

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**DOKTORSKÁ DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Studium antimikrobiálních aktivit bílkovin a peptidů hlíz vybraných  
genotypů brambor (*Solanum* spp.)**

Ing. Andrea Vlačihová

**2016**

**Školitel: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.**

**Školitel specialista: Ing. Veronika Bártová, Ph.D.**

## **Dedikace**

Výsledky uvedené v této disertační práci vznikly za finanční podpory grantů NAZV QI91A069, GA ČR 522/09/1693 a GA JU 058/2013 Z, GA JU 065/2013 Z a GA JU 030/2012 Z.

V první řadě bych ráda vyjádřila velké poděkování svému školiteli **doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D.** za cenné rady a odborné vedení, které mi poskytnul během řešení této práce a během celého mého doktorského studia.

Dále bych ráda poděkovala také **Ing. Veronice Bártové, Ph.D.** za odbornou pomoc a cenné rady, které mi poskytovala při řešení této práce.

Mé poděkování za trpělivost, neúnavnou motivaci a materiální podporu v době studia patří mým drahým rodičům, babičce, sestře a mému manželovi.

Poděkování patří také mé kolegyni a kamarádce Ing. Adéle Stupkové, Ph.D. za odbornou pomoc v laboratoři a pozitivní přátelskou atmosféru ve společné kanceláři a ve volném čase.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci uvedené literatury.

.....

V Českých Budějovicích dne 1. 10. 2016

## Souhrn

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) je čtvrtou nejpěstovanější plodinou na světě a to především jako plodina bohatá na škrob. Hlízy bramboru jsou však zajímavé i z hlediska obsahu bílkovin, které hrají důležitou roli v obraně hlíz proti patogenům.

Tato disertační práce je souborem původních prací zabývajících se způsoby metod izolace a identifikace hlízových bílkovin, především inhibitorů proteas, a detekce jejich účinků na růst mycelia houbových fytopatogenů pomocí mikrobiologických testů *in vitro* s využitím objektivního hodnocení tohoto vlivu pomocí počítačového software.

První publikovaná práce s názvem „Antifungální potenciál nízkomolekulárních proteinů a peptidů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.)“ se zabývala antifungálními účinky skupiny termostabilních bílkovin a peptidů s převahou inhibitorů proteas, které byly izolovány z hlízové vody kombinací metod snížení pH a vysoké teploty (100°C). V této práci byly identifikovány izolované bílkoviny analýzou SDS-PAGE v oblasti výskytu inhibitorů proteas (oblasti 14 kDa a 6 kDa), které byly následně testovány na zachování antimikrobiálních aktivit vůči patogenním houbám *Fusarium solani* (kmeny CCM 1036; 8014; 8079) a *Fusarium oxysporum* (kmeny CCM 17; F-65) při různých koncentracích izolátu (10 mg/ml; 5 mg/ml; 1 mg/ml). V této práci byla ověřena hypotéza, že izolované bílkoviny si i přes expozici teplotě 100°C zachovaly své antifungální účinky, neboť byla pozorována inhibice růstu mycelia u všech testovaných fytopatogenních hub s různou citlivostí ke koncentracím při expozici k testované látce 48 hodin (při kultivační teplotě 26°C).

Většina publikovaných prací se zabývala izolací a detekcí intracelulárních bílkovin z hlíz bramboru vykazujících termostabilní vlastnosti, nicméně téma bylo rozšířeno i o studium izolace a identifikace extracelulárních bílkovin a to v práci „Postup izolace frakcí extracelulárních proteinů hlíz bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.)“, která se zabývala optimalizací metody izolace těchto bílkovin a metodami identifikace získaných bílkovin.

V rámci této disertační práce byla optimalizována metoda izolace termostabilních bílkovin a peptidů jak z hlízové vody vznikající při procesu průmyslového zpracování brambor na škrob (směs odrůd), tak z hlízové šťávy vyrobené v laboratorních podmínkách z konkrétních odrůd bramboru (odrůdová šťáva) a byla zjištěna optimální teplota pro izolaci těchto bílkovin pro maximální antifungální účinek (80°C). Tyto poznatky jsou shrnuty v užitém vzoru s názvem „Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností“. Byly navzájem porovnávány antimikrobiální účinky izolovaných směsí bílkovin a peptidů z hlíz vybraných odrůd bramboru na fytopatogenních kmenech hub rodů *Fusarium* spp. a *Rhizoctonia* spp. Dále bylo optimalizováno testování antimikrobiálních bílkovin na fytopatogenních kmenech hub abakterií *in vitro* a vyvinuta metoda vyhodnocování inhibičních účinků pomocí zpracování fotografií testů v počítačovém programu AutoCAD.

Poznatky získané při řešení problematik této disertační práce je možné aplikovat v oblastech šlechtění nových odrůd bramboru, rostlinolékařství, potravinářství, biotechnologiích a v oblasti zpracovatelského průmyslu při dalším využívání odpadů z průmyslové výroby škrobu (hlízová voda).

## Summary

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth most often planted crop in the world especially because of high content of starch. However potato tubers are also interesting due to the protein content that play an important role in defence of the tubers against pathogens.

This doctoral thesis is a summary of original works dealing with various methods of isolation and identification of tuber proteins, especially protease inhibitors, and detection of their effects acting on mycelium of fungus pathogens via *microbiological in vitro* tests and the effect was evaluated in software.

The first published work „Antifungal potential of low molecular proteins and peptides gained from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.)“ deals with antifungal activities of group of thermostable proteins and peptides with a predominance of protease inhibitors recovered from potato fruit juice. Combination of pH adjustment and high temperature (100°C) was used for protein isolation. Isolated proteins were detected in the SDS-PAGE analysis on peptide gel in range of protease inhibitors appearance (range 14 kDa and 6 kDa). The antimicrobial activities of this proteins and peptides mixture was tested on phytopathogenic fungi *Fusarium solani* (CCM strains 1036; 8014; 8079) and *Fusarium oxysporum* (CCM strains 17; F-65) in different concentrations (10 mg/ml; 5 mg/ml; 1 mg/ml). The hypothesis that isolated proteins retained their antifungal activity in spite of exposure to a temperature of 100°C was tested in this work and inhibition of mycelial growth of all tested phytopathogenic fungi was observed with different sensitivity to tested concentrations upon exposure to a tested substance 48 hours (at cultivation temperature 26°C).

The majority of published contributions was dealing with isolation and detection of intracellular proteins from potato tubers featuring thermostable properties nevertheless the topic was extended of studying the methods of isolation and identification of extracellular proteins in contribution named “Isolation of extracellular protein fractions from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.)“. This article contains the optimised isolation and identification methods of this type of proteins.

In the work carried out in this doctoral thesis was optimised the isolation method of thermostable proteins and peptides from potato fruit juice produced during the industrial potato starch process (cultivar mixture) and from potato fruit juice prepared from particular potato cultivars in laboratory (individual cultivar juice). Optimal temperature for this type of protein isolation was determined to gain the maximal antifungal effect (80°C). These knowledge were summarized in the utility model “Potato protein isolate with antimicrobial effect”. Reciprocal comparison of antimicrobial effect of isolated protein and peptide mixtures prepared from particular potato tuber cultivars was tested on phytopathogenic fungi *Fusarium* spp. and *Rhizoctonia* spp. *In vitro* tests of antimicrobial proteins on phytopathogenic fungi and bacteria was optimised and new method for inhibition effect evaluation by software AutoCAD was developed.

