

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Téma:

**Studium profilů bílkovin bramboru (*Solanum
tuberosum* L.) s ohledem na vnitřní stavbu hlízy**

Vypracovala: Bc. Ivana Vančurová

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

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

České Budějovice 2010

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta
Katedra rostlinné výroby
Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivana VANČUROVÁ**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Rostlinné biotechnologie**

Název tématu: **Studium profilů bílkovin bramboru (*Solanum tuberosum* L.)
s ohledem na vnitřní stavbu hlízy**

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

Z dostupných literárních pramenů je patrné, že rozložení bílkovinné skladby v hlízách bramboru není homogenní. Nicméně o této problematice není mnoho dostupných informací. Cílem diplomové práce (DP) je proto studium a hodnocení kvantitativních a kvalitativních rozdílů v bílkovinném profilu hlízy s ohledem na její vnitřní stavbu. Analýzám bude podrobena bílkovinná skladba jednotlivých částí hlízy - oblast slupky, korová část, vnitřní a vnější dřev hlízy - v rámci několika vybraných odrůd druhu *Solanum tuberosum* L. s rozdílnými vlastnostmi. DP bude probíhat podle následujícího schématu:

- 1) výběr odrůd jako studijního materiálu;
- 2) příprava vzorků jednotlivých částí hlízy (preparace pletiv, lyofilizace);
- 3) extrakce proteinů z lyofilizovaného materiálu
- 4) kvantifikace bílkovin v jednotlivých částech hlízy
- 5) hodnocení profilů bílkovin v jednotlivých částech hlízy pomocí elektroforesy (SDS-PAGE resp. čipová elektroforesa, či jiné techniky)
- 6) vyhodnocení a zpracování dat, včetně vypracování komentáře k výsledkům a diskuse na základě informací z prací jiných autorů.

Anotace

Cílem diplomové práce je studium a hodnocení kvantitativních a kvalitativních rozdílů v bílkovinném profilu hlízy s ohledem na její vnitřní stavbu. Analýzám byla podrobena bílkovinná skladba jednotlivých částí hlízy – oblast slupky, korová část, vnitřní a vnější dřev hlízy – v rámci vybraných odrůd Tomensa a Westamyl.

Bílkoviny brambor jsou heterogenní, přičemž nejvýznamnější jsou dvě složky patatin a inhibitory proteas. V této diplomové práci bylo zjištěno, že obsah N v sušině je odlišný v různých vrstvách hlízy. Nejvyšší obsah byl naměřen v oblasti slupky a vnitřní dřev hlíz. Dusíkaté látky v sušině jsou u všech naklíčených/nenaklíčených odrůd nejvyšší v oblasti slupky a ve vnitřní dřev hlíz. U nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa je obsah bílkovin v dusíkatých látkách nejvyšší u celého profilu hlízy a to 79,8 %. Naklíčené hlízy odrůdy Tomensa mají bílkovin nejvíce v oblasti slupky 97,8 %. Naklíčená varianta hlíz odrůdy Westamyl má nejvíce bílkovin v dusíkatých látkách v korové vrstvě.

Klíčová slova: bramborová hlíza *Solanum tuberosum* L., proteiny hlíz, dusíkaté látky hlíz

Annatation

The aim of this thesis is the study and evaluation of quantitative and qualitative differences in protein profile of potato tuber with regard internal structure. Were subjected to analysis of protein composition of different parts of the tuber - the rind, cortex, inner and outer medulla tuber – in to potato varieties and Tomensa Westamyl. Potato proteins are heterogeneous, and and two components are most important - patatin and protease inhibitors. In this work it was found that nitrogen content in dry matter is different in different layers of the tubers. The highest content was measured in the skin and inner medulla of tubers. Nitrogen compounds in the dry state are all sprouted / non-sprouted of varieties of skin and the inner medulla of tubers. In potato varieties Tomesa is content of proteins in nitrogen compounds highest - 79,8 %. Sprouted tubers Tomensa varieties have the most protein in the skin 97.8%. Sprouted tuber varieties Westamyl variant has the most protein nitrogen substances in the cortical layer.

Keywords: potato tubers, *Solanum tuberosum* L., tuber protein, crude protein tuber

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Studium profilů bílkovin bramboru (*Solanum tuberosum* L.) s ohledem na vnitřní stavbu hlízy vypracovala samostatně a na základě materiálů uvedených v seznamu použité literatury.

V Českých Budějovicích 2010

Ivana Vančurová

Úvodem bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Janu Bártovi, Ph. D. a také svému konzultantovi Ing. Veronice Bártové, Ph. D. za vedení a odbornou pomoc poskytnutou při zpracování této práce.

Moje díky také patří mé rodině a přátelům.

Děkuji Ivana

Obsah

1	Úvod	7
2	Literární přehled	8
2.1	Brambor hlíznatý (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	8
2.2	Bramborová hlíza	9
2.2.1	Anatomická stavba bramborové hlízy	9
2.2.2	Látkové složení bramborové hlízy	Chyba! Záložka není definována.
2.3	Dusíkaté látky hlíz brambor	13
2.4	Rozložení N-látek v hlízách brambor	14
2.5	Bílkovinný komplex hlíz brambor	15
2.5.1	Patatinový komplex	15
2.5.2	Bramborové inhibitory proteas.....	17
2.5.3	Ostatní bílkoviny	19
3	Cíl	19
4	Materiál a metodika	20
4.1	Materiál	20
4.1.1	Sušina	Chyba! Záložka není definována.
4.2	Metodika	22
4.2.1	Odběr vzorků jednotlivých vrstev hlízy	22
4.2.2	Analýza obsahu celkového dusíku.....	23
4.2.3	Analýza obsahu čistých bílkovin.....	23
4.2.4	Analýza hlízových bílkovin pomocí automatické čipové elektroforézy	25
4.2.5	Statistické zpracování dat	25
5	Výsledky	26
5.1	Hmotnost hlíz.....	26
5.2	Sušina jednotlivých částí.....	26
5.3	Obsah dusíkatých látek a bílkovin v % v DM.....	28
5.3.1	Obsah N látek a bílkovin u nenaklíčené bramborové hlízy odrůdy Tomensa	Chyba! Záložka není definována.
5.3.2	Obsah N látek a bílkovin u nenaklíčené bramborové hlízy odrůdy Westamyl ...	Chyba! Záložka není definována.
5.3.3	Obsah N látek a bílkovin u naklíčené bramborové hlízy odrůdy Tomensa.....	Chyba! Záložka není definována.
5.3.4	Obsah N látek a bílkovin u naklíčené bramborové hlízy odrůdy Westamyl	Chyba! Záložka není definována.
5.4	Zastoupení bílkovin v dusíkatých látkách.....	32
5.5	Analýza bílkovin hlíz pomocí čipové elektroforézy Experion.....	Chyba! Záložka není definována.
5.5.1	Průběh čipové elektroforézy Experion	39
5.6	Statistické zpracování	40
5.6.1	Základní statistika ANOVA.....	40
5.6.2	Variance components	41
6	Diskuze	45
7	Závěr	48
8	Seznam použité literatury	49
9	Přílohy	54

1. Úvod

Historie pěstování brambor je již dávno spojena s kulturou člověka – uplatnění druhu *Solanum* jako hlavní potraviny obyvatel And bylo prokázáno již 2000 let před příchodem Španělů. Na území Čech jsou zaznamenány zápisy o polním pěstování brambor až z poloviny 17. století.

Okopaniny mají nízký obsah sušiny, jen 10 – 30 %. Většinou jsou producenty sacharidů (cukr, škrob, inulin), které se jako zásobní látky ukládají ve zdužnatělých rostlinných orgánech (stoncích, oddencích, kořenech).

Význam dusíkatých látek včetně bílkovin je pro jejich poměrně nízký obsah v čerstvé hmotě konzumentem často opomíjen. Bílkoviny jsou však významnou složkou bramborové hlízy i přes jejich nízkou koncentraci.

Bílkoviny brambor zauímají specifické postavení mezi rostlinnými bílkovinami pro svou vysokou nutriční hodnotu, složení aminokyselin, specifické biologické aktivity jednotlivých složek a v neposlední řadě i pro možnost využití jejich pěnivých a emulgačních vlastností. Bílkoviny brambor jsou heterogenní, přičemž nejvýznamnější jsou dvě složky – patatin a inhibitory proteas.

Hlízy kulturních genotypů bramboru (*Solanum tuberosum* L.) jsou nejen důležitou potravinou, ale také surovinou pro zpracovatelský průmysl na výrobu bramborového škrobu a výrobků z brambor.

2. Literární přehled

2. 1 Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.)

Brambor hlíznatý je botanicky zařazený do rodu lilek (*Solanum* *tournefortii*) a čeledě lilkovitých (Jůzl at al., 2000). Brambor (*Solanum tuberosum* L.), je nejdůležitější hlíznatou plodinou. Roste v mírných klimatických podmínkách a je tedy jedinou hlíznatou plodinou rostoucí mimo tropy. Zaujímá 45 % z celkové světové produkce všech hlíznatých plodin (Hanusová & Čurn, 2007).

Brambory představují nedílnou součást jídelníčku většiny obyvatel Evropy i ostatních světadílů (tabulka 1). Česká republika nepatří celkovou roční spotřebou konzumních brambor na jednoho obyvatele (do 70 kg) ke státům s největší spotřebou, ale úroveň spotřeby se může řadit mezi takové bramborářsky vyspělé země, jako jsou Nizozemí a Německo (Brožková, 2001).

V roce 2008 bylo v ČR podle údajů ČSÚ sklizeno celkem 37 816 ha brambor, z toho v tržním zemědělském sektoru 29 788 ha a v rámci samozásobení domácností 8 028 ha. Celková produkce brambor dosáhla 945,2 tis. t. Zvyšuje se spotřeba brambor zpracovávaných na výrobky a polotovary, zvyšuje se výtěžnost, snižují se skladovací ztráty u prvovýrobců, zpracovatelů a i v celém obchodním řetězci (Žižka, 2009).

V České republice, stejně jako ve většině vyspělých zemích klesá spotřeba syrových brambor ke kuchyňské přípravě a je doplňována vysokou nabídkou polotovarů i hotových bramborových výrobků. Podle předběžných údajů tvoří brambory spotřebované na výrobky a polotovary již 43 % z celkové spotřeby brambor k lidské výživě (Žižka, 2009).

Tab. 1: Spotřeba brambor podle oblasti v roce 2006 (Jaspreet & Lovedeep, 2009).

Světadíl	Populace	Spotřeba brambor	
		Celková spotřeba (t)	Spotřeba na hlavu (kg)
Afrika	905 937 000	12 850 000	14
Asie/Oceánie	3 938 469 000	101 756 000	26
Evropa	739 276 000	71 087 000	96
Latinská Amerika	561 344 000	13 280 000	24
Severní Amerika	330 608 000	19 156 000	58
Svět	6 475 634 000	218 129 000	34

2. 2 Bramborová hlíza

Bramborová hlíza je zkrácený ztlustlý stonek (oddenek), v němž rostlina shromažďuje zásobní látky a stává se důležitým prostředkem vegetativního rozmnožování (Chloupek et al., 2005).

U brambor se již v prvních fázích růstu tvoří v podzemních částech stonku adventní kořeny a stolony. Jako stolony označujeme metamorfované stonky bez chlorofylu (Vokál, 2005).

Hlízy bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) jsou obecně považovány za rostlinný produkt mající význam hlavně v lidské výživě a pro zpracovatelský průmysl (Bárta & Čurn, 2004). Většina hlavních znaků kvality bramborových hlíz je geneticky založena a odrůda je tak nositelem kvality. Podmínky prostředí mohou geneticky fixovaný potenciál kvality různě modifikovat, nicméně ne v takové míře, aby byl vliv odrůdy zcela překryt (Prugar et al., 2008).

2. 2. 1 Anatomická skladba bramborové hlízy

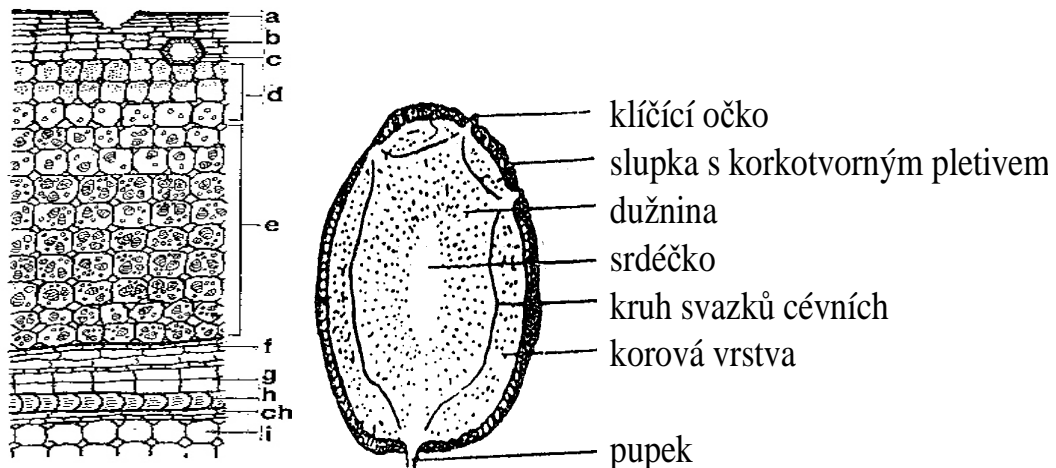
Na hlíze je rozeznatelná část pupková, která souvisí se stolonem a má méně oček. Protilehlá část hlízy se nazývá korunková, má větší množství vrcholových a postranních oček (Hrabě & Komár, 2003). Vnější obal tvoří slupka (periderm), skládající se ze z korkovatělých buněk. Má ochraňovat hlízu před ztrátou vlhkosti a před infekcí plísní. Další vrstva je korová, která má dvě zóny. Pod peridermem leží zóna, která je tvořena malými buňkami chudými na škrob, ale bohatými na bílkoviny. Její tloušťka závisí na velikosti hlízy. Zóna druhá těsně navazuje, sahá až k cévním svazkům a tvoří parenchymální buňky bohaté na škrob (Hrabě & Komár, 2003). Dále je vrstva cévních svazků, která se nazývá prstenec. Je tvořena vnějším lýkem (floémem) a vnitřním floémem (obrázek 1) (Rybáček et al., 1988).

ÚKZÚZ (2005) používá různé metodiky pro zkoušky užitné hodnoty odrůd. Hodnotí podle devítibodové stupnice velikost hlíz, vyrovnanost velikostí, vyrovnanost tvaru (uniformita), hloubky oček, postavení pupku, kvalitu tvaru, barvu dužniny (bílá, krémová, světle žlutá, tmavě žlutá, červená, červenostrakatá, modrá, modrostrakatá) pevnost slupky, barvu slupky, hladkost slupky a tvar hlíz.

Tvar bramborových hlíz byl stanoven poměrem délky hlíz k jejich šířce x 100. Lze tak rozeznávat kulovitý tvar hlízy (index do 109), krátce oválný (110-129), oválný

(130-149), dlouze oválný (150-169), dlouhý (170-199), velmi dlouhý (200 a více) (Prugar et al., 2008). Mareček et al., (1994) uvádí tvar rohlíčkovitý, dlouze oválný, ledvinovitý, kulovitooválný a kulovitý. Na cévní svazky navazuje vnější a vnitřní dřev. Je tvořena 0,1-0,2 mm velkými parenchymálními buňkami (Rybáček et al., 1988).

Obr. 1: Řez hlízou (Rybáček et al., 1988):



a – zkorkovatělé buňky slupky (periderm), b – korkotvorné kambium (felogen), c – neživá buňka v korkové vrstvě, d - vnější korková vrstva, e – vnitřní korová vrstva, f – vnější lýko (felogen), g – kambium, h – dřevní část (xylém), ch – vnitřní lýko, i – vnější dřev (dužina), j – vnitřní dřev, k – korová vrstva, l – kruh cévních svazků, m – očko, o – pupeny, pupek

2. 2. 2 Látkové složení bramborové hlízy

Hodnota hlíz je dána především jejich chemickým složením (tabulka 2), které z nich vlastně vytváří potravinu a surovinu (Vokál, 2005).

Hlízy bramboru představují rostlinný produkt s vysokým obsahem škrobu (až 26 % v čerstvé hmotě). Hlavní látkou obsaženou v hlízách je však voda, která kolísá v rozmezí 70 – 80 % i více čerstvé hmoty (Prugar et al., 2008). Hlízy nedozralé mají více vody a bílkovin a méně škrobu, než hlízy zralé (Hrabě & Komár, 2003).

Další energetickou složkou bramborové hlízy jsou dusíkaté látky. Obvykle je uváděna střední hodnota obsahu dusíkatých látek v čerstvé hmotě hlíz cca 2 %, tzn. kolem 10 % v sušině (Debre & Brindza, 1996). Obsah tuku v hlízách

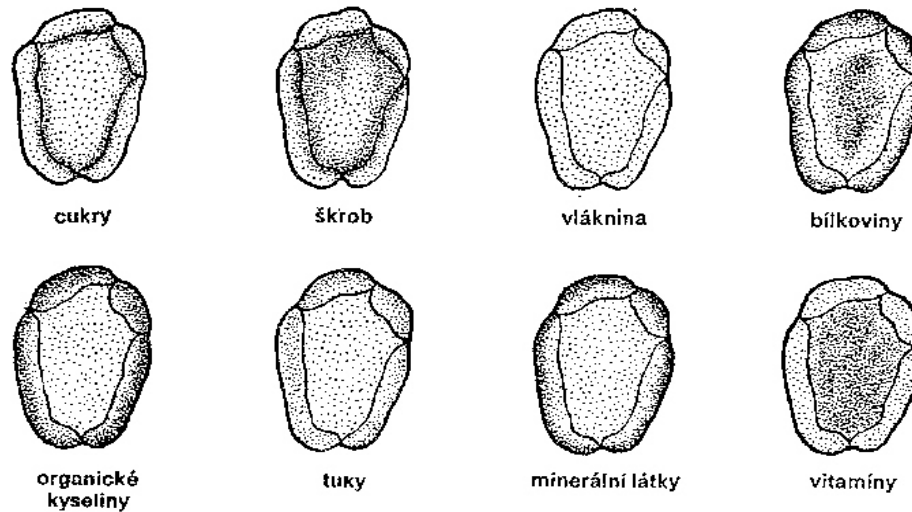
je velmi nízký (0,1 % v původní hmotě) a prakticky neovlivňuje jejich energetickou bilanci (Vokál et al., 2003).

