its inhibitory activity of histones H3 and H4 acetylation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2011, 55, No. 7, 989-998, ISSN1613-4125.
31. **Horrigan L., Lawrence R.S., Walker P.** How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environmental Health Perspectives*, 2002; 110, 445–456.

32. **Jeong HJ, Park JH, Lam Y, de lumen BO.** Characterization of lunasin isolated from soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003; 51: 7901-7906.
33. **Jeong JH, Jeong RL, Jeong JB, Park JH, Cheong Y, de Lumen BO.** The Cancer Preventive Seed Peptide Lunasin From Rye Is Bioavailable and Bioactive. *Nutrition and Cancer* 2009; 61:680 – 686.
34. **Jeong JB, Jeong HJ, Park JH, Lee SH, Lee JR, Lee HK, et al.** Cancer-preventive peptide lunasin from *Solanium nigrum L.* inhibits acetylation of core histones H3 and H4 and phosphorylation of retinblastoma protein (Rb) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007a; 55:10707-10713.
35. **Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS, et al.** The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Letters* 2007b;255:42–48.
36. **Kristofersen, P, Zarina L.** A review of pesticide policies and regulations for urban amenity areas in seven European countries, *Weed Research*, 2008, 48, (3), 201-214.
37. **Legzdiņa L., Gaiķe M., Gaile Z., Bērziņa I.,** Testing results of spring barley variety ‘Rubiola’. In: Development of plant breeding and crop management in time and space, *Programme and Abstracts*, 2008, July 16-18, Priekuli, Latvia, 62.
38. **Liu C.F., Tzu-Ming Pan T.M.** Recombinant expression of bioactive peptide lunasin in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88, N. 1, 177-186.
39. **Magkos F, Arvaniti F, Zampelas A.** Organic food: nutritious food or food for thought? A review of the evidence. *International Journal Food Sciences Nutrition*, 2003;54:357-71.
40. **Magkos F; Arvaniti, F; Zampelas, A.** Organic Food: Buying More Safety or Just Peace of Mind? A Critical Review of the Literature. *Critical reviews in food science and nutrition* 2006;46 (1): 23–56.
41. **Miller EL, Bimbo AP, Barlow SM, Sheridan B** Repeatability and reproducibility of determination of the nitrogen content of fishmeal by the combustion (Dumas) method and comparison with the Kjeldahl method: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 2007,90(1):6-20.
42. **Mitchell R.A.C., Lovegrove A., Shewry P.R.,** Lunasin in cereal seeds: What is the origin?, *Journal of Cereal Science*, 2013, 57(3), 267-269.

43. **Montville J.B., Jaspreet K.C. Ahuja, Carrie L. Martin, Kaushalya Y. Heendeniya, Grace Omolewa-Tomobi, Lois C. Steinfeldt, Jaswinder Anand, Meghan E. Adler, Randy P. LaComb, Alanna Moshfegh, USDA Food and Nutrient** Database for Dietary Studies (FNDDS), 5.0, *Procedia Food Science*, 2013, 2, 99-112.
44. **Nakurte, I., Kirhnere, I., Namniece, J., Saleniece, K., Krigere, L., Mekss, P., Vicupe, Z., Bleidere, M., Legzdina, L., Muceniece, R.** Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L) *Journal of Cereal Science* 2013, 57, 319-324.
45. **Nakurte, I., Klavins, K., Kirhnere, I., Namniece, J., Adlere, L., Matvejevs, J., Kronberga, A. Kokare, A., Strazdina, V., Legzdina, L., Muceniece, R.** Discovery of lunasin peptide in triticale (X *Triticosecale* Wittmack) *Journal of Cereal Science* 2012, 56, 510-514.
46. **Naeem, H.A., Darvey, N.L., Grass, P.W. &** National Dietary Reference Intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B₆, Folate, Vitamin B₁₂, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. *Academy of Sciences. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. "Chapter 8 - Folate"*. 1998.
47. **Piasecka-Kwiatkowska D., Madaj D, Warchalewski J.R.** The biological activity of wheat, rye and triticale varieties, proteins during development of triticale-wheat flour blends. *Cereal Chemistry* 2002, 79: 332-339.
48. **Rossi, A.M.Villarreal, M. Juárez, M.D.Sammán.** Nitrogen Content in Food: a Comparison between the Kjeldahl and Hach Methods. *Journal of the Argentine Chemical Society*, 2004, 92, N. 4/6, 99-108
49. **Scott, MP; Jung, R; Muntz, K; Nielsen, NC).** A protease responsible for post-translational cleavage of a conserved Asn-Gly linkage in glycinin, the major seed storage protein of soybean". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 658–662.
50. **Seber LE, Barnett BW, McConnell EJ, et al** Scalable purification and characterization of the anticancer lunasin peptide from soybean. *PLoS ONE* 7(4): e35409. doi:10.1371/journal.pone.0035409 (4). pp. e35409. 2012.

51. **Singh U., Jambunathan E.** Evaluation of rapid methods for the estimation of protein in chickpea (*Cicer arietinum*, L.) *Journal Science Food Agriculture*, 1980, 31, 247-254.
52. **Stendes selekcijas stacijas mājaslapa:** www.stendesselekcija.lv
53. **Stich, T.M.** Determination of protein covalently bound to agarose supports using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 1990, 191, 343-346.
54. **Stoscheck, CM.** Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 1990, 182: 50-69.
55. **Zhang H., Fang Lan, Yupeng Shi, Zhi-gang Wan, Zhen-feng Yue, Fang Fan, Yan-kui Lin, Mu-jin Tang, Jing-zhang Lv, Tan Xiao, Changqing Yi,** A “three-in-one” sample preparation method for simultaneous determination of B group water-soluble vitamins in infant formula using VitaFast[®] kits, *Food Chemistry*, 2012, 153, 371-337.
56. **Valsts Priekulu laukaugu selekcijas institūta mājaslapa:**
<http://www.priekuliselekcija.lv/?id=d3&n=m&s=1>
57. **Yu Z., Caixia Han, Shu Wang, Dongwen Lv, Guanxing Chen, Xiaohui Li, Guo-Liang Jiang, Yueming Yan** Fast separation and characterization of water-soluble proteins in wheat grains by reversed-phase ultra performance liquid chromatography (RP-UPLC) *Journal of Cereal Science* 2013, 57, 288-294.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs „Lunasīna un proteīnu līmeņu korelācija tritikālē” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Kaspars Antonovičs

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Prof. Ruta Muceniece

Recenzents:

Darbs iesniegts: LU MF dekanātā

Metodiķe: Juta Bārtule

Darbs aizstāvēts maģistru darbu gala pārbaudījuma sēdē

Komisijas sekretāre: Dr. farm. Kristīne Saleniece