Knowledge gained within solving this doctoral thesis are possible to be used in new potato cultivars breeding, phytosanitary, food industry, biotechnologies and in the field of processing industry in the further utilization of wastes from industrial starch production (potato fruit juice).

## Prohlášení o impaktovaných a recenzovaných publikacích

Prohlašuji, že moje role na přípravě publikací a rukopisů publikací, jenž jsou uvedeny v kapitole „Přílohy“, byla následující:

### Recenzované publikace:

1. **Kamenová A.**, Bártová V., Bárta J. (2011): Antifungální potenciál nízkomolekulárních proteinů a peptidů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Úroda - vědecká příloha, 12: 213-216.

*Izolace bílkovin a peptidů z hlízové vody, očkování a pěstování fytopatogenních kmenů hub, testování antimikrobiálních aktivit in vitro, zpracování a interpretace výsledků, příprava publikace.*

2. Bártová V., Bárta J., **Kamenová A.**, Staňková A., Čurn V. (2012): Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinů a peptidů bramboru (*Solanum tuberosum* L.), Chemické Listy, 106: 365-372.

*Spolupráce při přípravě publikace.*

3. **Kamenová A.**, Bárta J., Bártová V. (2012): Hodnocení vlivu odrůdových rozdílů termostabilních proteinů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) na inhibici růstu vybraných druhů fytopatogenních hub. Úroda - vědecká příloha, 12: 61-66.

*Zpracování rostlinného materiálu, izolace termostabilních bílkovin, očkování a pěstování fytopatogenních kmenů hub, testování antimikrobiálních aktivit in vitro, zpracování a interpretace výsledků, příprava publikace.*

4. **Kamenová A.**, Bártová V., Bárta J. (2013): Postup izolace frakcí extracelulárních proteinů hlíz bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.). Úroda vědecká příloha 12: 206-209.

*Zpracování rostlinného materiálu, izolace frakcí extracelulárních bílkovin pomocí FPLC, detekce bílkovin na 1D SDS-PAGE, interpretace výsledků, příprava publikace.*

5. **Kamenová A.**, Bártová V., Bárta J. (2013): The assessment of thermostable proteins gained from different potato tuber cultivars (*Solanum tuberosum* L.) and their influence on growth inhibition of selected phytopathogenic fungi. In: Součková H. (Ed.) Potato Agrophysiology 2013: proceedings of the 2nd International Symposium on Agronomy and Physiology of Potato: 15-19 September 2013, Czech Republic, VÚBHB, 24-29.

*Zpracování rostlinného materiálu, izolace termostabilních bílkovin tepelnou koagulací, očkování a pěstování fytopatogenních kmenů hub, in vitro testování antimikrobiálních aktivit, zpracování a interpretace výsledků, příprava publikace.*

6. Bárta J., Bártová V., Brabcová A., Diviš J., Horáčková V., **Kamenová A.**, Zdráhal Z. (2015): Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*, Kurent České Budějovice, 142.

*Zpracování rostlinného materiálu, izolace hlízových inhibitorů proteas, očkování a pěstování fytopatologických kmenů hub, in vitro testování antimikrobiálních aktivit, zpracování a interpretace výsledků, fotodokumentace antimikrobiálních testů.*

### **Certifikovaná metodika:**

7. Bárta J., Bártová V., Zdráhal Z., Brabcová A., **Kamenová A.**, Diviš J. (2013): Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor. Certifikovaná metodika. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 39 s.

*Spolupráce při přípravě rostlinného materiálu, při separaci bílkovin a optimalizaci postupů a metod měření a hodnocení aktivit inhibitorů proteas. Spolupráce při optimalizaci a přípravě imitace tepelného koagulátu a spolupráce při přípravě publikace.*

### **Užitný vzor:**

8. Bárta, J., Bártová V., **Kamenová A.**, Zdráhal Z., Brabcová A., Čurn V. (2012) Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností. Česká republika. Užitný vzor, CZ23983U1. Zapsáno 18. 6. 2012.

*Zpracování hlízové šťávy, izolace bílkovin a jejich testování na fytopatogenních kmenech hub, spolupráce při přípravě užitného vzoru.*

Za spoluautory pravdivost prohlášení potvrzují:

doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Ing. Veronika Bártová, Ph.D.

V Českých Budějovicích dne 1. 10. 2016

## Řešené granty

Individuální grant GA JU (065/2013/Z) „Odrůdová variabilita extracelulárních antimikrobiálních proteinů bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) a hodnocení jejich aktivit na vybraných kmenech fytopatogenních bakterií“.

Individuální grant GA JU (030/2012/Z) „Hodnocení vlivu odrůdových rozdílů termostabilních proteinů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) na inhibici vybraných proteas a ověření antimikrobiální aktivity na vybraných kmenech fytopatogenních hub“.

Týmový grant GA JU (058/2013/Z) „Biologicky aktivní látky v potravinách a zemědělských surovinách“.

Výzkumný projekt NAZV (QI91A069) „Hodnocení potenciálu proteinů planých genotypů brambor pro využití ve šlechtění bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a v biotechnologiích“.

Členka řešitelského týmu výzkumného projektu GAČR (522/09/1693) „Úloha antimikrobiálních peptidů v ochraně rostlin proti patogenům“.