Tab. 2: Chemické složení brambor (Jaspreet & Lovedeep, 2009).

Složka	Obsah v %
Sušina	15-28 %
Škrob	12,6-18,2 %
Glukosa	0,01-0,6 %
Fruktosa	0,01-0,6 %
Sacharosa	0,13-0,68 %
Vláknina	1-2 %
Lipidy	0,075-0,2 %
Bílkoviny	0,6-2,1 %
Asparagin	110-529 mg . 100g ⁻¹
Glutamin	23-409 mg . 100g ⁻¹
Prolin	2-209 mg . 100g ⁻¹
Ostatní Aminokyseliny	0,2-117 mg . 100g ⁻¹
Polyfenoly	123-441 mg . 100g ⁻¹
Karotenoidy	0,05-2 mg . 100g ⁻¹
Tokoferoly	až 0,3 mg . 100g ⁻¹
Thiamin B1	0,02-0,2 mg . 100g ⁻¹
Riboflavin	0,01-0,07 mg . 100g ⁻¹
Vitamin B6	0,13-0,44 mg . 100g ⁻¹
Vitamin C	8-54 mg . 100g ⁻¹
Vitamin E	~ 0,1 mg . 100g ⁻¹
Kyselina listová	0,01-0,03 mg . 100g ⁻¹
Dusík	0,2-0,4 %
Draslík	280-564 mg . 100g ⁻¹
Fosfor	30-60 mg . 100g ⁻¹
Kalcium	5-18 mg . 100g ⁻¹
Magnesium	14-18 mg . 100g ⁻¹
Železo	0,4-1,6 mg . 100g ⁻¹
Zinek	~ 0,3 mg . 100g ⁻¹
Glykoalkaloidy	< 20 mg . 100g ⁻¹

Jednotlivé složky jsou v hlíze nerovnoměrně rozloženy. Popeloviny, tuk, organické kyseliny, alkaloidy se nacházejí hlavně v korové vrstvě, vláknina ve slupce, cukry v oblasti cévních svazků, N-látky pod slupkou, škrob po obou stranách cévních svazků (kambiálního kruhu), což je viditelné na obrázku 2.

Obr. 2: Schéma přibližného rozložení hlavních látek v bramborové hlíze na podélném řezu (Rybáček et al., 1988; Prugar et al., 2008; Zrůst, 2004)



Škrob plní v rostlinném organismu funkci hlavní zásobní látky, neboť je pohotovou zásobou glukosy (Velíšek et al., 1999). V buňkách hlíz brambor je uložen v podobě micel, zvaných škrobová zrna. Bramborové škroby obsahují lasturovitá škrobová zrna o různé velikosti, od 10 – 100 μm , ale i větší (Hoover, 2001).

Škrob brambor je složen ze dvou komponent – amylosy a amylopektinu, jejichž základní stavební jednotkou je D – glukosa (Prugar et al., 2008). Amylopektin je hlavní složka škrobu v obsahu 70 – 80 % (Hoover, 2001; Yusuph et al., 2003) bez ohledu na velikost granulí (Noda et al., 2005). U bramborového škrobu je uváděn poměr mezi amylosou a amylopektinem 1:4, i když někteří mají až 33 % zastoupení amylosy (Hasse & Plate, 1996).

V rámci odrůdy kolísá obsah škrobu podle velikosti hlíz. Malé hlízy mají nízký obsah škrobu. Avšak přerostlé a nezralé hlízy mají rovněž nižší obsah škrobu (Zrůst, 2004).

Hlízy dále obsahují tuky a organické kyseliny. Minerální látky představují převážně bazické prvky (K, P, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu aj.). Nejvýznamnějším prvkem je draslík (Navarre et al., 2009). Přítomnost draslíku v hlíze omezuje výskyt černání po uvaření i enzymatické zabarvení vyskytující se při mechanickém poškození hlíz. Také hraje roli při vytváření celkové chuti hlíz (Rybáček et al., 1988). Obsah draslíku se zvyšuje v průběhu celého vegetačního období (Lisinka & Leszczynski, 1989).

2. 3 Dusíkaté látky hlíz brambor

Brambory jsou řazeny k plodinám s nízkým obsahem dusíkatých látek a bílkovin ve sklizňovém produktu, avšak významně zauímají postavení v hodnocení celkové produkce dusíkatých látek na jednotku plochy (Bárta, 2002). Nejdůležitějším podílem komplexu dusíkatých látek je tzv. čistá bílkovina, která patří mezi nejhodnotnější bílkoviny rostlinného původu vůbec (Vokál et al., 2003).

Vedle aminokyselin, které jsou vázány v bílkovině se v bramborové hlíze vyskytují i volné aminokyseliny. Jedná se o glutamovou a asparagovou kyselinu, a v neposlední řadě jejich amidy glutamin a asparagin (Zrůst, 2004). Významnou složkou dusíkatého komplexu tvoří dusičnany. Obsah v bramborách není vysoký, představuje zhruba 4 % celkového dusíku, je však svým dopadem v potravinářské sféře významný. Obsah dusičnanů Míča (1986) je ovlivněn především prostředím (z 85,2 %) a podstatně méně odrudou (z 5,4 %). Podle Zákona č. 110/1997 Sb. O potravinách, je nejvyšší přípustné množství dusičnanů u raných brambor (do 15.7.) 500 mg.kg⁻¹ původní hmoty a po tomto datu pouze 300 mg.kg⁻¹ (Pulkrábek, 2007). Komplex dusíkatých látek je tvořen mnoha sloučeninami. Obsah jednotlivých sloučenin – frakcí je uveden v tabulce 3 (Míča & Vokál, 1997).

Tab. 3: Složení dusíkatých látek (Míča & Vokál, 1997).

N-frakce	Celkový N v %
A-bílkovinný dusík	50 – 60
B-rozpustný dusík	50 – 40
1. anorganický dusík	4
Dusičnanový	1
Dusitanový	Stopy
Amoniakální	3
2. anodický dusík	23
Asparagin	13
Glutamin	10
3. ostatní	23
Aminokyseliny	15
Basický dusík	8

2.4 Rozložení N-látek v hlízách brambor

V hlíze je dusík rozložen nestejně, v opačném poměru ke škrobu. Nejbohatší na dusík jsou buňky pod slupkou a střední hlízy. Rozložení dusíkatých látek v bramborové hlíze je v tabulce 4. Kolem kambiálního kruhu v parenchymu, který hromadí škrob, je dusíku nejméně (Rybáček at al., 1988). Obsahy dusíkatých látek a jejich jednotlivých složek se v hlízách mění v průběhu vegetace.

V období zralosti hlíz dochází k mírnému zvýšení obsahů jednotlivých složek proti stavu z 90. dne po vzejití. Hlízy menší velikosti obsahují větší množství dusíkatých látek, což i potvrzuje vztah mezi obsahem bílkovin a hmotností hlíz (Bárta & Bártová, 2007).

Tab. 4: Rozložení dusíkatých látek v hlízách brambor (Míča & Vokál, 1997; Zrůst, 2004)

Hmotnost každé vrstvy z celkové hmotnosti hlíz v %	Slupka	Korová vrstva	Vnější dužina	Vnitřní dužina
	5,88	33,01	35,39	25,67
Sušina každé vrstvy %	15,00	21,07	22,20	17,20
Celkový dusík	3,540	1,527	1,680	2,209
Bílkovinný dusík	1,257	0,562	0,568	0,622
Rozpuštěný dusík	2,700	1,369	1,581	2,157
Celkový amidický dusík	1,580	0,465	0,617	1,041
Dusík asparaginu	1,191	0,322	0,383	0,634
Dusík glutaminu	0,391	0,124	0,240	0,949
Basický dusík	0,423	0,338	0,375	0,390

Slupka brambor obsahuje bílkoviny, které spadají do tří hlavních funkčních kategorií. Je to proliferace buněk, obecný metabolismus a stresová odpověď. Z celkového počtu zjištěných bílkovin činily 63 % bílkoviny odpovídající stresové odpovědi (Barel & Ginzberg, 2008).

Na variabilitě obsahu bílkovin v hlízách má největší vliv genotyp a hnojení dusíkem. V menší míře je to ovlivnění ročníkovými vlivy, stanovištěm, způsobem pěstování, charakterem půdy, zdravotním stavem hlíz a délkou skladování (Bárta & Bártová, 2007).

2. 5 Bílkovinný komplex hlíz brambor

Význam dusíkatých látek včetně bílkovin je pro jejich poměrně nízký obsah v čerstvé hmotě konzumentem často opomíjen. Hlízy brambor nejsou všeobecně považovány za bílkovinný zdroj potravy. Příjem bramborových bílkovin v potravě průměrného obyvatele ČR stejně významný nebo i vyšší, než je příjem bílkovin z luštěnin (tabulka 5) (Prugar et al., 2008).

Z nutričního hlediska patří hlízové bílkoviny mezi nejkvalitnější bílkoviny rostlinného původu (Bárta & Čurn, 2004). Nutriční hodnota je určována zejména aminokyselinovou skladbou. Jako limitující jsou v bílkovinách hlíz uváděny sirné aminokyseliny (zejména methionin). Potenciálně je také limitující isoleucin (Ralet et al., 1999). Obsah bílkovin je samozřejmě závislý na odrůdě, podmínkách prostředí doprovázejících pěstování a výživě rostlin (Shewry, 2003). V současné době se využívá genotypový polymorfismus hlízových bílkovin pro identifikaci odrůd brambor nebo při ověřování jejich pravosti v rámci obchodování s bramborami. Bílkoviny jsou nejvíce lokalizované v korové vrstvě hlízy a ve střední části. Loupáním, a hlavně okrajováním je obsah bílkovin v hlíze snižován (Prugar et al., 2008).

Tab. 5: Porovnání příjmu bílkovin spotřebitelem mezi konzumními bramborami a luštěninami (Bárta, 2000; Prugar et al., 2008)

Rostlinný produkt	Obsah bílkovin (g.kg⁻¹ čerstvé hmoty)	Průměrná spotřeba (kg.osoba⁻¹. rok⁻¹)	Příjem bílkovin (g.osoba⁻¹. rok⁻¹)
Bramborové hlízy	10	74-76	759
Luštěniny	cca 200	1,5-2,0	300-400

S rozvojem elektroforetických a chromatografických technik koncem šedesátých let začala být preferována, a v současné době převažuje, klasifikace bílkovin podle molekulové hmotnosti. Na jejím základě lze spektrum hlízových bílkovin členit na tři hlavní skupiny (Pots et al., 1999; Ralet et al., 1999, Bárta & Čurn, 2004):

- Patatin neboli patatinový komplex či rodina patatinových bílkovin
- Bramborové inhibitory proteas
- Ostatní bílkoviny, hlavně bílkoviny s enzymovou účastí na syntéze škrobu

Největší podíl bílkovin hlíz představují patatin a inhibitory proteas (Bárta & Čurn, 2004).

2. 5. 1 Patatinový komplex

Patatin je název pro rodinu imunologicky úzce příbuzných glykoproteinů izolovaných poprvé v roce 1981 Racusenem a Footem pomocí iontovýmenné a afinitní chromatografie (Bárta & Čurn, 2004).

Bílkoviny patatinového komplexu zaujímají 20 - 40 % rozpustných bílkovin bramborových hlíz (Jimenez et al., 2002; Rydel et al., 2003), byl však uveden i vyšší podíl, až 60 % (Pots, 1999).

V nativní formě je považován za dimer s přibližnou molekulovou hmotností 39 - 44 kDa (Racusen et al., 1984; Bárta & Čurn, 2004). Aminokyselinová sekvence monomeru čítá 366 aminokyselin (Stiekema et al., 1988). V makromolekule jsou přítomné jak oblasti α -helikální, tak oblasti s β -strukturou (Pots et al., 1999). Sacharidová část u patatinu představuje asi 4 % z celkové hmotnosti makromolekuly (Sonnewald et al., 1989; Pots, 1999).

Pots (1999) uvádí, že pomocí instrumentálních analýz bylo zjištěno, že nativní patatin má cylindrický tvar s průměrem 5 nm a délkou 9,8 nm. Také bylo zjištěno, že strukturní integrita molekuly je zachovávána až do pH 6 a teploty do 28 °C (Pots et al., 1998; Pots et al., 1999). V prostředí pH 5 je terciární struktura patatinu nevratně poškozena precipitací. Teplotní rozmezí 55 – 75 °C způsobuje „rozbalování“ patatinu i ostatních bílkovin hlíz (Koningsveld et al., 2001).

Fyziologické vlastnosti

Patatin je v hlízách brambor považován za hlavní zásobní bílkovinu (Racusen et al., 1980; Rosahl et al., 1986), je uložen v centrálních vakuolách parenchymu buněk (Straetkvern et al., 1999). Proto jsou bílkoviny patatinového komplexu považovány za hlízové bílkoviny, které mají především zásobní funkci (Rosahl et al., 1986). Je však také známo, že vykazují i rozsáhlou enzymovou aktivitu (Racusen & Foote, 1980; Pots, 1999), která se s největší pravděpodobností podílí na obranném systému hlízy proti houbovým patogenům a hmyzím škůdcům (Bárta & Čurn, 2004).

V listech, stoncích a kořenech se patatin oproti vysokému obsahu v hlízách vyskytuje pouze ve stopových množstvích, což je také charakteristické pro zásobní proteiny hlíz (Shewry, 2003). Nejzajímavější je relativně vysoký obsah bílkoviny patatinu

v korové oblasti nevyzrálých hlíz k jejich obsahu v dužině. Zráním se množství patatinu snižuje (Barel & Ginzberg, 2008).

Patatin má v ojedinělých případech též schopnost vyvolat alergické reakce především u kojenců a dětí (Majamma et al., 2001). Tyto alergie se mohou podílet na vzniku atopického ekzému (Schmidt et al., 2002). Alergenicitu patatinu je možné snížit tepelnou úpravou brambor (Seppala et al., 1999). U patatinu bylo též prokázáno, že vykazuje protiplísňové a pesticidní aktivity (Barel & Ginzberg, 2008). Vzhledem ke svým vlastnostem by patatin mohl najít uplatnění v biotechnologii (produkce speciálních acylglycerolů) a v potravinářství (produkce stabilních pěn) (1).

Enzymová aktivita

Skupiny bílkovin fungující v rostlinné obraně se skládají z enzymů, které hrají roli při reakci rostlin k invazi patogenů a syntéze obranných látek (Barel & Ginzberg, 2008).

Patatinu byla připsána aktivita enzymu acyltransferasa (Jimenez et al., 2001) a také aktivita kyselého β -1,3-glukanasy (Tonón, 2001). Potvrzena je také aktivita fosfolipasy (Senda et al., 1996) a β -1,2-xylosidasy (Peyer et al., 2004). Stárnutí hlíz kromě snížení syntézy bílkovin a zvýšení vnímavosti proteolýzy bílkovin, může přispět ke ztrátě schopnosti syntetizovat inhibitory proteas a tak proteinového katabolismu (Kumar et al., 1999).

2. 5. 2 Bramborové inhibitory proteas

Kvantitativně neméně významnou skupinou bílkovin bramborových hlíz jsou inhibitory proteas. Proteolytické enzymy katalyzují štěpení molekuly bílkoviny na menší řetězce a posléze až na jednotlivé aminokyseliny (Hraška et al., 2006).

Inhibitory proteas tvoří 50 % rozpustných bílkovin v hlízách (Pouvreau et al., 2001, 2003). Proteasy hrají klíčivou roli v růstu rostlin a vývojových procesech, jako je klíčení, při diferenciaci buněk, senescenci a při programované smrti (Palma et al., 2002 & van der Hoorn, 2008). Syntetizovány jsou buď konstitutivně nebo jako odpověď na vzniklé poškození či probíhající napadení (Carliny et al., 2002).

Inhibitory proteas mohou zaujímat v rostlinách celou řadu odlišných rolí. Mají funkci při ukládání bílkovin během chloroplastové ontogeneze (Prins et al., 2008), dusíku během klíčení (Valdrés-Rodriguéz et al., 2007) a stárnutí listů (Etienne et al., 2007).

Pusztai (1972) poprvé naznačil možnost, že inhibitory proteas jsou přítomné v hlízách bramboru v relativně vysokém množství i bez předchozí indukce poraněním či patogenem a tato jejich přítomnost nasvědčuje tomu, že mohou sloužit i jako zásobní proteiny.

Podle nového systému klasifikace je dělení inhibitorů proteas do čtyř skupin (tabulka 8) rozděleno podle molekulové hmotnosti, stavby molekuly, hodnoty isoelektrického bodu a počtu disulfidických můstků v molekule (Hanusová & Čurn, 2007)

Tab. 6: Rozdělení inhibitorů proteas podle hlavní a specifické klasifikace (Hanusová & Čurn, 2007).

Skupina	MW (kDa)	Podjednotka	Inhibované enzymy
<i>Třída inhibitorů serinových proteas</i>			
Inhibitory Kunitzova typu	21-23	1	trypsin, chymotrypsin
Inhibitory I z bramboru	40	4-5	trypsin, chymotrypsin, subtilisin
Inhibitory II z bramboru	20-21	2	trypsin, chymotrypsin, elastasa
<i>Třída inhibitorů cysteinových proteas</i>			
Inhibitory Kunitzova typu	20-21	1	trypsin, papain, kathepsin, pathepsin
Multicystatiny	85	1	papain
<i>Třída inhibitorů asparágových proteas</i>			
Inhibitory Kunitzova typu	20-22	1	pathepsin
<i>Třída inhibitorů metalloproteas</i>			
Inhibitor karboxypeptidasy bramboru	4	1	karobxypeptidasa

Jedním z nejznámějších inhibitorů proteas brambor je inhibitor Kunitzovova typu o velikosti 22 kDa, který je v hlízách syntetizován jako preprotein

o velikosti $M_r = 27$ kDa (Pouvreau, 2003). Přítomnost preproteinové formy byla nejpočetněji v poraněných listech (lokální odpověď) a dále také v neporaněných listech (systemická odpověď) (Hanusová & Čurn, 2007).

Inhibitory proteas, které se v rostlinách akumulují jako odpověď na poranění, byly již v minulosti charakterizovány (Hraška et al., 2002). Usuzuje se, že produkce inhibitorů proteas je řízena oktadekanovou dráhou, kterou je mimo jiné zprostředkován rozklad kyseliny linoleonové na mnoho výsledných produktů, z nichž jedním je kyselina jasmonová. Tyto pochody ve svém důsledku vedou k indukci exprese genů kódující inhibitory proteas (Hraška et al., 2002).

2. 5. 3 Ostatní bílkoviny hlíz brambor

Dle Pots (1999) jsou k tzv. ostatním bílkovinám hlíz brambor řazeny bílkoviny, které nelze na základně podobných vlastností a shodné imunologické odpovědi přiřadit k bílkovinám patatinového komplexu či se jedná o bílkoviny, které nevykazují schopnosti inhibovat proteasy, a nelze je zařadit k inhibitorům proteas.

K ostatním bílkovinám hlíz brambor jsou řazeny bílkoviny s vyšší molekulovou hmotností (přibližně nad 45 kDa). K nejčastějším patří hlízový lektin, polyfenoloxidasy o velikosti 60 a 69 kDa, protein kinasa, enzymy s účastí na syntéze škrobu a fosforylasové isoenzymy (Koningsveld, 2001).

3. Cíl práce:

Cílem diplomové práce je studium a hodnocení kvantitativních a kvalitativních rozdílů v bílkovinném profilu hlízy s ohledem na její vnitřní stavbu. Analýzám byla podrobena bílkovinná skladba jednotlivých částí hlízy – oblast slupky, korová část, vnitřní a vnější dřeň hlízy – v rámci několika vybraných odrůd druhu *Solanum tuberosum* L. s rozdílnými vlastnostmi.

4. Materiál a metodika

4. 1 Materiál

Na analýzy byly použity vyzrálé, mechanicky nepoškozené a zdravé hlízy. Brambory byly vypěstované za standardních postupů na pokusném pozemku JU zemědělské fakulty v Českých Budějovicích v roce 2008. Pozemek se nachází v oblasti s průměrnou roční teplotou 7,8 °C s průměrným ročním úhrnem srážek 620 mm a s nadmořskou výškou 383 m. n. m.

Na pokus byly vybrány bramborové hlízy odrůd Tomensa a Westamyl (tabulka 7, 8). Až do zpracování byly hlízy uskladněné za vhodných podmínek 4-5 °C při odpovídající relativní vlhkosti (vyšší, než 95 %).

Tomensa

Tab. 7: Popis bramborové odrůdy Tomensa (Novák, 2002)

Registrace	1995
<i>Hospodářský význam</i>	
Vegetační doba	Raná až poloraná
Hlízy	Stření, deformované, nárůst pomalý, počet pod trsem střední až nižší
Výnos	Nižší
Škrobnatost	Vysoká až velmi vysoká
Užitkový směr	Vhodná pro zpracování na lupínky a škrob
Nať	Počáteční růst velmi rychlý
<i>Morfologické znaky</i>	
Rostlina	Středně vysoká, vzpřímená; list středně velký až velký; stonek středně silný; květ bílý
Hlízy	Kulovité, slupka žlutá, dužina světle žlutá
Klíček	Kuželovitý, intenzivně modrofialový

Westamyl

Tab. 8: Popis bramborové odrůdy Westamyl (Novák, 2002)

Registrace	2001
<i>Hospodářský význam</i>	
Vegetační doba	Polopozdní
Hlízy	Středně velké, nárůst pomalý, počet pod trsem střední, méně odolné mechanickému poškození
Výnos	Nízký
Škrobnatost	Vysoká
Užitkový směr	Vhodná pro zpracování na lupínky a škrob
Nat'	Počáteční růst rychlý
<i>Morfologické znaky</i>	
Rostlina	Středně vysoká až vysoká, polovzpřímená; list středně velký až velký; květ bílý, středně velký
Hlízy	Krátce oválný s mělkými až středně hlubokými očky, slupka žlutá, hladká až středně hladká, barva dužiny žlutá
Klíček	Kulovitý, červenofialový

4. 2 Sušina

Z bramborových hlíz byl odříznut tenký plátek z celého profilu hlízy. Vzorek v čerstvém stavu byl zvážen na analytických vahách a vysušen při teplotě -50 °C a tlaku 40 mBar po dobu 48-72 hod. Po vysušení byl vzorek opět zvážen. Z rozdílu hmotností byla vypočítaná sušina.

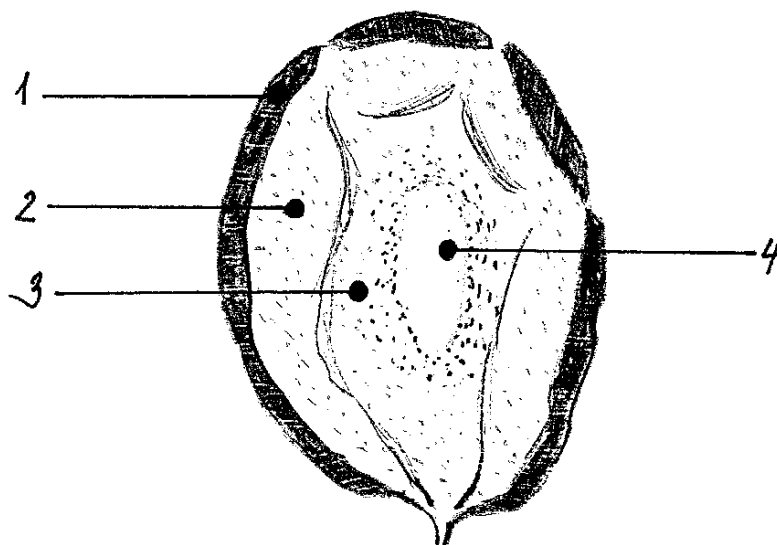
Sušina se prováděla u nenaklíčených hlíz odrůd Tomensa a Westamyl a u naklíčených hlíz odrůd Tomensa a Westamyl. Byla prováděna v pěti opakování z nichž se vypočítal průměr.

4.2 Metodika

4. 2. 1 Odběr vzorků jednotlivých vrstev hlízy

Hlízy byly podélně rozříznuty od vrcholové části směrem k pupkové části hlízy na dvě půlky. Z každé poloviny se udělal celoprofilový plátek o velikosti 5 mm. Plátek z jedné poloviny byl ihned po ukrojení rozkrájen na proužky a přenesen do označené dózy, zmražen a lyofilizován. Plátek z druhé poloviny byl preparován z vrstev (obrázek 3): slupka + část pod slupkou, korová část, vnější část, vnitřní dřev; srdéčko, celý profil hlízy a klíčky. Vzorky byly následně vysušeny (lyofilizace) a připraveny k vyhodnocení pomocí čipové elektroforézy Experion.

Obr. 3: Nákres odběr vzorků z hlízy

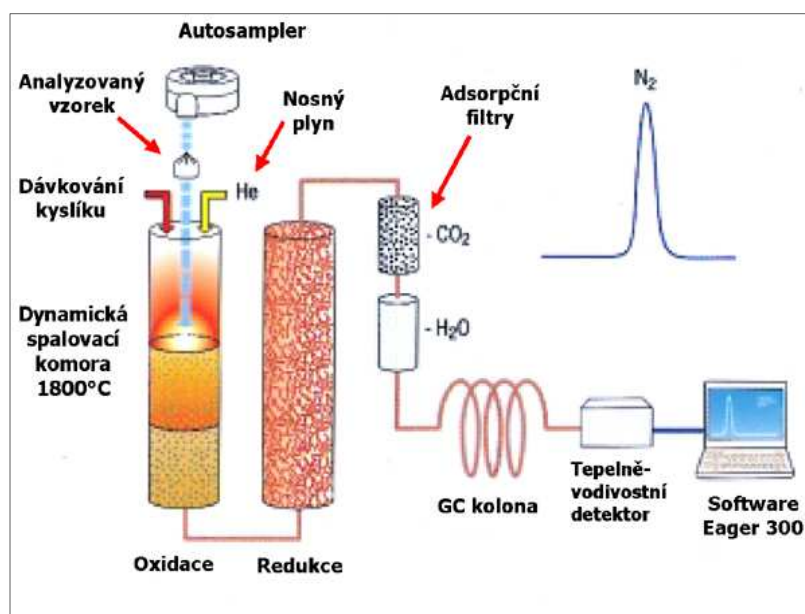


1 – korová vrstva, 2 – vnější dřev, 3 – vnitřní dřev, 4 – srdéčko

4. 2. 2 Analýza obsahu celkového dusíku

Obsah dusíku v sušině hlíz byl stanoven modifikovanou Dumasovou metodou (Dynamic Flash Combustion technique) prostřednictvím elementárního analyzátoru Flash EA 1112 (schéma na obr. 4). Provedena byla dvě opakování s navázkou vzorku 25 mg.

Obr. 4: Pracovní schéma znázorňující analýzu na elementárním analyzátoru dusíku



4. 2. 3 Analýza obsahu čistých bílkovin

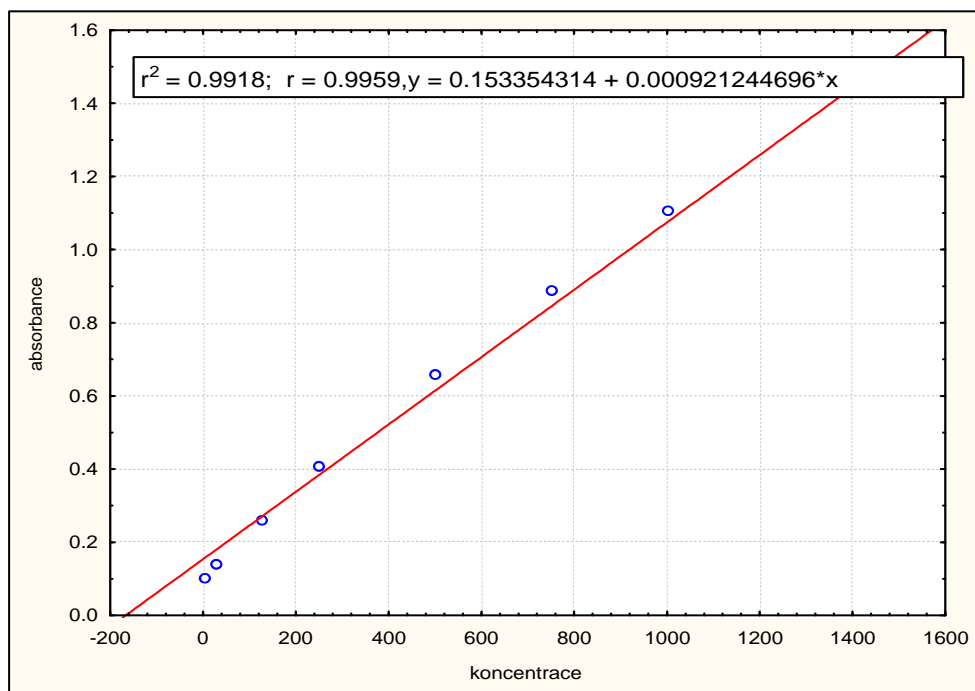
Extrakce bílkovin pro jejich kvantifikaci

K 200 mg homogenizovaného hlízového materiálu bylo přidáno 2 ml extrakčního pufru (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS). Extrakce probíhala po dobu 4 hodin při teplotě 4°C. Po centrifugaci (10 min, 9000g, 4 °C), byl čistý supernatant přenesen do nové mikrocetriguační zkumavky. Tento extrakt sloužil k následné kvantifikaci hlízových bílkovin.

Kvantifikace bílkovin v extraktu

Vlastní kvantifikace bílkovin v extraktu byla provedena pomocí kitu *BCA Protein Assay Kit*. Jedná se o metodu, která je založena na kolorimetrickém stanovení obsahu čistého proteinu pomocí bicinchoninové kyseliny (bicinchoninic acid; BCA), kdy reakcí s proteinem dochází k redukci Cu^{2+} iontů na Cu^{1+} . Kationt Cu^{1+} je reagentem, který je pomocí BCA kolorimetricky detekován. Pracovní rozpětí koncentrace proteinu ve vzorku je u této metody 20 – 20 000 $\mu\text{g/ml}$. Příprava standardu, vzorku a vlastní měření bylo provedeno dle instrukcí výrobce kitu (Pierce, BCA Protein Assay Kit Instructions). Pro kalibraci (viz obrázek 5) byl použit hovězího sérového albuminu (BSA).

Obr. 5: Kalibrační křivka na základě, které byla stanovena koncentrace bílkovin v extraktech hlízového materiálu



4. 2. 4 Analýza hlízových bílkovin pomocí automatické čipové elektroforézy Experion

Systém automatické čipové elektroforézy Experion užívá kombinaci inovativní technologie mikrofluidní separace „LabChip“ a citlivé fluorescenční detekce vzorku pro provedení rychlé automatické analýzy bílkovin a nukleových kyselin. Analýza bílkovin je prováděna prostřednictvím dodávaného analytického kitu „Experion Pro260 Analysis Kit“ (obrázek 6), který obsahuje proteinový standard (Pro260 Ladder), vzorkový pufr (sample buffer), gelový roztok, fluorescenční barva a centrifugací filtry (Bárta et al., 2009).

Výhodou této metody je velmi nízké množství analyzovaných vzorků a vyšší bezpečnost práce obslužného personálu, protože pro analýzu není potřebný toxický akrylamid v porovnání s přípravou gelů u SDS-PAGE pro hodnocení spektra palatinů či esterasových a preoxidasových izoenzymových systémů (Bárta; et al., 2010). Výhodou je také vysoká míra opakovatelnosti vyhodnocení pomocí specializovaného software.

Obr. 6: Schématické znázornění analytického čipu Experion Pro260 (Bárta et al., 2009)



4. 2. 5 Statistické zpracování dat

Statistické vyhodnocení dat jednotlivých parametrů bylo provedeno pomocí software STATISTICA 6,0 (Stat Soft, Inc., 2001). Používané analýzy byly ANOVA test Tukey HSD, ANOVA faktoriální a jednocestná.

5. Výsledky

5.1. Hmotnost hlíz

Na analýzy byly vybrány hlízy zdravé, mechanicky nepoškozené a vyzrálé. Průměrná hmotnost vybraných hlíz byla od 50 do 65 g.

Průměrná hmotnost hlíz odrůd Tomensa a Westamyl je uvedena v tabulce 9. Průměrná hmotnost s klíčky u odrůdy Tomensa je 53,05 g. Průměrná hmotnost bez klíčků je 50,68 g. U hlíz odrůdy Westamyl byla průměrná hmotnost hlíz s klíčky 57,33 g a průměrná hmotnost bez klíčků 54,84 g.