# Obsah

<b>OBSAH.....</b>	<b>9</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>12</b>
2.1. BRAMBOR HLÍZNATÝ ( <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> L.) – CHARAKTERISTIKA .....	12
2.1.1 <i>Produkce a spotřeba brambor – vývoj a trendy.....</i>	12
2.1.2 <i>Původ bramboru, původní genotypy a šlechtění nových odrůd s využitím primitivních genotypů.....</i>	13
2.2 SEKUNDÁRNÍ PRODUKTY VZNIKAJÍCÍ PŘI ZPRACOVÁNÍ BRAMBOR PŘI VÝROBĚ ŠKROBU ..	15
2.2.1 <i>Hlízová voda.....</i>	16
2.2.2 <i>Zdrtky .....</i>	17
2.3. HLÍZOVÉ BÍLKOVINY .....	18
2.3.1. <i>Bílkoviny patatinového komplexu.....</i>	20
2.3.2. <i>Inhibitory proteas.....</i>	20
2.3.3. <i>Ostatní hlízové bílkoviny .....</i>	23
2.4. FUNKCE A VLASTNOSTI INHIBITORŮ PROTEAS V ROSTLINÁCH .....	23
2.4.1. <i>Antimikrobiální vlastnosti .....</i>	24
2.4.2. <i>Insekticidní vlastnosti .....</i>	25
2.4.3. <i>Antikancerogenní vlastnosti .....</i>	26
2.4.4. <i>Termostabilita .....</i>	26
2.5. METODY IZOLACE A PURIFIKACE VYBRANÝCH SKUPIN HLÍZOVÝCH BÍLKOVIN – LABORATORNÍ METODY A METODY POUŽÍVANÉ V PROVOZNÍ PRAXI .....	26
2.5.1. <i>Metody izolace bílkovin používané v laboratorních podmínkách.....</i>	27
2.5.2. <i>Metody izolace bílkovin používané v provozní praxi .....</i>	28
2.5.3. <i>Materiál používaný pro izolaci hlízových bílkovin v laboratorních podmínkách..</i>	31
2.5.3.1. <i>Metody izolace bílkovin z lyofilizovaných hlíz .....</i>	31
2.5.3.2. <i>Metody izolace bílkovin z hlízové šťávy .....</i>	31
2.6. NEJČASTĚJI POUŽÍVANÉ METODY PRO IDENTIFIKACI BÍLKOVIN V DNEŠNÍ DOBĚ .....	32
2.7. MOŽNOSTI VYUŽITÍ BÍLKOVINNÝCH IZOLÁTŮ A KONCENTRÁTŮ Z BRAMBOR V PRAXI ....	32
2.7.1. <i>Potravinářství.....</i>	32
2.7.2. <i>Zemědělství.....</i>	32
2.7.3. <i>Kosmetický průmysl.....</i>	33
2.7.4. <i>Medicína.....</i>	33
<b>3. CÍLE A HYPOTÉZY PRÁCE .....</b>	<b>34</b>
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>35</b>
4.1. RECENZOVANÉ PUBLIKACE.....	35
4.1.1. <i>Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinů a peptidů bramboru (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....</i>	35
4.1.2. <i>Antifungální potenciál nízkomolekulárních proteinů a peptidů hlíz bramboru (<i>Solanum tuberosum</i> L.) izolovaných z hlízové vody.....</i>	44
4.1.3. <i>Hodnocení vlivu odrůdových rozdílů termostabilních proteinů hlíz bramboru (<i>Solanum tuberosum</i> L.) na inhibici růstu vybraných druhů fytopatogenních hub.....</i>	49
4.1.4. <i>Postup izolace frakcí extracelulárních proteinů hlíz bramboru hlíznatého (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....</i>	56

4.1.5. <i>The assessment of thermostable proteins gained from different potato tuber cultivars (Solanum tuberosum L.) and their influence on growth inhibition of selected phytopathogenic fungi</i> .....	61
4.1.6. <i>Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu Solanum</i> .....	68
4.2. CERTIFIKOVANÁ METODIKA .....	77
4.2.1. <i>Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor</i> .....	77
4.3. UŽITNÝ VZOR .....	94
4.3.1. <i>Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností</i> .....	94
4.4. RUKOPIS PUBLIKACE PŘIPRAVENÉ DO TISKU .....	100
4.4.1. <i>Recovery of thermo resistant potato proteins and their antifungal inhibition influence on Fusarium spp. mycelium growth</i> .....	100
<b>5. ZÁVĚR</b> .....	<b>118</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A OSTATNÍCH ZDROJŮ</b> .....	<b>121</b>

# 1. Úvod

Tématem disertační práce bylo studium bílkovin a peptidů vyskytujících se v hlízách bramboru a to především z hlediska jejich zastoupení v hlízách bramboru v souvislosti s biochemickými a antimikrobiálními vlastnostmi inhibitorů proteas, na které se disertační práce orientovala. Zaměření disertační práce je cíleno na ucelení poznatků o celkovém popisu základních vlastností a identifikace těchto skupin hlízových bílkovin a peptidů, o materiálech, které je možné pro jejich získání použít, teoretických izolačních metodách vycházejících z vlastností hlízových bílkovin a peptidů, metodách používaných v praxi a aktuálním praktickém využití izolátů skupiny inhibitorů proteas. Práce je zakončena získanými výsledky, které byly zaměřeny na popis izolovaných skupin inhibitorů proteas a jejich antimikrobiálních účinků.

Brambory jsou významnou surovinou celosvětově produkovanou v objemu více než 385 milionů tun za rok 2014 (zdroj FAOSTAT, 2016a) a v současné době oblíbenou pro svou nutriční vyváženost a vysokou výživovou hodnotu a i když jsou považovány z nutričního hlediska za sacharidickou složku lidské stravy, hrají brambory důležitou roli i jako zdroj bílkovin hlavně v zemích s tradicí konzumace brambor a v chudých částech světa trpících nedostatkem bílkovin obsažených v rostlinných zdrojích (luštěniny) a vysokobílkovinné živočišné stravě.

Bílkoviny a peptidy obsažené v hlízách bramboru se v posledních letech dostávají do popředí zájmu mnohých výzkumných organizací, potravinářských a škrobářských firem. Důvodem zájmu o tuto skupinu látek jsou především jejich zajímavé biologické a chemicko-fyzikální vlastnosti, které je možné snadněji zkoumat a verifikovat díky moderním a snadněji dostupným metodám jejich výzkumu. Zároveň tvořila skupina hlízových bílkovin a peptidů do nedávné doby součást téměř nevyužívaného odpadu, tzv. hlízové vody, která vznikala při zpracování hlíz brambor především na bramborový škrob. Tato situace se začíná měnit díky globální snaze o snižování ekologické zátěže ve výrobních procesech a zvyšování využitelnosti veškerých vedlejších produktů vznikajících během produkce finálních výrobků. Do popředí výzkumu se dostala hlízová voda, která vzniká jako sekundární produkt procesu výroby bramborového škrobu a obsahuje skupiny bílkovin, které v samotných hlízách bramboru hrají zásobní, ochranné a enzymatické role, a které si při šetrné izolaci a vhodném uskladnění zachovávají své biologické aktivity.

Cílem této disertační práce byla optimalizace metod izolace a studium a hodnocení biochemických a antimikrobiálních aktivit a vlastností bílkovin a peptidů obsažených v hlízách bramboru hlíznatého a optimalizace metod testování těchto skupin bílkovin a peptidů. Zdroje zkoumaného materiálu byly dva: a) bílkoviny a peptidy, které jsou součástí sekundárních produktů vznikajících během procesu průmyslového zpracování brambor na škrob, b) porovnání vybraných skupin bílkovin izolovaných vždy jen z jedné odrůdy bramboru hlíznatého (jedno odrůdová hlízová šťáva). Tepelnou koagulací takto získaných bílkovin a peptidů z hlízové šťávy a jejich aplikací k fytopatogenním mikroorganismům byl následně sledován jejich účinek na různé kmeny fytopatogenních hub a bakterií.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) – charakteristika

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) je čtvrtou nejvýznamnější pěstovanou základní plodinou a zlepšující rostlinou osevních sledů. Původní domovina divokých brambor je lokalizována od oblasti jihozápadu Spojených států až po jižní a střední Chile s centry druhové diverzity v centrálním Mexiku a ve středních Andách v Peru a Bolívii, zatímco primitivní kultivary jsou původem z Jižní Ameriky (Vokál *et al.*, 2013).

#### 2.1.1 Produkce a spotřeba brambor – vývoj a trendy

Jak již bylo zmíněno v úvodu, brambory byly celosvětově vyprodukovány v celkovém objemu více než 385 milionů tun za rok 2014 a do tohoto časového období prošlo toto odvětví velkými změnami (spotřeba brambor od roku 1961 do roku 2011 v tabulce 1). Do počátku 90. let 20. století byly brambory většinou produkovány a konzumovány v Evropě, Severní Americe a zemích Sovětského svazu a jejich produkce od této doby vzrůstala na základě zvyšující se poptávky v Asii, Africe a Jižní Americe z 32 milionů tun na počátku 60. let na více než 233 milionů tun v roce 2014. Dle údajů FAO produkce brambor v rozvojových zemích poprvé převýšila produkci v rozvinutých zemích světa v roce 2005 (zdroj FAOSTAT, 2016a). V současné době je tato plodina pěstována téměř po celém světě a za největšího producenta je označována Čína následovaná Indií, z jejichž produkce dohromady pocházela v roce 2013 téměř polovina produkce všech brambor a jako další v pořadí byli producenti pocházející ze zemí Ruské federace, Ukrajiny, USA, Německa a Polska (zdroj FAOSTAT, 2016b).

Česká republika následuje celosvětový trend poklesu objemu produkce, která koreluje s poklesem pěstitelských ploch brambor. Dle FAO byla produkce v ČR v roce 2014 na úrovni 697 539 t (178 817 tun na Slovensku v témže roce), v Československu pak v roce 1961 5,33 milionu t. Zároveň je díky moderním pěstebním technologiím a aktuálním vědeckým poznatkům následován trend zvyšujícího se výnosu, který byl dle údajů FAO v Československu v roce 1961 jen 10,4 t/ha a dle údajů ČSÚ v roce 2011 v České republice 29 t/ha, což bylo v daném roce ovlivněno především příznivými klimatickými podmínkami na našem území (Žižka, 2015). Tento výnos z roku 2014 je nad celosvětovým průměrným výnosem asi o 9 t/ha (FAOSTAT, 2016c).

Tabulka 1: Spotřeba brambor podle světadílů v roce 1961 a 2011 (FAOSTAT, 2015a; 2015b)

Světadíl	Populace (tis. lidí)	Spotřeba brambor a výrobků z brambor za rok 1961		Spotřeba brambor a výrobků z brambor za rok 2011	
		Spotřeba na hlavu (kg)	Celková spotřeba (tis. t)	Spotřeba na hlavu (kg)	Celková spotřeba (tis. t)
Afrika	1 056 985	6,1	1 641	18,8	17 922
Amerika	952 500	36,8	15 885	36,4	34 444
Asie	4 210 004	9,4	15 765	28,9	121 051
Evropa	741 274	114,9	74 353	84,2	62 363
Oceánie	37 228	38,9	537	47,9	1 418
Svět	6 997 991	35,5	108 181	34,6	237 199

Brambor hlíznatý je jednoletá, nejčastěji vegetativně množena plodina, která je relativně snadno pěstovaná a dosahuje dobrých výnosů nutričně hodnotných hlíz na malé ploše půdy ve srovnání s ostatními pěstovanými plodinami a to při možnosti pěstování ve velice rozdílných podnebních podmínkách na celém světě.

Konzumní odrůdy bramboru se primárně používají pro přímý konzum a zpracovávají se i na před smažené zmrazené, sušené, chlazené, sterilované a blanšované bramborové polotovary Tyto polotovary mají obvykle podstatně vyšší přidanou energetickou hodnotou a většinou obsahují i celou řadu aditiv jako např. různá barviva, konzervanty a stabilizátory. Četné odrůdy jsou ceněné díky optimálnímu poměru škrobu, vlákniny, bílkovin, minerálních látek a vitaminů.

Z odrůd brambor určených pro výrobu bramborového škrobu se v různých průmyslových odvětvích produkuje především škrob a líh. Od července roku 2012 přestala platit pravidla společné organizace trhu se škrobem, výrobní kvóty stanovené v EU a tedy i minimální výkupní cena brambor, která je od 1. dubna 2015 kompenzována formou zvláštní podpory na brambory pro výrobu škrobu poskytovanou SZIF (Státní zemědělský a intervenční fond) podle nařízení vlády č. 50/2015 Sb. o stanovení některých podmínek poskytování přímých plateb zemědělcům na produkci brambor konzumních a brambor na výrobu škrobu (se změnami tohoto nařízení Nařízením vlády č. 61/2016 Sb.) (Sbírka zákonů Česká republika, 2015).

V roce 2014 byla průměrná škrobnatost o 1,2 % nižší než v roce 2013, nicméně byla kompenzována velmi dobrou sklizní brambor pro výrobu bramborového škrobu, kdy byl v roce 2014 průměrný výnos škrobu 7,7 t/ha a v roce 2013 5,8 t/ha. V roce 2013 došlo ke zvýšení produkční plochy (o 685 ha) z důvodu zvýšení zájmu českých zemědělců o pěstování této komodity.

V České republice se zabývají výrobou škrobu pouze dva producenti – LYCKEBY AMYLEX, a.s. Horažďovice a Škrobárny Pelhřimov, a.s. (statistika výroby bramborového škrobu v ČR viz tabulka 2) a současně je neustále zvyšován podíl na českém trhu s bramborami pro výrobu škrobu rakouskou firmou Agrana Gmünd.

Tabulka 2: Statistika výroby bramborového škrobu v České republice v roce 2014 (Žižka, 2015)

Firma	Osázené plochy [ha]	Kontrahováno brambor [t]	Průměrný výnos brambor [t/ha]	Množství zpracovaných brambor [t]	Množství nakoupeného škrobu * [t]	Průměrná škrobnatost [%]
Škrobárny Pelhřimov, a. s.	1 573	52 379	40,3	63 371	12 635	17,0
LYCKEBY AMYLEX, a. s. **	2 253	83 953	40,5	91 350	18 313	17,1
Celkem	3 826	136 332	40,4	154 721	30 948	17,1

\* nakoupený = vyrobený škrob podle pravidel EU,

\*\* LYCKEBY AMYLEX, a.s. nakupuje brambory pro výrobu škrobu na území ČR a v Německu. V této tabulce je uvedený nákup brambor celkem.

### 2.1.2 Původ bramboru, původní genotypy a šlechtění nových odrůd s využitím primitivních genotypů

Brambory byly původně pěstovány v Andách na území dnešního Chile, Peru a Bolívie a do Evropy se dostaly v druhé polovině 16. století, kde se pěstovaly až do poloviny 17. století jako okrasné rostliny, zvláště v botanických zahradách (Vokál *et al.*, 2013). Vzhledem k rozdílným

podmínkám prostředí domoviny brambor získaly původní genotypy vysokou odolnost k extrémním podmínkám a vyvinula se u nich také rezistence k celé řadě škůdců a chorob a z těchto důvodů jsou původní genotypy používány ve šlechtění nových odrůd kulturního bramboru.