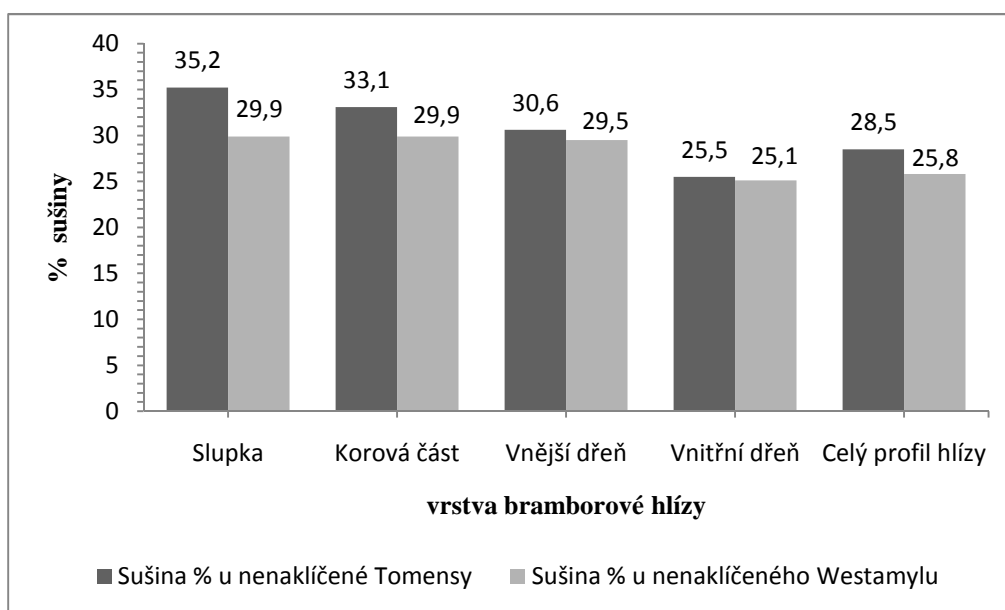
Tab. 9: Průměrné hmotnosti hlíz odrůd Tomensa a Westamyl

Odrůda	Průměrná hmotnost s klíčky (g)	Průměrná hmotnost bez klíčků (g)	Průměrná hmotnost klíčků (g)
Tomensa	53,05	50,68	2,37
Westamyl	57,33	54,84	2,49

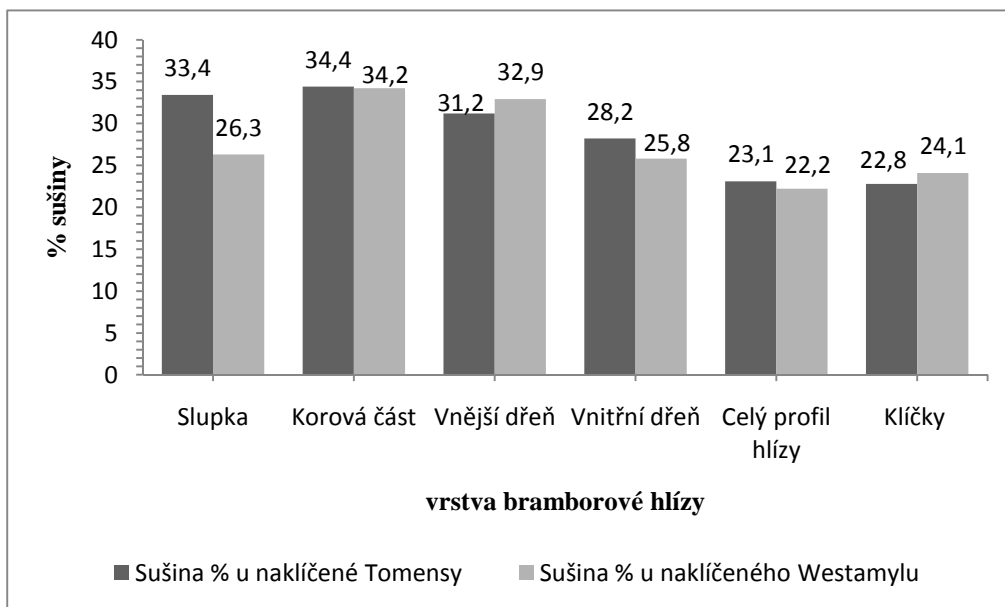
5. 2 Sušina jednotlivých částí

Z výsledků je patrné, že množství sušiny je rozdílné v různých vrstvách bramborových hlíz. Nejvíce sušiny obsahuje slupka a oblast pod ní a korová část u nenaklíčených a naklíčených hlíz odrůd Tomensa a Westamyl. U hlízy odrůdy Tomensa je sušina ve vyšším procentuálním zastoupení, než u hlízy odrůdy Westamyl. Nejnižší obsah sušiny má vnitřní dřev bramborové hlízy obrázek 7 a obrázek 8.

Obr. 7: Průměrný obsah sušiny v % u nenaklíčených hlíz odrůd Tomensa a Westamyl



Obr. 8: Průměrný obsah sušiny v % u naklíčených hlíz odrůd Tomensa a Westamyl



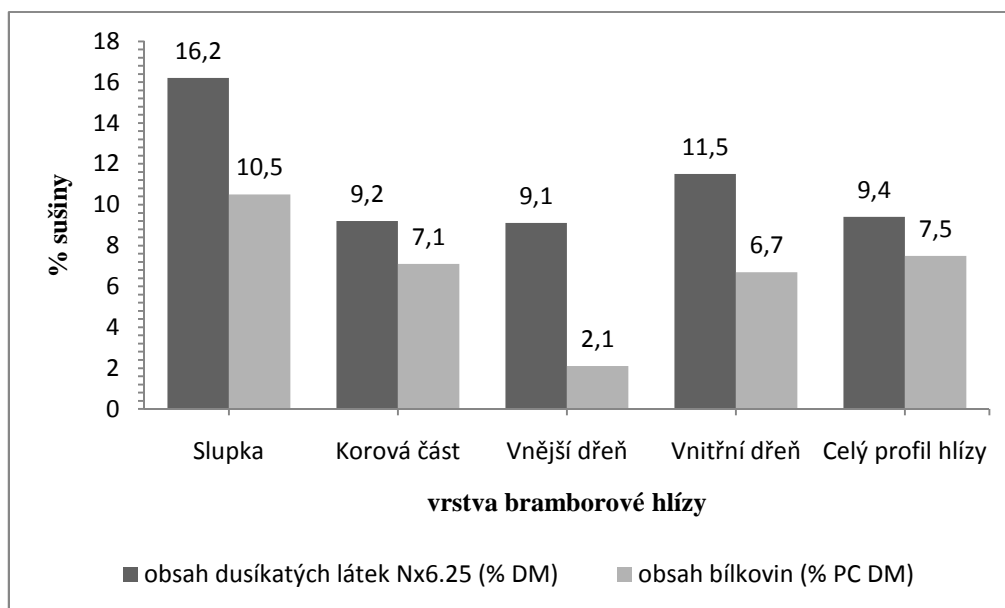
5.3 Obsah dusíkatých látek a bílkovin v sušině

5.3.1 Obsah dusíkatých látek a bílkovin u nenaklíčených bramborových hlíz odrůdy Tomensa

Obsah dusíkatých látek u nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa je rozdílný v různých vrstvách bramborové hlízy. Z výsledků je zřetelné, že nejvyšší obsah dusíkatých látek je v oblasti slupky a ve vnitřní dřevě hlíz. V rozmezí okolo 16 – 12 %. Nejnižší obsah má korová část a vnější dřevě hlíz.

Obsah bílkovin v sušině je nejvyšší jako u dusíkatých látek v oblasti slupky (10,5 %). Vysoký obsah byl také zjištěn u korové části (7,1 %). Nejnižší obsah bílkovin v sušině má vnější dřevě (2,1 %). Výsledky analýz jsou zpracovány do grafů a viditelné na obrázku 9.

Obr. 9: Průměrný obsah dusíkatých látek a bílkovin u nenaklíčených bramborových hlíz odrůdy Tomensa

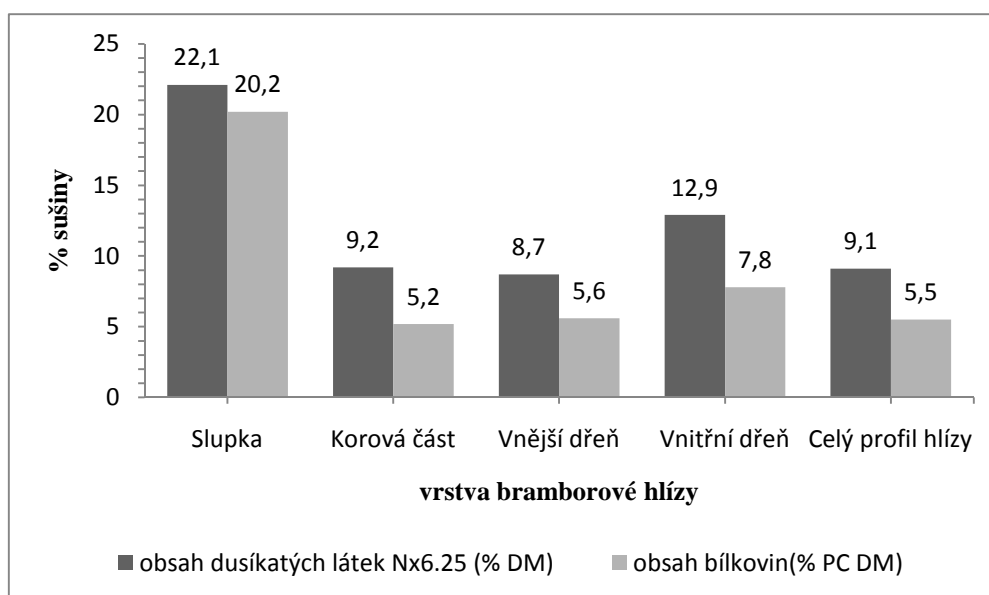


5. 3. 2 Obsah dusíkatých látek a bílkovin u nenaklíčených bramborových hlíz odrůdy Westamyl

Obsah dusíkatých látek je u nenaklíčených hlíz odrůdy Westamyl rozdílný v různých vrstvách bramborové hlízy. Nejvyšší obsah dusíkatých látek je v oblasti slupky hlíz a ve vnitřní dřeni. Nižší obsah dusíkatých látek má korová část, vnější dřeň a celý profil hlíz, jejichž obsah se pohybuje v rozmezí 8,7 – 9,2 %.

Obsah bílkovin v sušině v procentech je nejvyšší v oblasti slupky hlíz a ve vnitřní dřeni hlízy. Nižší obsah má celý profil hlízy, korová část a vnější dřeň, kde jsou hodnoty od 5,2 – 5,6 %. Nejnižší obsah bílkovin je v korové části hlíz (5,2 %). Výsledky jsou viditelné na obrázku 10.

Obr. 10: Průměrný obsah dusíkatých látek a bílkovin u nenaklíčených bramborových hlíz odrůdy Westamyl



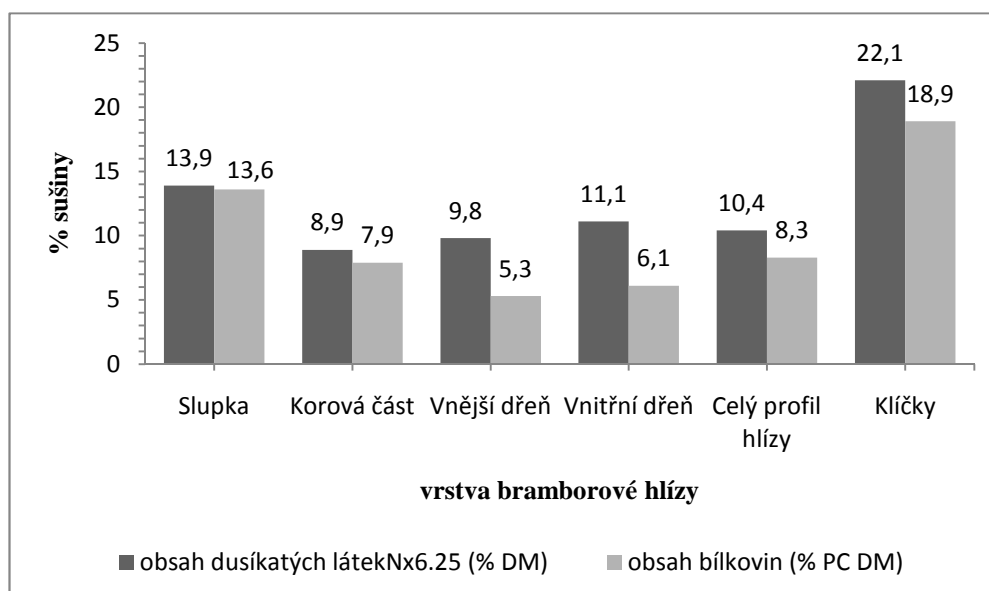
Z obrázků č. 9 a 10 je viditelné, že obsah dusíkatých látek a bílkovin v sušině v různých vrstvách hlízy odrůdy Tomensa a Westamyl je nejvyšší v oblasti slupky a ve vnitřní dřeni hlíz. Celý profil nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa obsahuje 9,4 % dusíkatých látek a u nenaklíčené odrůdy Westamyl to je 9,1 %. Obsah bílkovin v celém profilu nenaklíčených hlíz odrůd Tomensa je 7,5 %. A u nenaklíčených hlíz odrůdy Westamyl 5,5 % bílkovin v sušině.

5. 3. 3 Obsah dusíkatých látek a bílkovin u naklíčených bramborových hlíz odrůdy Tomensa

U naklíčených hlíz odrůdy Tomensa je na obrázku 11 viditelný nejvyšší obsah dusíkatých látek v klíčcích hlíz. Hodnota se pohybuje okolo 22 % v sušině. Nejnižší hodnota byla pozorována u vnější dřeň a korové části hlíz.

Obsah bílkovin je nejvyšší jako u dusíkatých látek u klíčků hlíz, kde se pohybuje okolo 19 % v sušině. Vnější dřeň a vnitřní dřeň patří mezi vrstvy, které mají obsah bílkovin v sušině nejnižší, v rozsahu 5 – 6 %.

Obr. 11: Průměrný obsah dusíkatých látek a bílkovin u naklíčených bramborových hlíz odrůdy Tomensa

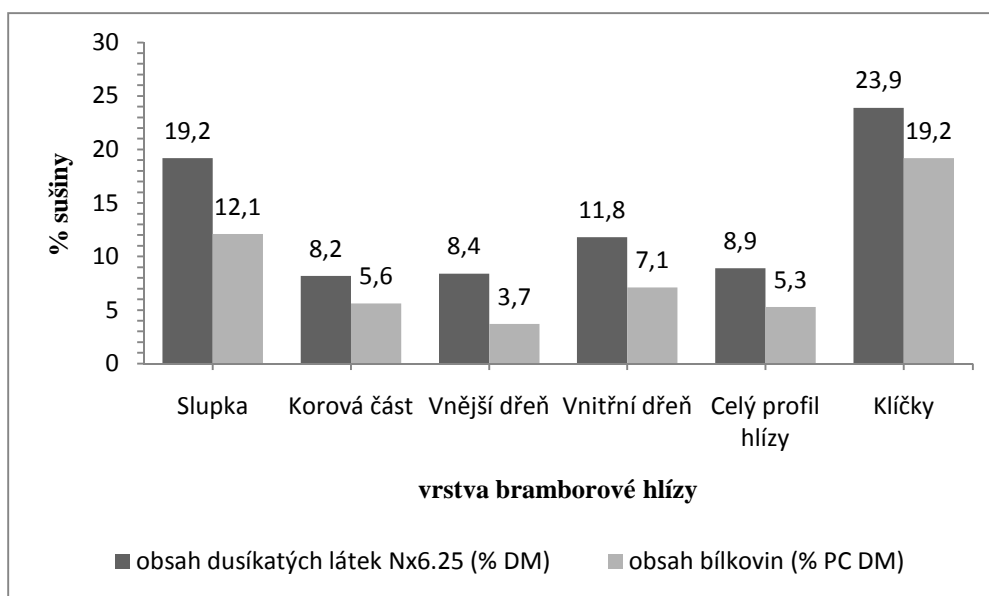


5. 3. 4 Obsah dusíkatých látek a bílkovin u naklíčených bramborových hlíz odrůdy Westamyl

Procentuální obsah dusíkatých látek v sušině je u naklíčených bramborových hlíz odrůdy Westamyl nejvyšší u klíčků hlíz. Nejnižší obsah dusíkatých látek má korová část (8,4 %) spolu s vnější dření (8,4 %).

Procentuální obsah bílkovin je též nejvyšší u klíčků hlíz. Jeho hodnota je okolo 19 % bílkovin v sušině. Nejnižší obsah bílkovin v sušině je u vnější dřeně (3,7 %) a korové části (5,6 %). Obsah celého profilu hlízy je 5,3% a ve vnitřní dření se pohybuje obsah bílkovin okolo 7,1 % (obrázek 12).

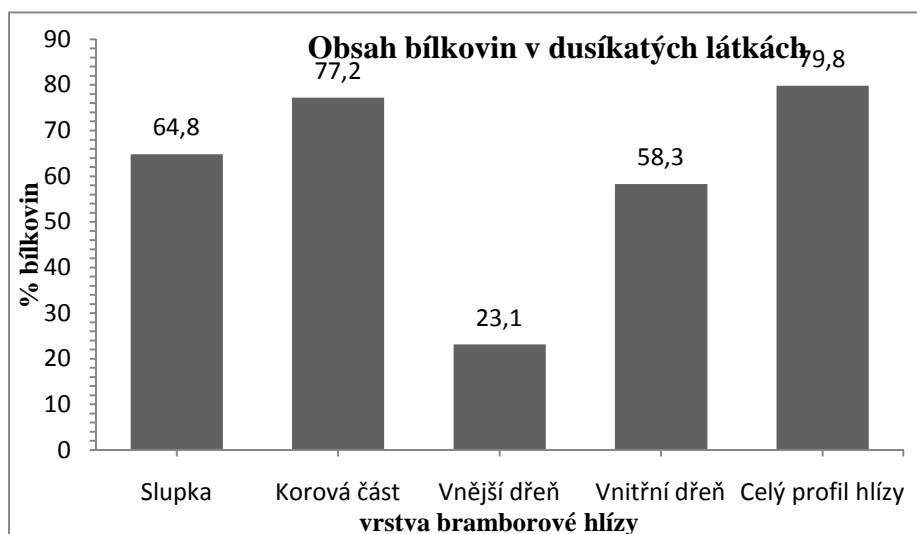
Obr. 12: Průměrný obsah dusíkatých látek a bílkovin u naklíčené bramborové hlízy odrůdy Westamyl



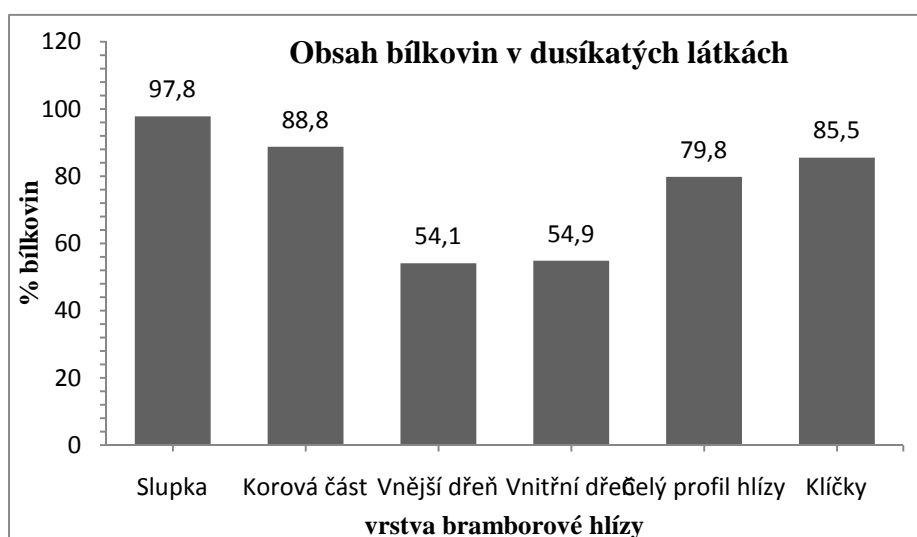
Z výsledků je patrné, že obsah dusíkatých látek v sušině je u naklíčených hlíz odrůdy Tomensa a Westamyl nejvyšší v oblasti slupky > vnitřní dření > celého profilu hlízy > vnější dření > korové části. Nejvyšší obsah bílkovin v sušině u naklíčených hlíz odrůd Tomensa a Westamyl je v oblasti slupky a v celém profilu hlíz (obrázek 11, 12).