Taxonomie primitivních druhů bramboru je značně komplikovaná a stále dochází ke změnám v jejím uspořádání (Bradshaw and Ramsey, 2009). Hlízy vytvářející rostliny rodu *Solanum* byly domestikovány přibližně před 7000 lety (Simmonds, 1995) a daly vzniknout diploidnímu druhu *S. stenotomum*, od kterého se dále odvozovaly další kulturní druhy včetně tetraploidů *S. tuberosum* ssp. *andigena* a *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* a diploida *S. phureja* (Hawkes, 1990). Spooner a Hijmans (2001) uvádí ve své práci 6 kulturních druhů a 206 dalších druhů bramboru, které jsou nazývány wild potatoes, nebo také primitivní druhy, z nichž se některé v oblasti původního výskytu stále pěstují, v našich podmínkách určených pro pěstování běžných odrůd brambor však nedosahují ani zdaleka takových výnosů, jako je tomu v jejich původní domovině, což je pravděpodobně zapříčiněno především odlišnou délkou slunečního svitu.

Brambor hlízatý je teoreticky možné rozmnožovat a udržovat dvěma způsoby – generativně a vegetativně, prakticky ovšem možnosti rozmnožování vyplývají z tetrasomické dědičnosti kulturních odrůd bramboru, která se projevuje značnou proměnlivostí znaků a vlastností potomků semenných generací ze samoopylení a záměrného křížení. Z tohoto důvodu jsou tetraploidní druhy *S. tuberosum* rozmnožovány pouze vegetativně hlízami a tímto způsobem mohou být i udržovány. Generativní způsob množení je nezbytný v novošlechtění bramboru, aby došlo v semenné populaci k projevu kombinace vlastností rodičovských partnerů. Další rozmnožování vegetativním způsobem probíhá po podchycení jedinců se žádoucími vlastnostmi a díky tomu dochází k eliminaci heterozygotnosti a zachovávání vlastností F1 generace (Horáčková, Domkářová, 2005).

Ve Výzkumném ústavu bramborářském Havlíčkův Brod s.r.o., má práce s genofondy nepřetržitou tradici již od roku 1952 a v bance *in vitro* je dlouhodobě uchováváno 2439 vzorků, které reprezentuje 1258 odrůd *S. tuberosum*, 478 tetraploidních kříženců *S. tuberosum*, 271 dihaploidů, 313 genotypů od 5 kulturních a 23 planých druhů a 119 mezidruhových hybridů rodu *Solanum*. Jednostranná prošlechtěnost kulturního druhu *S. tuberosum* vyžaduje využívání planých druhů uchovávaných v genové bance *in vitro*, jedná se o druhy *S. acaule*, *S. bulbocastanum*, *S. demissum*, *S. chacoense*, *S. spegazzinii*, *S. stoloniferum*, *S. vernei*, dále o příležitostné využití *S. microdontum*, *S. sparsipilum*, *S. verrucosum*, *S. phureja*, *S. tuberosum* subsp. *andigena*, *S. commersonii* a *S. maglia* (Domkářová, Horáčková, 2013). Ve větší míře se uchovávání kolekcí bramboru prostřednictvím *in vitro* kultury začalo celosvětově využívat po roce 1970 a to hlavně z fytopatologických důvodů, neboť díky tomuto postupu byla umožněna záchrana materiálů zamořených virovými chorobami a zároveň se umožnilo i dosažení viruprostých rostlin kultur *in vitro* čímž došlo k rozvoji bezpečnější mezinárodní výměny genových zdrojů (Horáčková, Domkářová, 2005). Šlechtění nových odrůd s využitím primitivních druhů s požadovanými vlastnostmi se provádí jak fúzí protoplastů u vzdálených, obtížně křížitelných druhů, tak klasickou mezidruhovou hybridizací a vyvinutí jediné odrůdy metodou tradičního šlechtění může trvat až 15 let. Šlechtitelé vybírají rodiče a rodičovské kombinace s vynikajícími hospodářskými vlastnostmi pro určitý šlechtitelský cíl, dále se používá materiál s vyšší odolností vůči biotickým a abiotickým stresům (Domkářová, Horáčková, 2013). Několik příkladů využívaných vlastností primitivních druhů je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 4: Využívané plané a primitivní druhy *Solanum* ve šlechtění (Domkářová, Horáčková, 2013; Vokál et al., 2013).

Druh	Využívané vlastnosti					
	Zvyšování obsahu		Odolnost proti			
	Sušiny 30-37 %	Bílkovin 4-6 %	Mrazu až - 7°C	Plísni bramboru na nati ( <i>Phytophthora infestans</i> )	Virovým chorobám bramboru	Rakovině bramboru ( <i>Synchytrium endobioticum</i> )
<i>S. acaule</i>	ano	ne	ano	ne	ano	ne
<i>S. demissum</i>	ano	ano	ano	ano	ano	ano
<i>S. phureja</i>	ne	ano	ano	ne	ano	ne
<i>S. vernei</i>	ne	ne	ne	ano	ne	ano
<i>S. venturii</i>				ano		

Držiteli šlechtitelských práv k odrůdám zajišťuje ochrana práv výlučné právo k využívání chráněné odrůdy (tj. výroba nebo množení, úprava za účelem množení, nabízení k prodeji, prodej nebo jiné uvádění do oběhu, vývoz, dovoz, skladování pro některý z těchto účelů). V současné době je ve Státní odrůdové knize České republiky zapsáno 136 odrůd, z nichž je 31 odrůd velmi raných, 41 odrůd raných, 42 odrůd poloraných a 22 odrůd polopozdních až pozdních. V roce 2015 bylo registrováno pět nových odrůd bramboru (jedna velmi raná odrůda pro přímý konzum, varný typ B – Karo; dvě rané odrůdy pro přímý konzum, varný typ B Jasmina a varný typ BC Valmont; dvě odrůdy určené pro výrobu škrobu - poloraná odrůda Regent a pozdní odrůda Sarion) (Čermák, 2015).

Dle informací uvedených ve Společném katalogu odrůd druhů zemědělských rostlin, (EUR-LEX, 2015) bylo v zemích Evropské unie zapsáno celkem 1623 odrůd (k 4. 12. 2015), jejichž sadbu je možné uvádět do oběhu i na území ČR.

V roce 2016 uváděl International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA, 2016) celkem 45 geneticky modifikovaných odrůd bramboru, z nichž bylo 27 odrůd vyšlechtěno na rezistenci k chorobám, 4 odrůdy na rezistenci k herbicidům, 30 odrůd k rezistenci proti napadení hmyzem, 15 odrůd k rezistenci vůči virům a 1 odrůda k rezistenci vůči významnému původci plísni bramboru (*Phytophthora infestans*) - (některé odrůdy spadají díky kombinaci resistencí do více skupin).

## 2.2 Sekundární produkty vznikající při zpracování brambor při výrobě škrobu

Během technologického procesu zpracování brambor pro výrobu škrobu vznikají sekundární produkty (tabulka 3), které je možné alespoň částečně ještě dále zpracovat, využít jejich zbývající potenciál a snížit tak ekologickou zátěž (spotřeba elektrické energie a vody). V současné době se druhotné produkty vznikající při výrobě škrobu v České republice dále používají jako ne příliš hodnotné krmivo hospodářských zvířat (ve formě sušeného koncentrátu), zdroj organických látek pro výrobu bioplynu či jako hnojivo některých zemědělských plodin a při jejich uplatnění nedochází k plnohodnotnému využití všech cenných komponent.

Tabulka 3: Produkce sekundárních produktů při výrobě škrobu, převzato z Pastorek, Kára (2003).

Vyprodukovaný materiál	Výrobní sezóna				
	Srpen	Září	říjen	listopad	prosinec
Zpracované brambory [t]	7 450,35	23 462,06	26 245,80	24 323,02	7 405,17
Zdrtky [t]	1 656,00	5 214,00	5 832,00	5 405,00	1 646,00
Hlízová voda [m <sup>3</sup> ]	5 588,00	17 597,00	19 684,00	18 242,00	5 554,00

### 2.2.1 Hlízová voda

Hlízová voda, v anglickém jazyce se používá výraz potato fruit juice (PFJ), se skládá z vodorozpustné sušiny bramborových hlíz a vody a vzniká po rozdrčení hlíz brambor na struháku na tzv. třenku, která je, obvykle působením odstředivé síly, rozdělena na tuhou část (třenka) a tekutou část - hlízovou vodu. Složení hlízové vody závisí především na odrůdové kompozici zpracovávaného materiálu, vlivu podmínek a technologii pěstování (průměrné složení hlízové vody je uvedeno v tabulce 4).

V hlízové vodě je obsaženo průměrně asi 4,9 % sušiny (Bárta, Bártová, 2007), hodnota pH se pohybuje v rozmezí 5,6 – 6,0 (van Koningsveld, 2001) a je uváděno, že z jedné tuny brambor lze vyprodukovat asi 650 – 750 litrů hlízové vody (Straetkvern *et al.*, 1999).

Tabulka 4: Průměrné složení hlízové vody (sušina), převzato z van Koningsveld (2001).

Látka	Koncentrace v PFJ (g/l) (min.-max.)	% sušiny
Bílkoviny (N × 6,25)	13,4 (8,5 - 22,2)	26,8
Peptidy (N × 6,25)	2,2 (1,5 - 3,1)	4,4
Aminokyseliny a amidy (N × 6,25)	4,8 (3,3 - 7,8)	9,6
Další látky obsahující dusík	0,9	1,8
Sacharidy	7,9 (3,0 - 24,9)	15,8
Tuky	1,1	2,2
Citronová kyselina	5,0 (2,0 - 12,0)	10,0
Askorbová kyselina	0,3 (0,1 - 0,6)	0,6
Další organické kyseliny (jablčná, pyrrolidon karboxylová kyselina)	1,3 (0,7 - 5,4)	2,6
Chlorogenová kyselina	0,2 (0,1 - 0,5)	0,4
Kávová kyselina	0,07 (0,03 - 0,3)	0,1
Draslík	5,6 (3,9 - 7,3)	11,2
Fosfor	0,5 (0,2 - 0,9)	1,0
Další látky	5,0	10,1

Součástí hlízové vody jsou dusíkaté látky (bílkoviny, peptidy a volné aminokyseliny), jejichž obsah dohromady tvoří téměř 40 % sušiny a jsou tak nejvýznamnější složkou sušiny hlízové vody. Z volných aminokyselin je zastoupen glutamin, glutamová kyselina, asparagin a  $\gamma$ -aminomáselná kyselina, které nejsou součástí bílkovinných molekul a slouží jako zásobní dusíkaté látky v hlízách bramboru (Plieger, 1986). Sacharidy jsou v hlízové vodě zastoupeny redukujícími cukry D-glukózou a D-fruktózou a neredukujícím disacharidem sacharózou, lipidy tvoří v hlízové vodě celkem 2,2 % sušiny a jsou zastoupeny mastnými kyselinami (30 %), tuky (30 %) a fosfolipidy (40 %) (Lisinska, Leszczynski, 1989). Při zpracování brambor



přechází do hlízové vody i glykoalkaloidy, skupina steroidních glykosidů, z nichž mají v hlízách bramboru největší zastoupení  $\alpha$ -solanin a  $\alpha$ -chaconine, fenolové látky (kávová kyselina a chlorogenová kyselina), u nichž je známa schopnost vázat se na proteiny a významné zastoupení má v hlízové vodě i draslík, jehož obsah v sušině tvoří až 11 % (van Koningsveld, 2001).

V posledních letech se bílkoviny brambor dostali do popředí zájmu mnoha podniků na celém světě zabývajících se zpracováním brambor. Mezi nejvýznamnější producenty patří např. nizozemské společnosti Avebe, Meelunie B. V. a Royal Ingredients Group, největší německý producent Emsland Group a německá společnost Südstärke GmbH, dánské firmy AKV Langholt a KMC a finská firma Finnamyl Oy, součást koncernu CIBA (Raisio). V Norsku se zabývá produkcí bramborového proteinu spolu s produkcí škrobu společnost Hoff Norske PotetIndustrier, ve Francii společnosti Roquette a Tereos Syral, v Polsku se jedná o Zakłady Przemysłu Ziemniaczanego w Pile ZETPEZET Sp. Z o. o. V USA pak např. společnost Idaho Frank Associates / Lutos North America, která se zabývá zpracováním brambor na škrob, nativní bramborový protein, dehydrované bramborové produkty, mražené bramborové hranolky a bramborové speciality (Anonym 1, 2016).

Důvody zájmu těchto společností o bílkoviny získané z hlízové vody pramení z potřeby maximálně využít sekundární produkty, snížit tak ekonomickou a ekologickou zátěž, a využít významných zajímavých funkčních vlastností těchto bílkovin. Pozornost zpracovatelských závodů je na tyto sekundární produkty změřena i proto, že se množství těchto cenných bílkovin v sušině hlízové vody v průměru pohybuje kolem 27 % (viz tabulka 4), jejichž ideální izolace v nativním stavu je předmětem různých studií (van Koningsveld *et al.*, 2001a; Bártová, Bárta, 2009; Srætkvern, Schwarz, 2012; Waglay *et al.*, 2014) a při izolaci např. inhibitorů proteas v nativním stavu se odhaduje jejich cena na 100 €/kg, což je asi stonásobné zvýšení tržní hodnoty v současné době obchodovaných denaturovaných inhibitorů proteas (Schoenbeck *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Zdrtky

Zdrtky jsou tak jako hlízová voda součástí výrobního procesu škrobu z brambor, jedná se o vyluhované zbytky třenky, které nejčastěji nacházejí uplatnění jako součást krmiva pro dobytek, substrát pro pěstování hub či ve výrobě kosmetiky. Zbytek vyprodukovaného materiálu je použito jako půdní hnojivo, ačkoliv se může jednat o nevhodný způsob aplikace, protože vzhledem k vysokému obsahu minerálních solí ve zdrtcích může docházet k zasolování půdy a vody (Mayer a Hillebrandt, 1997). Složení zdrtek závisí na odrudovém složení zpracovávaného materiálu (průměrné složení bramborových zdrtek je uvedeno v tabulce 5).

Tabulka 5: Složení běžných bramborových zdrtek, převzato z Mayer a Hillebrandt, (1997).