5. 4 Zastoupení bílkovin (%) v dusíkatých látkách

Obr. 13: Průměrný obsah bílkovin v dusíkatých látkách u nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa



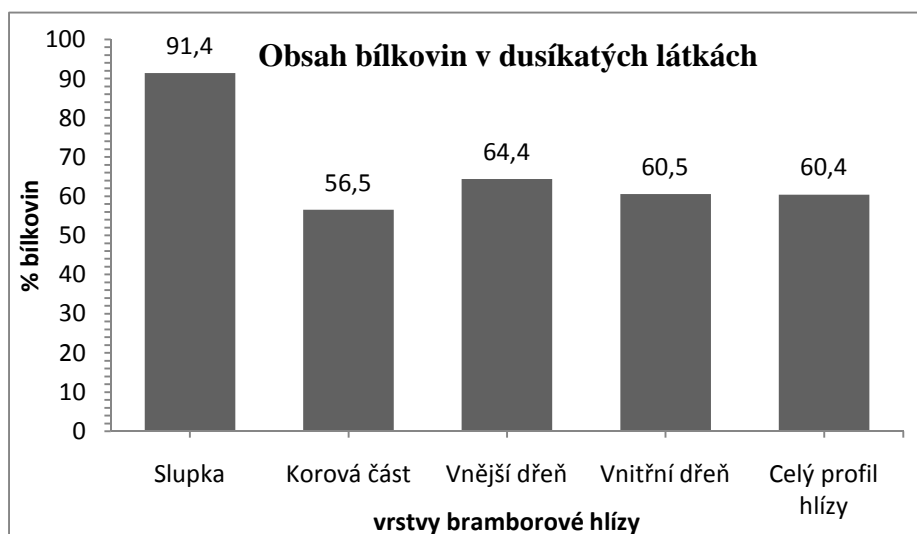
Obr. 14: Průměrný obsah bílkovin v dusíkatých látkách u naklíčených hlíz odrůdy Tomensa



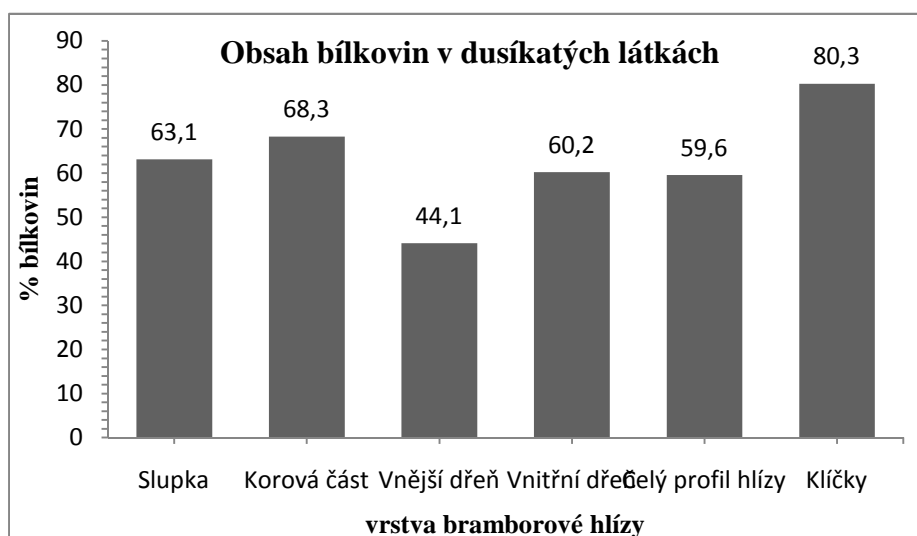
U nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa je nejvyšší podíl bílkovin v dusíkatých látkách obsažen v celém profilu hlízy a korové části. Nejnižší obsah je ve vnější dřeví hlízy, hodnota se pohybuje okolo 23,1 % bílkovin (obrázek 13).

U naklíčených hlíz odrůdy Tomensa má nejvyšší obsah bílkovin oblast slupky, korová část, celý profil hlízy a klíčky. Nižší obsah byl naměřen ve vnější dřeví a vnitřní dřeví bramborových hlíz (obrázek 14).

Obr. 15: Průměrný obsah bílkovin v dusíkatých látkách u nenaklíčených hlíz odrůdy Westamyl



Obr. 16: Průměrný obsah bílkovin v dusíkatých látkách u naklíčených hlíz odrůdy Westamyl

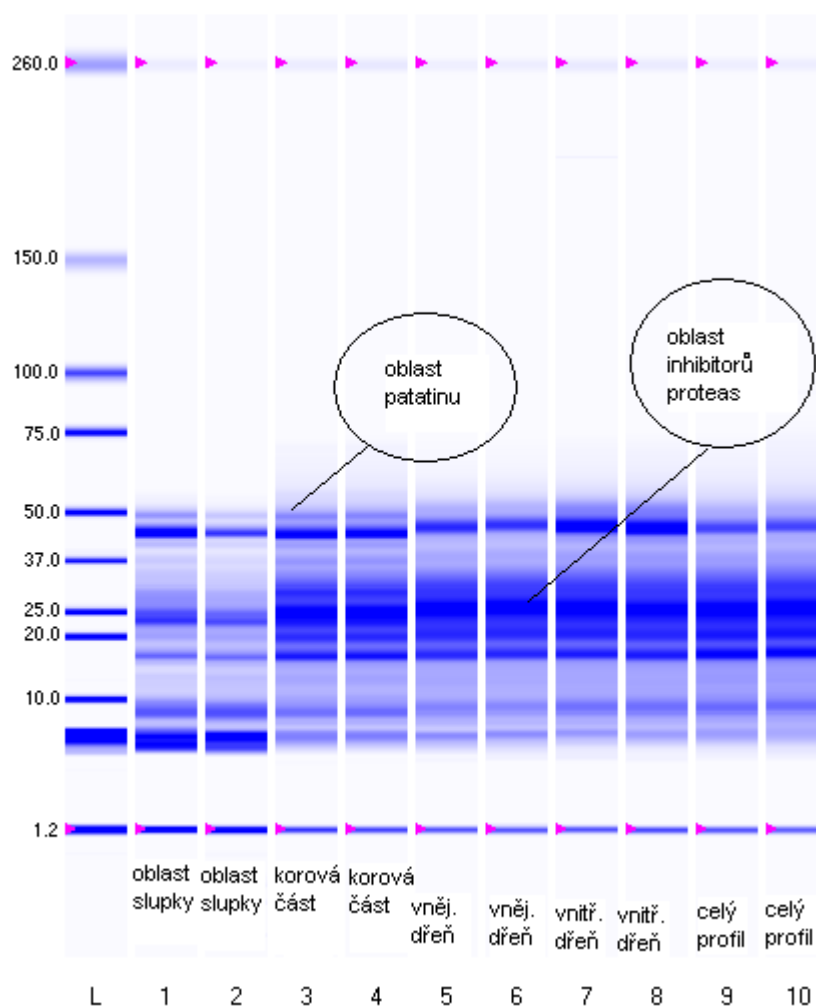


U nenaklíčených hlíz odrůdy Westamyl byl pozorován nejvyšší obsah bílkovin v dusíkatých látkách v oblasti slupky, který se pohybuje okolo 91 %. Ve vnější dřeni, vnitřní dřeni a celého profilu hlízy se obsah pohybuje od 60 do 65 % bílkovin v dusíkatých látkách. Nejnižší obsah byl změřen v korové části (56,5 %) (obrázek 15).

Naklíčené bramborové hlízy odrůdy Westamyl obsahují nejvíce bílkovin v dusíkatých látkách v klíčcích hlíz a to okolo 80,3 %. Korová část spolu s oblastí slupky mají obsah okolo 63-68 % bílkovin. Vnější dřeň hlíz má 44,1 % (obrázek 16).

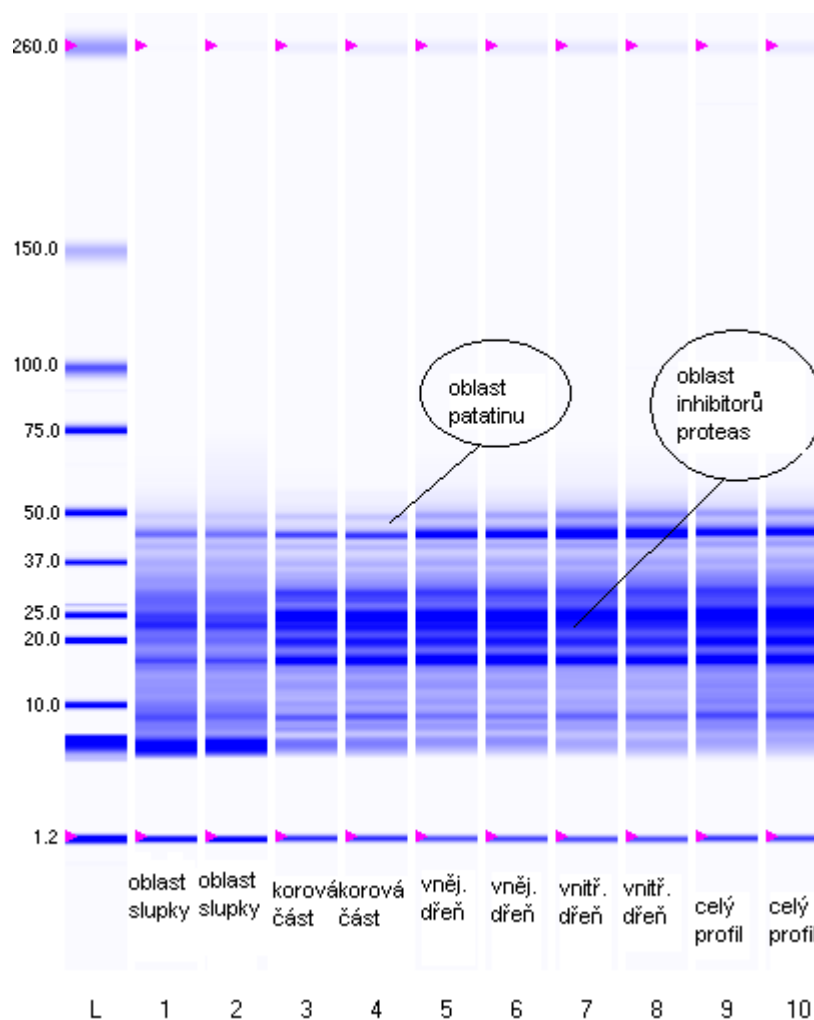
5. 5 Analýza bílkovin hlíz pomocí čipové elektroforézy Experion

Obr. 17: Analýza bílkovin nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa pomocí čipové elektroforézy Experion



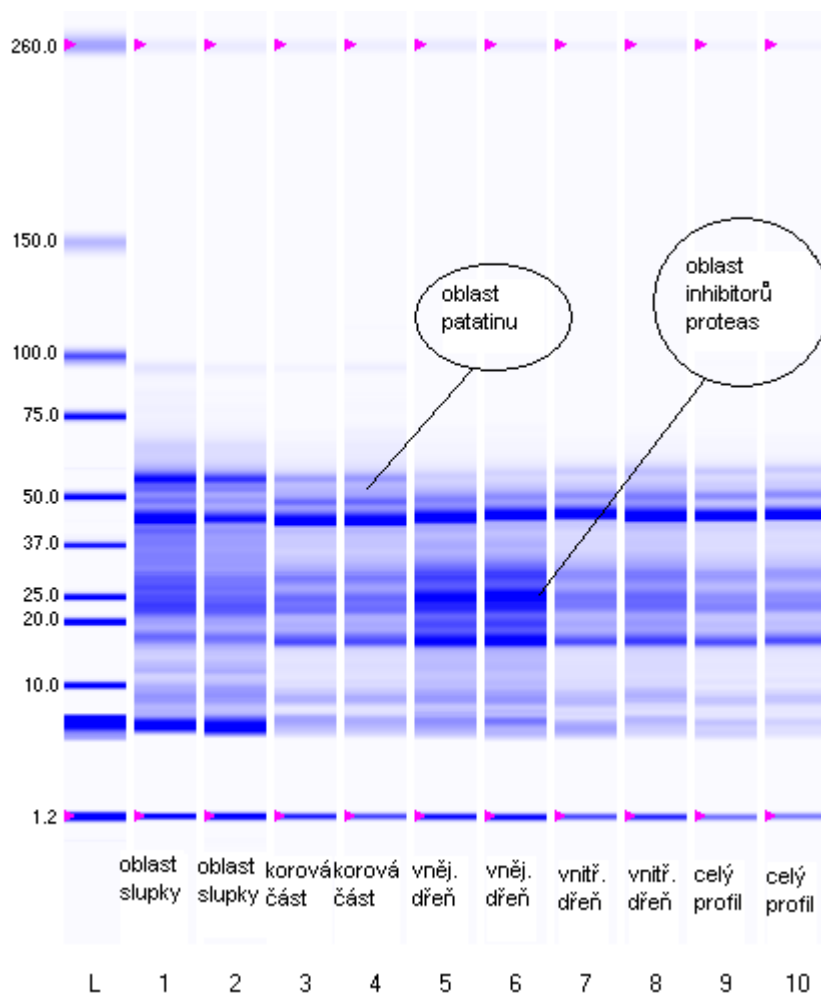
Na obrázku 17 je znázorněná oblast patatinu (42-58 kDa) a oblast inhibitorů proteas (3-9 kDa). Patatin je zásobní látka hlízy a proto je přítomen ve všech částech hlízy. V oblasti slupky a korové části jsou viditelné dvě izoformy patatinu. Druhá izoforma patatinu je patrně obranným systémem hlízy proti houbovým patogenům a hmyzím škůdcům a nebo souvisí s mechanismem klíčení.

Obr. 18: Analýza bílkovin naklíčených hlíz odrůdy Tomensa pomocí čipové elektroforézy Experion



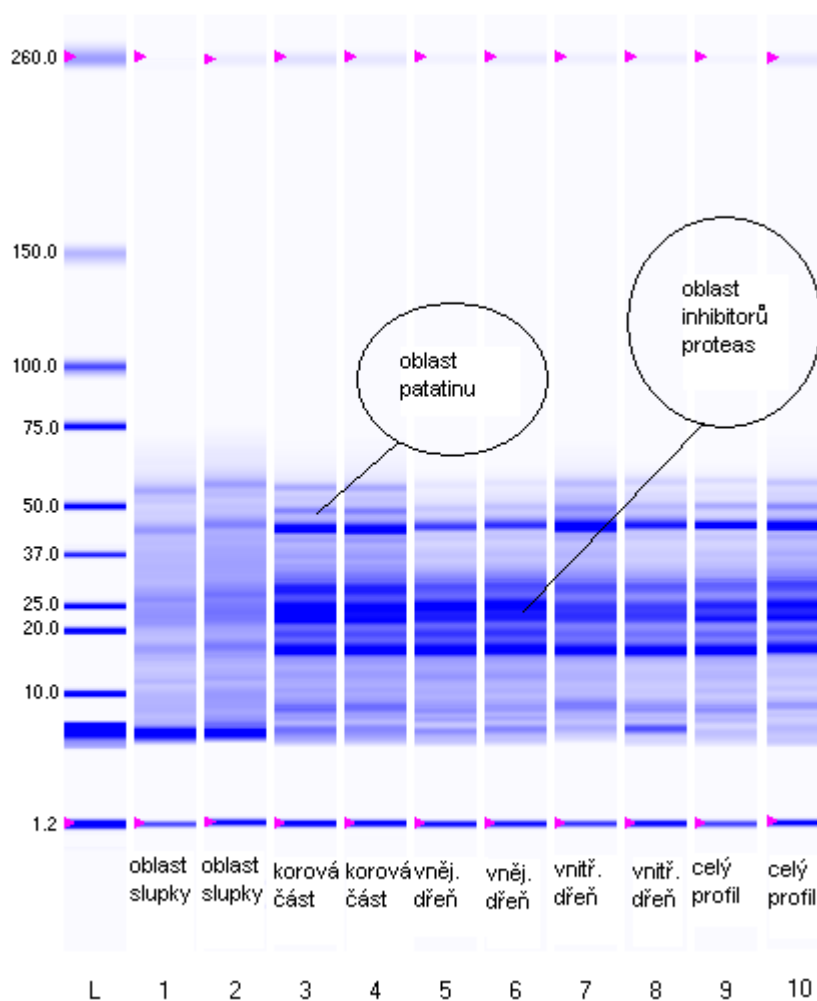
U naklíčené bramborové hlízy odrůdy Tomensa se také objevují dvě izoformy (obrázek 18). Je to rozdílné, než u obrázku 17. Zde se objevují izoformy patatinu až u vnější dřevě, vnitřní dřevě a celého profilu hlízy. Zřejmě tato izoforma souvisí s klíčením hlízy. Příčinou existence těchto izoform je možná bodová mutace v primární struktuře bílkoviny.

Obr. 19: Analýza bílkovin nenaklíčených hlíz odrůdy Westamyl pomocí čipové elektroforézy Experion



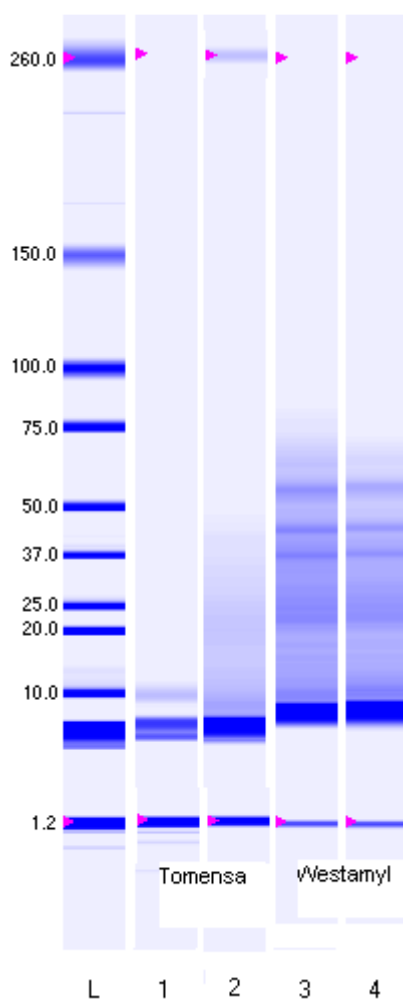
Na obrázku 19 jsou u slupky viditelné dvě izoformy patatinu, které se zřejmě zráním, klíčením a stárnutím hlízy ztrácejí.

Obr. 20: Analýza bílkovin naklíčených hlíz odrůdy Westamyl pomocí čipové elektroforézy Experion



U nenaklíčené odrůdy Tomensa (obrázek 20) se objevují dvě izoformy patatinu, kromě oblasti slupky. Oblast patatinu je (42-58 kDa) a oblast inhibitorů proteas (9-3 kDa).

Obr. 21: Analýza bílkovin naklíčených hlíz odrůdy Tomensa / Westamyl pomocí čipové elektroforézy Experion

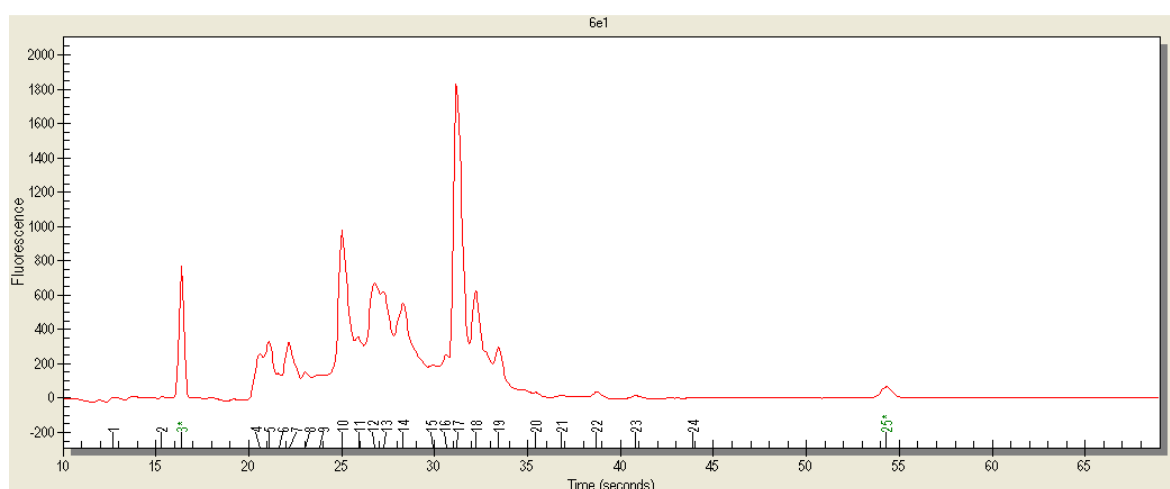


Klíčky mají jiné složení, než hlíza brambor, což je viditelné na obrázku 21.

5. 5. 1 Průběh čipové elektroforézy Experion

Automatická čipová elektroforeza umožňuje získání počítačově zpracované data do formy grafického záznamu průběhu analýzy (obrázek 22) a do podoby souhrnné tabulky (obrázek 23).

Obr. 22: Ukázka grafického záznamu průběhu analýzy bílkovin na automatické čipové elektroforéze Experion



Obr. 23: Souhrnná vzorová tabulka s daty o průběhu analýzy vzorku hlízových bílkovin

Peak State	Peak Number	Mig. Time [secs]	Mol. Wt. (kDa)	Corrected Area	Area Ratio (to Upper Marker)	Concentration (ng/μl)	Calib. Conc. (ng/μl)	% Total	Observation	Comments
	1	12.71		4.08						
	2	15.32		10.12						
	3	16.40	1.20	1426.52						Lower Marker
	4	20.58	6.91	570.19						System Peak
	5	21.08	7.58	762.49						System Peak
	6	21.62	8.32	154.29						System Peak
	7	22.16	9.06	978.22	11.3051	847.88		5.98		
	8	23.04	10.61	283.67	3.2783	245.87		1.73		
	9	23.83	13.07	338.84	3.9159	293.69		2.07		
	10	25.01	16.76	2820.99	32.6016	2445.12		17.24		
	11	25.90	19.53	629.90	7.2796	545.97		3.85		
	12	26.79	23.06	1698.21	19.6259	1471.94		10.38		
	13	27.23	24.91	1272.05	14.7008	1102.56		7.77		
	14	28.31	30.09	2190.93	25.3202	1899.01		13.39		
	15	29.94	38.01	300.55	3.4734	260.50		1.84		
	16	30.62	41.74	381.82	4.4126	330.95		2.33		
	17	31.17	44.67	3322.38	38.3961	2879.71		20.30		
	18	32.20	50.32	1403.10	16.2153	1216.15		8.57		
	19	33.43	58.10	663.56	7.6686	575.14		4.06		
	20	35.40	70.56	26.69	0.3084	23.13		0.16		
	21	36.83	81.06	10.66	0.1231	9.24		0.07		
	22	38.70	96.64	31.24	0.3611	27.08		0.19		
	23	40.81	115.30	10.06	0.1162	8.72		0.06		
	24	43.87	142.55	1.00	0.0115	0.87		0.01		
	25	54.30	260.00	86.53						Upper Marker

5. 6 Statistické zpracování

5. 6. 1 Základní statistika ANOVA

Tab. 10: Průkaznost odlišení pomocí jednocestné ANOVY

Factor	n	Obsah N (% sušiny)	Obsah N látek (% sušiny)	Obsah bílkovin (% sušiny)	Relativní abundance patatinu (%)
Total	40	1,82	11,40	7,65	18,43
Odrůda					
Tomensa	20	1,75 ^a	10,95 ^a	7,48 ^a	15,10 ^a
Westamyl	20	1,90 ^a	11,85 ^a	7,81 ^a	21,80 ^b
Struktura hlízy					
Slupka	8	2,85 ^c	17,84 ^c	14,09 ^b	14,71 ^a
Korová vrstva	8	1,42 ^a	8,86 ^a	6,42 ^a	19,10 ^a
Vnější dřev	8	1,44 ^a	9,01 ^a	4,15 ^a	16,05 ^a
Vnitřní dřev	8	1,89 ^b	11,84 ^b	6,91 ^a	22,55 ^a
Celý profil hlízy	8	1,51 ^a	9,45 ^a	6,67 ^a	19,72 ^a
Varianta hlíza naklíčená/nenaklíčená					
Naklíčená	20	1,77 ^a	11,06 ^a	7,49 ^a	13,59 ^a
Nenaklíčená	20	1,88 ^a	11,74 ^a	7,81 ^a	21,81 ^b

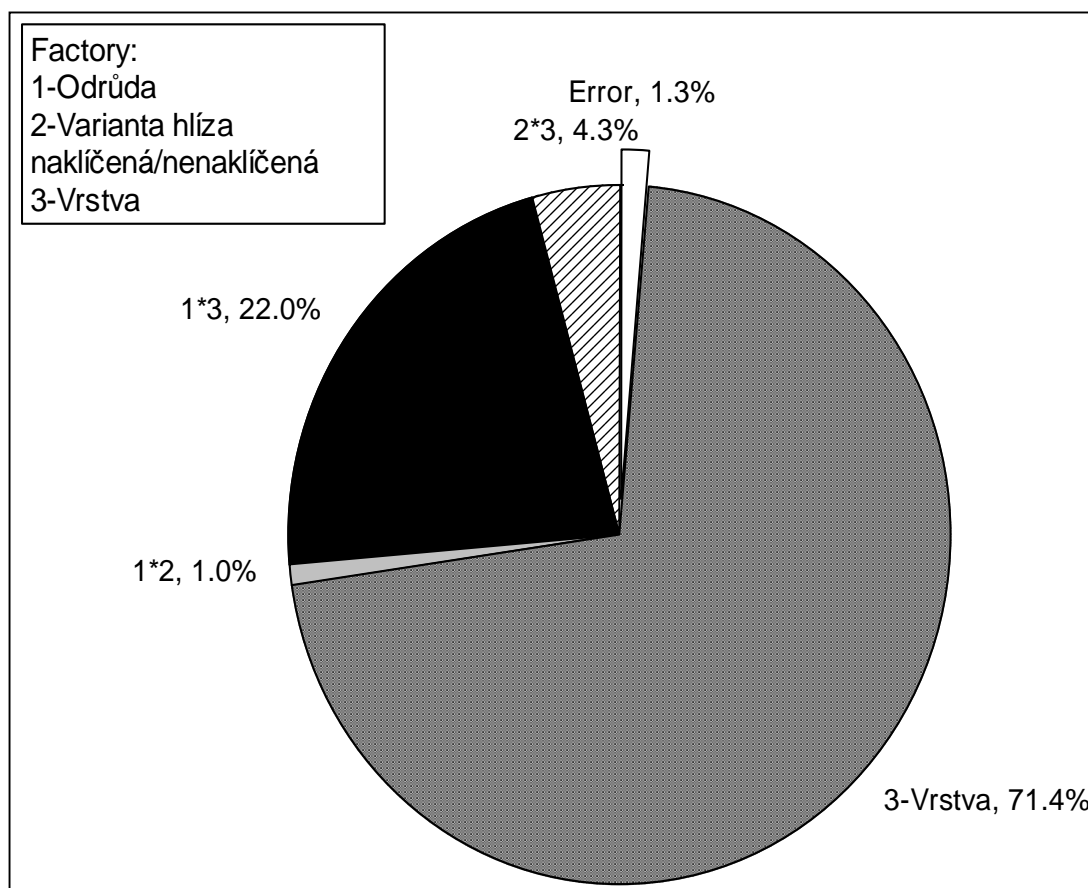
Pozn.: Odlišná písmena ve sloupcích indikují průkazné rozdíly na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukey HSD test)

V tabulce 10 jsou znázorněné statistické odlišnosti. Obsah N (% sušiny) není u hlíz odrůdy Tomensa a Westamyl statisticky odlišný. Statistická odlišnost je u slupky a u vnitřní dřevě hlíz. To samé platí pro obsah N látek (% sušiny). U obsahu bílkovin nebyla u faktoru odrůdy prokázána statistická odlišnost. Odlišnost je prokázána u obsahu bílkovin ve slupce. Relativní obsah patatinu (%) je průkazně odlišný u hlíz odrůdy a u varianty naklíčená/nenaklíčená hlíza. Jelikož klíčením se snižuje obsah patatinu v hlíze. Statisticky jsme nedokázali prokázat různý obsah patatinu v různých částech hlízy. Zřejmě došlo k chybě analýzy, či při přípravě vzorku.

V příloze je zobrazena ANOVA faktoriální. Kde jsou znázorněné statistické odlišnosti. A to v příloze 1 – 4.

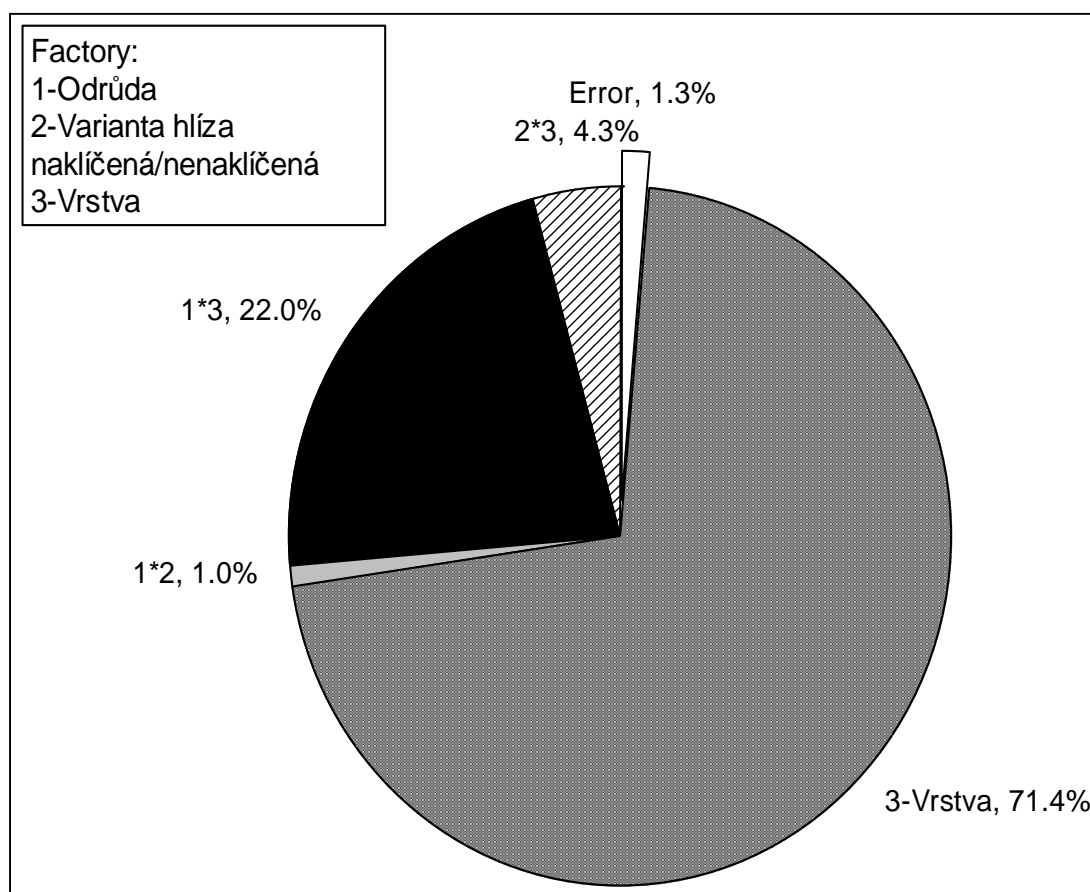
5. 6. 2 Variance components

Obr. 24: Znázornění vlivu faktorů na obsah N (%)



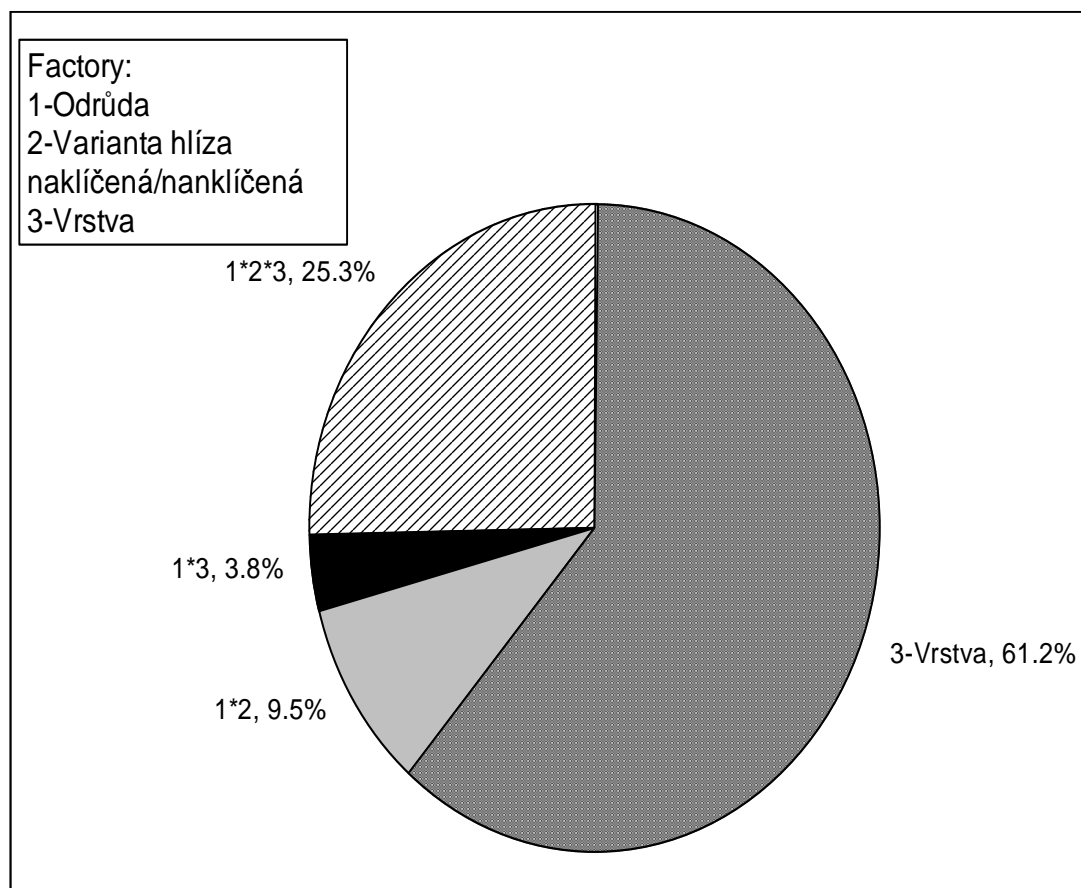
Z obrázku 24 je viditelné, že největší vliv na obsah N (%) má ze 71,4 % vrstva hlíz (slupka, korová část, vnější dřev, vnitřní dřev, celý profil hlízy). Z 22 % ovlivňuje obsah N odrůda v interakci s vrstvou hlíz. Ze 4,3 % ovlivňuje interakce varianty klíčení s vrstvou hlíz. Nejméně ovlivňuje obsah N (%) odrůda v interakci s variantou klíčení (naklíčených/nenaklíčených) hlíz.