Látka	Obsah v čerstvé hmotě zdrtek (%)	Obsah v sušině (%)
Sušina	13,0	-
Celkové organické látky	12,5	96
Popeloviny	0,5	4
Škrob	4,9	37
Celulóza	2,2	17
Hemicelulóza	1,8	14
Pektin	2,2	17
Vláknina (neurčená)	0,9	7
Bílkoviny, aminokyseliny	0,5	4

Zdrtky mají viskózní strukturu a vykazují vlastnosti podobné koloidním látkám a i po odstranění zbytkové hlízové vody mohou stále obsahovat až 95 % vody, díky čemuž se stávají živnou půdou pro mikroorganismy, zejména bakterie, což vede k rychlé degradaci materiálu za vzniku organických kyselin projevující se silným zápachem (Kempf, 1980). Největší zastoupení v sušině bramborových zdrtek má zbytkový škrob (37 % sušiny), který je vhodné odstranit pro zvýšení výtěžnosti bílkovin před jejich samotnou izolací (Waglay *et al.*, 2016).

### 2.3. Hlízové bílkoviny

Chemické složení hlíz bramboru a s ním spojená kvalita se mění v průběhu pěstování díky podmínkám prostředí. Největší roli hraje genetický původ odrůd, jako další vlivy jsou uváděny aplikace dusíkatých hnojiv, vlivy ročníku, stanoviště, způsob pěstování a skladování a stav hlíz (Bárta, Bártová, 2007) má a stárnutí během posklizňového skladování. Tabulka 6 uvádí průměrné látkové složení hlíz bramboru dle Bradshaw, Ramsay (2009) a Bárta (2009).

Tabulka 6: Průměrné látkové složení hlíz bramboru (Bradshaw, Ramsay 2009; Bárta, 2009).

Látka	Obsah v čerstvé hmotě
Voda	72 - 85 %
Sušina	15 - 28 %
Škrob	12,6 - 18,2 %
Dusíkaté látky	2 %
Bílkoviny	0,6 - 2,1 %
Tuky	0,075 - 0,2 %
Vláknina	1 - 2 %
Cukry	0,5 %
Vitamin C	8 - 54 mg/100 g
Glykoalkaloidy	< 20 mg/100 g

V sušině hlíz bramboru je obsaženo 3,5 % až 23 % hrubých bílkovin (N x 6,25), z nichž se samy bílkoviny pohybují v rozpětí od 35 % do 75 % v závislosti na odrůdě a podmínkách prostředí (Bárta, Bártová, 2007).

Lehesranta *et al.* (2006) provedli jedinečnou studii ucelených změn proteomu v průběhu životního cyklu hlíz bramboru a celkem 150 identifikovaných bílkovin vykazovalo velmi výrazné rozdíly v množství v konkrétních fázích životního cyklu hlíz a u dalších 50 identifikovaných bílkovin byly zjištěny menší změny v jejich množství. Vývojový proces hlíz byl charakterizován akumulací hlavní zásobní bílkoviny patatinu a jeho isoforem a enzymů podílejících se na obranných reakcích vůči onemocnění. Enzymy podílející se na metabolismu sacharidů a bílkovin a zpracování energie byly spojeny s vývojem hlíz a snížily se v průběhu jejich zrání.

I když nejsou brambory primárně považovány za plodiny s vysokým obsahem bílkovin, považují se bílkoviny v nich obsažené za velice kvalitní díky vysokému podílu esenciálních aminokyselin a to zvláště lysinu, metioninu, treoninu a tryptofanu (viz tabulka 7), které jsou svou kvalitou srovnatelné s vaječnými bílkovinami. Díky pokročilým metodám izolace těchto bílkovin se otevírají další možnosti jejich využívání jako produktů s přidanou hodnotou. Některé skupiny izolovaných bílkovin a peptidů hlíz brambor disponují zajímavými vlastnostmi, jako jsou např. antifungální, antibakteriální či antiinsekticidní aktivity a mohou tak

být cenné v případě použití jako náhrady za antibiotika díky jejich bezpečnosti či vlastnosti termorezistence izolovaných skupin bílkovin a peptidů.

Bramborové bílkoviny mají ve srovnání s ostatními rostlinnými bílkovinami vysokou nutriční hodnotu a to především díky jejich aminokyselinovému složení s relativně vysokým obsahem lysinu (7,5 %) (Pouvreau, 2004), největší zastoupení mají kyseliny asparagová a glutamová.

*Tabulka 7: Obsah aminokyselin v čerstvých hlízách bramboru (100 g) (National Nutrient Database for Standard Reference, USDA, 2016).*

Název aminokyseliny	Obsah aminokyselin [mg] ve 100 g syrových brambor se slupkou
<b>Esenciální aminokyseliny</b>	
Lysin	162
Valin	152
Arginin	159
Leucin	161
Fenylalanin	117
Treonin	95
Isoleucin	96
Tyrosin	94
Histidin	56
Metionin	44
Cystein	44
Tryptofan	24
<b>Neesenciální aminokyseliny</b>	
Asparagová kyselina	609
Glutamová kyselina	491
Serin	120
Alanin	111
Prolin	101
Glycin	90

Dle práce Pots (1999) byly hlízové bílkoviny rozděleny podle molekulové hmotnosti při elektroforetické separaci na 1-DE polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) do tří tříd (tabulka 8).

*Tabulka 8: Dělení hlízových bílkovin podle molekulové hmotnosti (Pots, 1999).*

Skupina	Molekulová hmotnost	Podíl v celkovém množství všech extrahovatelných bílkovin	Funkce v hlízách
Inhibitory proteas	3-25 kDa	20-30 %	Obranná
Patatin	kolem 43 kDa	20-60 %	Zásobní, enzymatická, obranná
Ostatní bílkoviny	45-600 kDa	20-30 %	Obranná, enzymatická

Údaje o podílu jednotlivých skupin extrahovaných bílkovin z hlíz bramboru se mezi autory liší, např. Pouvreau (2004) ve své práci uvádí, že inhibitory proteas reprezentují až 50 %

z celkového obsahu bílkovin v hlízové šťávě odrůdy Elkana. Tyto rozdíly mohou být zapříčiněny použitím odlišných odrůd, způsobem zpracování rostlinného materiálu (odstraněním slupky hlíz před zpracováním), rozdíly v technologii přípravy hlízové vody (mixování či lisování hlíz) či metodou stanovení koncentrace bílkovin (Lowryho metoda; přepočtem přes koeficient ze stanovení obsahu dusíkatých látek Kjeldahlovou metodou, či spektrometrické metody, atd.).

### 2.3.1. Bílkoviny patatinového komplexu

Bílkoviny patatinového komplexu jsou skupinou glykoproteinů, která se nevyskytuje pouze v zásobních orgánech bramboru, tedy v hlízách, ale byla popsána i v dalších orgánech, které se za zásobní nepovažují, např. ve stolonech, kořenech a květech (Höfgen, Willmitzer, 1990). Bílkoviny patatinového komplexu byly zařazeny do třídy globulinových bílkovin, které byly nazvány jako „tuberin“ (Osborne, Campbell, 1896). Následně byl v práci autorů Racusen, Foote (1980) představen glykoprotein o molekulové hmotnosti kolem 45 kDa, který představoval asi 20 % celkových rozpustných bramborových bílkovin a byl pro něj navržen triviální název „patatin“.