Obr. 25: Znázornění vlivu faktorů na obsah N látek (%)



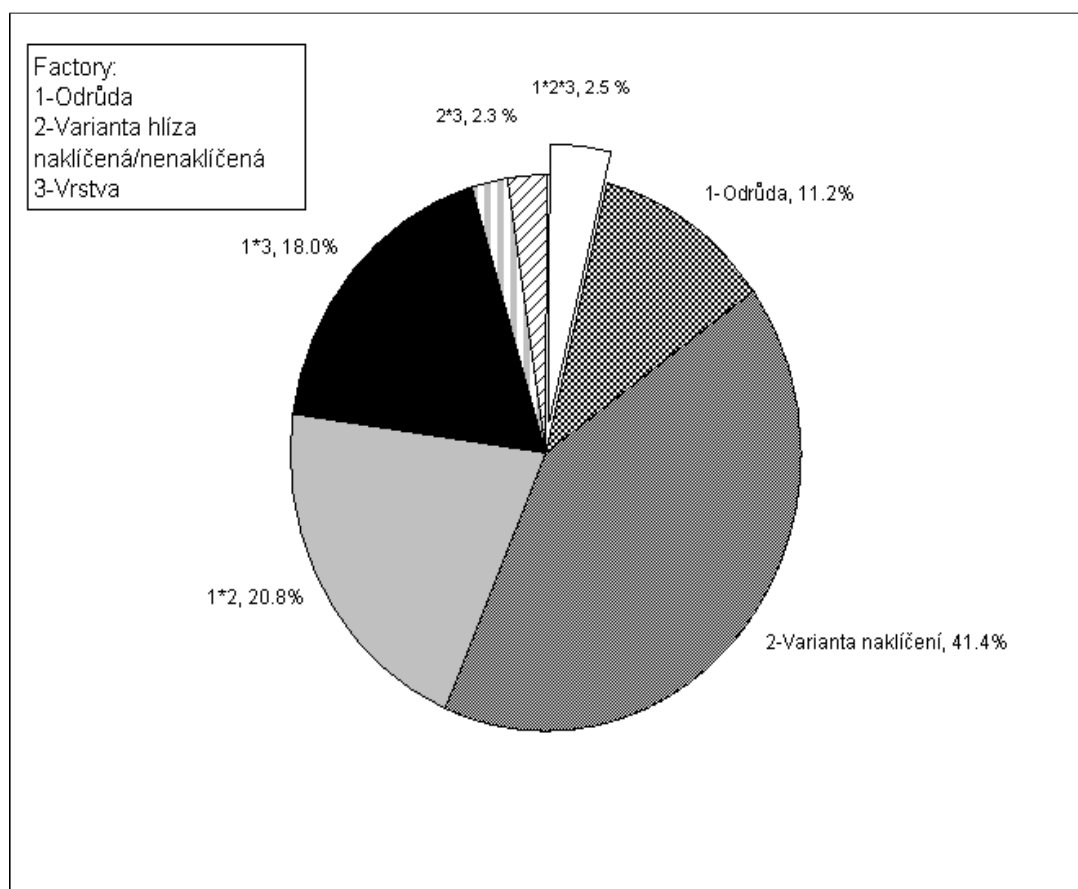
Obrázek 25 je obdobný jako obrázek 24, kde je znázornění vlivu na obsah N (%).

Obr. 26: Znárodnění vlivu faktorů na obsah bílkovin (%)



Obsah bílkovin je z 61,2 % nejvíce ovlivněn vrstvou hlíz. Z 25,3 % je ovlivněn interakcí odrůdy, variantou klíčení (naklíčená/nenaklíčená) a vrstvou hlíz. Nejméně obsah bílkovin (%) ovlivňuje odrůda v interakci s variantou klíčení (obrázek 26).

Obr. 27: Znázornění vlivu faktorů na obsah patatinu (%)



Obsah patatinu nejvíce ovlivňuje vrstva hlíz a to ze 41,4 %. Interakce odrůdy a varianty klíčení působí z 20,8 %. Nejméně ovlivňuje obsah patatinu (%) interakce varianty klíčení a vrstvy hlíz (obrázek 27).

6. Diskuze

6. 1 Sušina jednotlivých částí

Jaspreet & Lovedeep (2009) uvádějí obsah sušiny v hlízách bramboru okolo 15-28 %. Bárta et al., (2008) uvádějí průměrný obsah sušiny u hlíz odrůdy Tomensa okolo 26,05 % a hlíz odrůdy Westamyl okolo 27,37 %. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že sušina hlíz odrůdy Tomensa a Westamyl se v různých částech hlízy liší. U nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa se hodnoty pohybují v rozmezí 25,5 – 35,2 %. U nenaklíčených hlíz odrůdy Westamyl v rozmezí 25,1 – 29,9 % sušiny (obrázek 7). Na obrázku 8 u naklíčených hlíz odrůd Tomensa jsou hodnoty od 22,8 – 34,4 %. U hlíz nenaklíčené odrůdy Westamylu okolo 22,2 – 34,2 % sušiny. Zrání hlíz je spojeno s poklesem cukrů a zvýšením obsahem škrobu a bílkovin (Kincl & Krpeš, 2006). To bylo potvrzeno, jelikož obsah sušiny u nenaklíčených hlíz se pohybuje v celém profilu hlíz okolo 27,2 % a u naklíčených hlíz okolo 22,7 %. Hrabě & Komár (2003) uvádějí, že nedozrálé hlízy mají více vody a bílkovin a méně škrobu, než hlízy zralé.

6. 2 Obsah dusíkatých látek a bílkovin v sušině (DM)

Dusíkaté látky v sušině hlíz

Obsah dusíkatých látek v hlízách brambor se pohybuje okolo 2 %, tzn. kolem 10 % v sušině (Debre & Brindza, 1996). Nejdůležitějším podílem komplexu dusíkatých látek je tzv. čistá bílkovina, která patří mezi nejhodnotnější bílkoviny rostlinného původu vůbec (Vokál et al., 2003).

Bárta et al., (2008) uvádějí obsah dusíkatých látek ($N \times 6,25$) v sušině. U hlíz odrůdy Tomensa je uveden průměrný obsah 10,23 % dusíkatých látek v sušině. Z této práce vyplývá, že obsah dusíkatých látek u nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa je v celém profilu hlízy 9,4 %. V různých vrstvách hlízy se hodnota pohybovala v rozmezí od 9,1 – 16,2 % dusíkatých látek. Z čehož bylo nejvíce zjištěno v oblasti slupky hlíz (16,2 %) obrázek 9. V průběhu skladování a klíčení dochází ke změnám v obsahu a zastoupení dusíkatých látek (Brierley et al., 1996, 1977; Kumar et al., 1999). V této práci byly zjištěny změny v obsahu dusíkatých látek v různých vrstvách hlíz. V celém profilu hlízy byl zjištěn obsah 10,4 %, v ostatních vrstvách hlíz v rozmezí od 8,9 –

13,9 % dusíkatých látek v sušině. Nejvyšší obsah byl naměřen v oblasti slupky (13,9 %) a vnitřní dřevě hlízy (11,1 %). Obsah dusíkatých látek u klíčků byl (22,1 %), obrázek 11.

Průměrná hodnota u hlíz odrůd Westamyl byla 7,75 % dusíkatých látek v sušině (Bárta et al., 2008). U nenaklíčených hlíz odrůdy Westamyl (obrázek 10) bylo vysledováno, že celý profil hlízy obsahuje 9,1 % dusíkatých látek v sušině. Nejvíce je dusíkatých látek v oblasti slupky (22,1 %). Rozmezí se pohybovalo okolo 8,7 – 22,1 % dusíkatých látek. U naklíčených hlíz odrůdy Westamyl byl zjištěn obsah u celého profilu hlízy okolo 8,9 %, další vrstvy obsahovaly okolo 8,2 – 19,2 %. Nejvyšší obsah byl naměřen v oblasti slupky (19,2 %). Klíčky obsahovaly 23,9 % dusíkatých látek.

Bílkoviny v sušině hlízy

Obsah bílkovin je závislý na odrůdě, podmínkách prostředí doprovázejících pěstování a výživě rostlin (Shewry, 2003). Prugar et al., (2008) uvádí, že nejvíce bílkovin je lokalizováno ve slupce, korové vrstvě hlízy a ve střední části hlízy. U nenaklíčené odrůdy Tomensa uvádí Bárta et al., (2008) průměrný obsah bílkovin v sušině hlízy 8,1 %. Zjištěné hodnoty se pohybovaly od 2,1 – 10,5 % (obrázek 9). Zjištěné hodnoty byly: vnější dřevě (2,1 %), ve vnitřní dřevě (6,7 %), v celém profilu hlízy (7,5 %) a v korové části (7,1 %). Nejvyšší obsah byl zjištěn v oblasti slupky (10,5 %). U naklíčených hlíz odrůdy Tomensa byly hodnoty v rozmezí 5,3 % - 18,9 % bílkovin v sušině. Nejvíce bylo obsaženo bílkovin v oblasti slupky 13,6 % a v klíčcích 18,9 %.

Odrůda Westamyl patří mezi polopozdní odrůdy (Novák, 2002). Nejvyšší obsah bílkovin v % v sušině u nenaklíčené varianty byl zjištěn v oblasti slupky (20,2 %). Další hodnoty ukazují rozmezí okolo 5,2 – 5,6 % bílkovin v sušině hlízy Westamyl. Nejméně bylo vysledováno 5,2 % bílkovin a to v korové části (obrázek 10). Celý profil hlíz obsahuje 5,5 %. Bárta et al., (2008) uvádějí průměrný obsah 6,11 % bílkovin v sušině bramborové hlízy. U naklíčených hlíz odrůdy Westamyl byl v celém profilu stanoven obsah 5,3 %. Nejvyšší obsah u klíčků (19,2 %) a v oblasti slupky (12,1 %). Lupáním a hlavně okrajováním je obsah bílkovin v hlíze snižován (Prugar et al., 2008).

6. 3 Zastoupení bílkovin v dusíkatých látkách

Podíl bílkovin v obsahu dusíkatých látek kolísá vlivem genotypu a podmínek prostředí v poměrně značném rozpětí od 34 do 70 % (Debre & Bindza, 1996).

Bárta et al., (2008) uvádí zastoupení bílkovin v N látkách u hlíz odrůdy Tomensa okolo 67,8 %.

U nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa je z výsledků průkazné nejvyšší obsah bílkovin u celého profilu hlízy (79,8 %). Hodnota je stejná jako u naklíčených hlíz odrůdy Tomensa.

Hodnoty u nenaklíčených hlíz odrůdy Westamyl jsou u celého profilu hlízy 60,4 % bílkovin a u naklíčených hlíz odrůdy Westamyl je 59,6 %. Bárta et al., (2008) uvádí hodnotu u Westamylu okolo 68,5 %.

6. 4 Analýza bílkovin hlíz pomocí čipové elektroforézy Experion

Hlízové bílkoviny lze členit na patatin neboli platinový komplex, bramborové inhibitory proteas a na ostatní bílkoviny (Pots et al., 1999; Ralet et al., 1999; Bárta & Čurn, 2004). Bílkoviny patatinového komplexu zaujmají 20 - 40 % rozpustných bílkovin bramborových hlíz (Jimenez et al., 2002; Rydel et al., 2003), byl však uveden i vyšší podíl, až 60 % (Pots, 1999). Získané hodnoty v této diplomové práci odpovídají dolní hranici uvedeného intervalu. U hlíz odrůdy Tomensa bylo stanoveno 15,1 % patatinu a u odrůdy Westamyl 21,8 %. V nativní formě je patatin považován za dimer s přibližnou molekulovou hmotností 39 - 44 kDa (Racusen et al., 1984; Bárta & Čurn, 2004). Patatin je v hlízách brambor považován za hlavní zásobní bílkovinu (Racusen et al., 1980; Rosahl et al., 1986), je uložen v centrálních vakuolách parenchymu buněk (Straetkvern et al., 1999). Relativně vysoký obsah bílkoviny patatinu je v korové oblasti nevyzrálých hlíz (Barel & Ginzberg, 2008). Nejvyšší obsah patatinu byl zjištěn ve vnitřní dřevě hlíz (22,55 %), v korové části (19,10 %) a v celém profilu hlíz (19,72 %). Nejnižší obsah patatinu byl zjištěn u vnější dřevě hlíz.

Statistické vyhodnocení výsledků však nepotvrdilo průkazné odlišení patatinu v jednotlivých vrstvách hlíz. U naklíčené varianty došlo ke statistické odlišnosti, jelikož hodnota u naklíčené varianty byla 13,59 % a u nenaklíčené 21,81 % na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Rozdíl potvrzuje i tvrzení Barel & Ginzberg (2008) & Kumar et al., (1999), že při klíčení dochází ke snižování patatinu v bramborové hlíze.

7. Závěr

Na základě výsledků pokusu, ve kterém byl sledován obsah sušiny, N-látek, bílkovin a patatinu u vybraných odrůd brambor lze vyvodit tyto závěry:

- Sušina byla naměřena v různém množství a to jak u varianty naklíčení, tak u druhu odrůdy. Naklíčené hlízy odrůdy Tomensa obsahovaly sušiny: korová část (34,4 %) > slupka (33,4 %) > vnější dřev (31,2 %) > vnitřní dřev (28,2 %) > celý profil hlízy (23,1 %). U nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa byl zjištěn obsah sušiny: slupka (35,2 %) > korová část (33,1 %) > vnější dřev (30,6 %) > celý profil hlízy (28,5 %) > vnitřní dřev (25,5 %)
- Obsah sušiny u naklíčených hlíz odrůdy Tomensa: korová část (34,2 %) > vnější dřev (32,9 %) > slupka (26,3 %) > vnitřní dřev (25,8 %) > celý profil hlízy (22,2 %). Nenaklíčené hlízy odrůdy Westamyl obsahují sušiny: slupka (29,9 %) = korová část (29,9 %) > vnější dřev (29,5 %) > vnitřní dřev (25,1 %) > celý profil hlízy (25,1 %). V této práci bylo zjištěno, že obsah sušiny se liší v různých částech hlíz a také u naklíčených/nenaklíčených hlíz
- Bylo zjištěno, že obsah N v sušině je odlišný v různých vrstvách hlízy. Nejvyšší obsah byl naměřen v oblasti slupky a vnitřní dřev hlíz
- Dusíkaté látky v sušině jsou u všech naklíčených/nenaklíčených odrůd nejvyšší v oblasti slupky a ve vnitřní dřev hlíz
- Obsah bílkovin v sušině je nejvyšší v oblasti slupky hlíz
- Obsah patatinu byl různý u odrůdy Tomensa a Westamyl a v různých vrstvách hlíz. Byl prokázán různý obsah patatinu u naklíčené a nenaklíčené varianty hlíz, tudíž jsme dokázali, že při klíčení dochází k odbourávání patatinu na jednodušší peptidy, z nichž si hlíza využívá potřebný N na výstavbu klíčků, a proto dochází ke snížení patatinu
- U nenaklíčených hlíz odrůdy Tomensa je obsah bílkovin v dusíkatých látkách nejvyšší u celého profilu hlízy a to 79,8 %. Naklíčené hlízy odrůdy Tomensa mají bílkovin nejvíce v oblasti slupky (97,8 %). Naklíčená varianta hlíz odrůdy Westamyl má nejvíce bílkovin v dusíkatých látkách v korové vrstvě

8. Seznam použité literatury

- Barel, G. & Ginzberg, I. (2008): Potato skin proteome is enriched with plant defence components, *Journal of Experimental Botany*, 59: 3347-3357
- Bárta, J. & Bártová, V. (2007): Bílkoviny hlíz brambor (*Solanum tuberosum* L.), vědecká monografie, 116 p.
- Bárta, J. & Čurn, V. (2004): Bílkoviny hlíz brambor (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam. *Chemické listy*. 98, 373-378
- Bárta, J. (2002): Studium vlivu dusíkatého hnojení na kvalitu konzumních brambor. Disertační práce. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice, 191
- Bárta, J., Bártová, V., Čurn, V. (2010): Analýza proteinů pomocí automatické čipové elektroforézy Experion a porovnání s metodou SDS-PAGE. *Laboratorní přístroje a postupy*, *Chemické listy*, 104: 33-40
- Bárta, J., Bártová, V., Diviš, J. (2009): Využití analýzy bílkovin hlíz na automatické čipové elektroforese Experion pro charakterizace genotypů brambor
- Bárta, J., Bártová, V., Čurn, V., Diviš, J., Peterka, J. (2008): Stanovení obsahu bílkovin v sušině hlíz brambor pomocí vybraných fotometrických technik, *metodika pro praxi*, 24
- Brierley, E. R., Bonner, P. L. R., Cobb, A. H. (1996): Factors influencing the free amino acid kontent of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers during prolonged storage. *Journal Sci Food Agric* 70: 515-525
- Brierley, E. R., Bonner, P. L. R., Cobb, A. H. (1997): Aspects of amino acid metabolism in stored potato tubers. *Plant Sci* 127: 17-24
- Brožková, D. (2001): Novinky z trhu brambor. *Euromagazín* 2, 28-32
- Carliny, C. R. & Grossi-de-Sá, M. F. (2002): *Toxicon*, 40: 1515
- Debre, F. & Brindza, J. (1996): Genotypy zemiakov z pohledu produkcie a úžitkovej hodnoty. *Rostlinná výroba* 42: 509-515
- Etienne, P., Desclos, M., Le Gou L, Gombert, J., Bonnefoy J., Maurel, K., Le Dily, F., Ourry, A., Avice, J. C. (2007): N-protein mobilization associated with the leaf senescence process in oilseed rape is concomitant with the disappearance of trypsin inhibitor activity. *Funct Plant Biol*, 34: 895–906

- Haase, N. U. & Plate, J. (1996): Properties of potato starch in relation to varieties and Environmental factors, 45: 167-171
- Hanusová, L. & Čurn, V. (2007): Inhibitory proteas v hlíze bramboru, chemické listy, 101: 536-541
- Hoover, R. (2001): Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root barches: a review, 45: 253-267
- Hrabě, J. & Komár, A. (2003): Technologie, zbožíznařství a hygiena potravin, III. Část- Technologie, zbožíznařství a hygiena potravin rostlinného původu. 1. vyd. Vyškov, VVŠ PV Vyškov, 168
- Hraška, M., Rakouský, R., Čurn, V. (2006): Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenozí rostlin, chemické listy, 100: 501-507
- Chloupek, O., Procházková, B., Hrudková, E. (2005): Pěstování a kvalita rostlin, 1. vyd., Brno: MZLU, 181
- Jaspreet, S. & Lovedeep, K. (2009): Advances in Potato Chemistry and Technology, Academic Press is an imprint of Elsevier
- Jimenez, M., Escibano, J., Perez-Gilbert M., Chazara, S., Cabanes, J., Garcia Carmona, F. (2001): Lipids 36: 1169
- Jimenez, M., Escibano, J., Gaudia, F., - Herrero, F., Chazara, S., Cabanes, J., Garcia Carmona, F., Perez - Gilbert, M. (2002): Characterization of patatin esterase aktivity in AOT – isooctane reverse micelles. Biotechnology Progress, 18: 635-640
- Jůzl, M., Pulkrábek, J., Diviš, J. (2000): Rostlinná výroba (Díl 3.), Okopaniny 1. vyd. Brno: MZLU, 222
- Kincl, M. & Krpeš, V. (2006): Základy fyziologie rostlin. 3 doplněné vydání, Katedra biologie a ekologie, Ostravská univerzita, 220
- Koningsveld van G. A., Gruppen, H., Jongh, de H. H. J., Wijngaards, G., Boekel, van M. A. J. S., Waltra, P., Voragen, A. G. J. (2001): The solubility of potato proteins from industrial potato fruit juice as influenced by pH and variol additives. Journal Sci Food Agric. 82: 134-142
- Kumar, G. N. M., Houtz, R. L., Knowles, N. R. (1999): Age-induced protein modifications and increased proteolysis in potato seed-tubers. Plant Physiol, 119: 89-99
- Lisinka, G. & Leszczynski, W. (1989): Potato Science and Technology. Elsevier, London & New York, 41-42
- Majamma, H., Seppala, U., Palosuo, T., Turjanmaa, K., Kalkkinen, N., Reunala, T. (2001): Positive skin and oral challenge response to potato and occurrence of immunoglobulin E antibodies to patatin (Sol t 1) in infants with atopic dermatitis. Pediatric Allergy and Immunology, 12: 283-288

- Mareček, F. et al. (1994): Zahradnický slovník naučný, 1. vyd. , Praha, Ustav zemědělských a potravinářských informací, 440
- Míča, B. (1986): Kvalita brambor. In: Kvalita stolních a konzumních brambor a její ovlivnění. Škrobárny o. p., Havlíčkův Brod, 5-27
- Míča, B. & Vokál, B. (1997): Dusíkaté látky a jejich vztah ke kvalitě brambor. Bramborářství, 5: 5-8
- Navarre, D. A., Goyer, A., Shakya, R. (2009): Dvances in Potato Chemismy and Technology, In: Sing, J. and Kaur, L., Elsevier, 395-424
- Noda, T., Takigawa, S., Matsuura-Endo, C., Kim, S.- J., Hashimoto, N., Yamauchi, H., Hanashiro, L., Takeda, Y. (2005): Physicochemical properties and amylopectin structures of large, small, and extremely small potato starch granules, 60: 245-251
- Novák, F. (2002): Katalog odrůd brambor 2002, Ústřední bramborářský svaz České republiky, 250
- Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpus, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., del Ríó, L. A. (2002): Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. Plant Physiol Biochemistry, 40: 521–530
- Peyer, C., Boney, P., Staudacher, E. (2004): Purification and characterization of β -xylosidase from potatoes (*Solanum tuberosum*). BBA-Proteins and Proteomics, 1672: 27–35
- Pots A. M., Gruppen, H., Diepeenbek van R., Lee van der J. J., Bekekel van M. A. J. S., Wijnigaards G., Voragen A. G. J. (1999): The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content a study using capillary electrophoresis and MALDI 10F mass spektrometry. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79: 1557-1564
- Pots, A. M., Jongh, de H. H. J., Gruppen, H., Hessing, M., Voragen, A. G. J. (1998): The pH Dependence of the structural stability of patatin. Journal of the Science of Food and Agriculture, 46, 2546-2553
- Pouvreau, L., Gruppen, H., Piersma, S. R., Broek van den L. A. M., Koningsveld van G. A., Voragen, A. G. J. (2001): Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. Journal Agric Food Chemistry 49: 2104-2874
- Pouvreau, L. (2003): Occurence of physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum*). Ph. D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 157

- Prins, A., van Heerden, P. D. R., Osmos, E., Kuvert, K. J., Foyer, C. H. (2008): Cysteine proteinases regulate chloroplast protein content and composition in tobacco leaves: a model for dynamic interactions with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) vesicular bodies. *Journal Exp Botany*, 59: 1935–1950
- Prugar, J. et al. (2008): Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a. s., Praha, 327
- Pulkrábek, J. (2007): Okopaniny. [online], Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra rostlinné výroby, systém multimediální elektronické publikace, [cit. 28.2.2010], dostupný z [www: http://etext.czu.cz/php/skripta/obsah.php?titul_key=5](http://etext.czu.cz/php/skripta/obsah.php?titul_key=5)
- Pusztai A. (1972): *Planta* 107: 121
- Racusen, D. & Foote, M. (1980): A major soluble glycoprotein of potato. *Journal Food Biochemistry*. 4: 43-52
- Racusen, D. & Weller, D. L. (1984): Molecular mass of patatin, a major potato tuber protein. *Journal Food Biochemistry*, 8: 103-107
- Ralet, M. Ch. & Gueguen, J. (1999): Foaming properties of potato raw proteins and isolated fractions. *Legend.-Wiss. U.- Technol.*, 34: 266-269
- Rosahl, S., Schmidt, R., Schell, J., Willmitzer, L. (1986): Isolation and characterization of a gene from *Solanum tuberosum* encoding patatin, the major storage protein of potato tubers, *203*: 214-220
- Rybáček, V. (1988): *Brambory*, 1. vyd., Statní zemědělské nakladatelství, Praha, 360
- Rydel, T. J., Williams, J. M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W., C., Browen, S. M., Pershing, J. C., Purcell, J. P., Alibhai, M. F. (2003): The crystal structure, mutagenesis and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolyase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry – Washington*, 42: 6696-6708
- Shewry, P. R. (2003): Tuber storage proteins. *Annals of Botany*, 91: 755-769
- Senda, K., Yoshioka, H., Dooke, N., Kawakita, K. (1996): A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell Physiology*, 37: 347-353
- Seppala, U., Alenius, H., Turjanmaa, K., Reunala, T., Polosuo, T., Kalkkinen, N. (1999): Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test responses to raw potato. *Journal of Allergy and Immunology*, 103: 165-171
- Schmidt, M. H. H., Raulf-Heimsoth, M., Posch, A. (2002): Evaluation of patatin as a major cross-reactive allergen in latex – induced potato allergy. *Annals of Allergy, Astma and Immunology*, 89: 613-618

- Stiekema, W. J., Heidekamp, F., Dirkse, W. G., Beckum van J., Hann De P., Boschten C., Louwerse, J. D. (1988): Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs, *Plant Molecular Biology*, 11: 255-269
- Sonnewald, U., Strum, A., Chrispeels, M. J., Willmitzer, L. (1989): Targeting and glycosilation of patatin, the major tuber protein in leaves of transgenic Tobago. *Planta*, 179: 171-180
- Straekvern, K. O., Schwarz, J. G., Wiesendborn, D. P., Zafirakos, E. A., Lihme, A. (1999): Expanded bed adsorption for recovery of patatin from crude potato juice. *Bioseparation*, 7: 333-345
- Tonón, C., Daleo, G., Oliva, C. (2001): An acidic beta-1,3 glucanase from potato tubers appear to be patatin. *Plant Physiol Biotechnology*, 39: 849-854
- ÚKZÚZ (2005): Metodika ÚKZÚZ pro zkoušky užité hodnoty odrůd-Brambor (*Solanum tuberosum* L.), ÚKZÚZ, Brno
- Van der Hoorn, R. A. L. (2008): Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanismus. *Annu Rev Plant Biol.* 59: 191-223
- Valdés-Rodríguez, S., Guerrero-Rangel, A., Melgoza-Villagómez, C., Chagolla-López, A., Delgado-Vargas, F., Martínez-Gallardo, N., Sánchez-Hernández, C., Délano-Frier, J. (2007): Cloning of a cDNA encoding a cystatin from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) showing a tissue-specific expression that is modified by germination and abiotic stress. *Plant Physiol Biochem*, 45: 790-798
- Velíšek, J. et al. (1999): *Chemie potravin*, Tábor, 352
- Vokál, B., Čepl, J., Hausvater, E., Rasocha, V. (2003): *Pěstujeme brambory*. Grada publishing a.s., 17-25
- Vokál, B. et al. (2005): *Abeceda pěstitele*. 1. vydání. Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod., 43
- Yusuph, M., Tester, R. F., Ansell, R., Snape, C. E. (2003): Composition and properties of starches extracted from tubers of different potato varieties grown under the same environmental conditions, 82: 283-289
- Zrůst, J. (2004): Faktory ovlivňující obsah nutričně významných a škodlivých látek v hlízách a výrobcích z brambor, 85
- Žižka, J. (2009): *Situační a výhledová zpráva brambory*, Ministerstvo zemědělství, 1211-7692

Internetové stránky

- 1) <http://www.agronavigator.cz/>, staženo 13. 1. 2010

9. Přílohy

Příloha č. 1: Fatoriální ANOVA s používáním třech variant (odrůda, varianta klíčnická, vrstva hlíz). Hodnocení statistické průkaznosti odlišení N (%) v bramborové hlíze.

Odrůda	Var. Naklíčení	Vrstva	N (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
W	nakl.	korová vrstva	1,30	***									
W	nakl.	vnější dřeň	1,34	***									
W	nenakl.	vnější dřeň	1,39	***	***								
T	nakl.	korová vrstva	1,42	***	***								
W	nakl.	celý profil hlízy	1,42	***	***								
W	nenakl.	celý profil hlízy	1,45	***	***								
T	nenakl.	vnější dřeň	1,46	***	***								
T	nenakl.	korová vrstva	1,46	***	***								
W	nenakl.	korová vrstva	1,46	***	***								
T	nenakl.	celý profil hlízy	1,50	***	***	***							
T	nakl.	vnější dřeň	1,57	***	***	***	***						
T	nakl.	celý profil hlízy	1,66		***	***	***	***					
T	nakl.	vnitřní dřeň	1,77			***	***	***	***				
T	nenakl.	vnitřní dřeň	1,84				***	***	***				
W	nakl.	vnitřní dřeň	1,89					***	***				
W	nenakl.	vnitřní dřeň	2,06						***	***			
T	nakl.	slupka	2,21							***			
T	nenakl.	slupka	2,59								***		
W	nakl.	slupka	3,06									***	
W	nenakl.	slupka	3,53										***

Příloha č. 2: Fatoriální ANOVA s používáním třech variant (odrůda, varianta klíčnic, vrstva hlíz). Hodnocení statistické průkaznosti odlišení bílkovin (%) v bramborové hlíze.

Odrůda	Varianta naklíčení	Vrstva	Bílkoviny (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
T	nenakl.	vnější dřeň	2,05	***											
W	nakl.	vnější dřeň	3,65		***										
W	nenakl.	korová vrstva	5,18			***									
T	nakl.	vnější dřeň	5,29			***									
W	nakl.	celý profil hlízy	5,33			***									
W	nenakl.	celý profil hlízy	5,50			***	***								
W	nenakl.	vnější dřeň	5,62			***	***								
W	nakl.	korová vrstva	5,63			***	***								
T	nakl.	vnitřní dřeň	6,03				***								
T	nenakl.	vnitřní dřeň	6,67					***							
T	nenakl.	korová vrstva	7,00					***	***						
W	nakl.	vnitřní dřeň	7,11					***	***						
T	nenakl.	celý profil hlízy	7,47						***	***					
W	nenakl.	vnitřní dřeň	7,80							***	***				
T	nakl.	korová vrstva	7,86							***	***				
T	nakl.	celý profil hlízy	8,34								***				
T	nenakl.	slupka	10,53									***			
W	nakl.	slupka	12,09										***		
T	nakl.	slupka	13,55											***	
W	nenakl.	slupka	20,16												***

Příloha č. 3: Fatoriální ANOVA s používáním třech variant (odrůda, varianta klíční, vrstva hlíz). Hodnocení statistické průkaznosti odlišení N látek (%) v bramborové hlíze.

Odrůda	Varianta naklíčení	Vrstva	N látky (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
W	naklíčený	korová vrstva	8,17	***									
W	naklíčený	vnější dřeň	8,40	***									
W	nenaklíčené	vnější dřeň	8,68	***	***								
T	naklíčená	korová vrstva	8,92	***	***								
W	naklíčený	celý profil hlízy	8,93	***	***								
W	nenaklíčené	celý profil hlízy	9,08	***	***								
T	nenaklíčené	vnější dřeň	9,12	***	***								
T	nenaklíčené	korová vrstva	9,15	***	***								
W	nenaklíčené	korová vrstva	9,17	***	***								
T	nenaklíčené	celý profil hlízy	9,39	***	***	***							
T	naklíčená	vnější dřeň	9,82	***	***	***	***						
T	naklíčená	celý profil hlízy	10,38		***	***	***	***					
T	naklíčená	vnitřní dřeň	11,07			***	***	***	***				
T	nenaklíčené	vnitřní dřeň	11,51				***	***	***				
W	naklíčený	vnitřní dřeň	11,82					***	***				
W	nenaklíčené	vnitřní dřeň	12,92						***	***			
T	naklíčená	slupka	13,85							***			
T	nenaklíčené	slupka	16,23								***		
W	naklíčený	slupka	19,16									***	
W	nenaklíčené	slupka	22,09										***

Příloha č. 4: Fatoriální ANOVA s používáním třech variant (odrůda, varianta klíčnická, vrstva hlízy).
Hodnocení statistické průkaznosti odlišení patatinu (%) v bramborové hlíze

Odrůda	Varianta naklíčení	Vrstva	Patatin (%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
W	naklíčený	slupka	5,38	***									
T	naklíčená	korová vrstva	7,80	***	***								
T	naklíčená	slupka	10,45	***	***	***							
W	naklíčený	vnější dřeň	11,60	***	***	***	***						
T	naklíčená	celý profil hlízy	12,55	***	***	***	***	***					
T	naklíčená	vnější dřeň	13,43		***	***	***	***					
T	nenaklíčené	celý profil hlízy	14,03		***	***	***	***	***				
T	nenaklíčené	korová vrstva	17,03			***	***	***	***	***			
T	nenaklíčené	slupka	17,44			***	***	***	***	***			
T	naklíčená	vnitřní dřeň	17,71			***	***	***	***	***			
T	nenaklíčené	vnější dřeň	17,74			***	***	***	***	***			
W	naklíčený	korová vrstva	18,57				***	***	***	***	***		
W	naklíčený	celý profil hlízy	18,97				***	***	***	***	***		
W	naklíčený	vnitřní dřeň	19,29					***	***	***	***		
W	nenaklíčené	vnější dřeň	21,45						***	***	***		
T	nenaklíčené	vnitřní dřeň	22,24							***	***		
W	nenaklíčené	slupka	25,56								***	***	
W	nenaklíčené	vnitřní dřeň	30,96									***	***
W	nenaklíčené	korová vrstva	32,92									***	***
W	nenaklíčené	celý profil hlízy	33,32										***