První myšlenka, že by patatin mohl vykazovat enzymové aktivity, byla uveřejněna ve studii Galliard (1971), který izoloval enzym z hlíz bramboru katalyzující deacylaci řady lipidových substrátů (mono- a diacylphospholipidy, galactosyl diglyceridy, mono- a diglyceridy) a následující studie (Racusen, 1984) prokázala, že izolovaným enzymem byl právě patatin, který prokazoval lipid acyl hydrolasovou aktivitu. V následujících letech byla Racusenem (1986) prokázána esterasová aktivita patatinu na celé řadě dalších substrátů. Další aktivity, které patatin vykazuje, jsou fosfolipasová a  $\beta$ -1,3-glukanasová, z nichž právě  $\beta$ -1,3-glukanasová aktivita pravděpodobně hraje důležitou roli v obraně proti houbovým patogenům narušením  $\beta$ -1,3-glukanů v buněčných stěnách hyf a také byla pozorována inhibice růstu larev bázlivce kukuřičného, *Diabrotica* spp., při speciální dietě těchto larev (Shewry, Lucas, 1997) a patatin tak v sobě nese zajímavý potenciál v podobě antimikrobiálních a insekticidních aktivit.

Jsou známé i studie zabývající se alergickými reakcemi dospělých lidí a dětí na konzumaci nebo kontakt kůže se syrovými bramborami (Majamaa *et al.*, 2001; Seppälä *et al.* 1999). Patatin tedy může být využit i jako vhodný indikátore pro stanovení zvýšené citlivosti na brambory při podezření na tzv. zkřížené reaktivity (Schmidt *et al.* 2002). V práci Koppelman *et al.* (2002) bylo potvrzeno, že tepelné zpracování brambor vede ke snížení míry alergie, které je spíše způsobeno shlukováním patatinu s ostatními hlízovými bílkoviny než denurací samotného patatinu. Struktura patatinu je taktéž narušena v prostředí s hodnotou pH nižší než 5 a při tepelném zpracování dochází k rozbalení molekuly patatinu, které je téměř nevratné a dochází k úplné ztrátě enzymatické aktivity (Pots, 1999).

Výsledky studií ukázaly, že vlastnosti patatinu je možné úspěšně využít i v potravinářství, např. jeho schopnost vázat fenolické sloučeniny a stát se tak vhodnou alternativou k živočišným bílkovinám pro čiření červených vín (Gambuti *et al.*, 2012), či schopnost tvorby stabilních pěn a emulzí, která může v optimálních podmínkách dosáhnout úrovně vaječného standardu (Ralet, Guéguen, 2001).

### 2.3.2. Inhibitory proteas

Inhibitory proteas (PIs) jsou heterogenní skupinou bílkovin, která se běžně vyskytuje v celé řadě organismů od mikroorganismů, rostliny až po živočichy (Habib, Fazili, 2007; Valueva, Mosolov, 2004; Supuran *et al.*, 2002). Inhibitory proteas představují rozsáhlou a složitou skupinu bílkovin, které jsou schopny tvořit komplexy s proteasami, které následkem této reakce ztrácí svou aktivitu. Přirozeně se vyskytující proteolytické enzymy katalyzují štěpení molekuly bílkoviny na menší řetězce v místech peptidových vazeb až na jednotlivé

aminokyseliny. Proteolýza je klíčový proces všech živých organismů a je tak nezbytná jejich regulace (Pouvreau, 2004; Hraška *et al.*, 2006, Turk *et al.*, 2012).

Inhibitory proteas byly podle práce Jongasma (1995) klasifikovány na principu aktivního místa, které v protease inhibují a to na serinové, cysteinové, aspartátové a metalloproteasové. Některé bílkoviny inhibují i více, než jednu proteasu (např. potato Kunitz protease inhibitors) a proto se používá novější dělení dle práce Pouvreau (2004) do sedmi skupin podle molekulové hmotnosti, počtu disulfidických můstků, struktury molekul (monomerní nebo multimerní) a isoelektrického bodu. Na základě těchto údajů jsou inhibitory proteas řazeny do jednotlivých tříd (tabulka 9).

Tabulka 9: Klasifikace rostlinných inhibitorů proteas do sedmi skupin dle Pouvreau (2004).

Název IPs	Molekulová hmotnost [kDa]	Rozmezí pH isoelektrického bodu	Popis skupiny
<u>Potato Inhibitor I (PI-1)</u>	7,7-7,9	5,1-7,8	Skupina serinových inhibitorů s pentamerní strukturou. V hlízové šťávě brambor odrůdy Elkana dosahuje 4,5 % z celkového obsahu bílkovin, které jsou zastoupeny třemi isoformami.
<u>Potato Inhibitor II (PI-2)</u>	20,7	5,5-6,9	Skupina serinových inhibitorů proteas s dimerní strukturou. V hlízové šťávě brambor odrůdy Elkana dosahuje 22 % z celkového obsahu bílkovin, které jsou zastoupeny sedmi isoformami.
<u>Potato Aspartate Protease Inhibitors (PAPI)</u>	19,9-22,0	6,2-8,7	Skupina inhibitorů aspartátových proteas s monomerní strukturou. V hlízové šťávě brambor odrůdy Elkana dosahuje 6 % z celkového obsahu bílkovin, které jsou zastoupeny šesti isoformami.
<u>Potato Cystein Protease Inhibitor (PCPI)</u>	20,1-22,8	5,8 - >9	Skupina inhibitorů cysteinových proteas s monomerní strukturou. V hlízové šťávě brambor odrůdy Elkana dosahuje 12 % z celkového obsahu bílkovin, které jsou zastoupeny osmi isoformami.
<u>Potato Kunitz Protease Inhibitors (PKPI)</u>	20,2	8,0 - >9	Skupina inhibitorů serinových proteas s monomerní strukturou. V hlízové šťávě brambor odrůdy Elkana dosahuje 4 % z celkového obsahu bílkovin, které jsou zastoupeny dvěma isoformami.

<u>Other Serine Protease Inhibitors (OSPI)</u>	21 (dimerní struktura)  21,8 (monomerní struktura)	8,8 (dimerní struktura)  7,5 (monomerní struktura)	Skupina inhibitorů serinových proteas zastoupena dvěma isoformami - s dimerní strukturou molekuly a isoformou s monomerní strukturou. V hlízové šťávě brambor odrůdy Elkana dosahují tyto dvě isoformy společně 1,5 % z celkového obsahu bílkovin.
<u>Potato Carboxypeptidase Inhibitors (PCI)</u>	4,3	4,6-6,5	Skupina inhibitorů metaloproteáz s monomerní strukturou molekuly. V hlízové šťávě brambor odrůdy Elkana dosahuje asi 0,9 % z celkového obsahu bílkovin, které jsou zastoupeny jednou isoformou.

Do skupiny inhibitorů serinových proteas přítomných v hlízách brambor je zahrnován PI-1, který byl poprvé popsán v práci autorů Ryan, Balls (1962). PI-1 je pentamerní protein s molekulovou hmotností 40 – 45 kDa (Melville, Ryan, 1972). Každá podjednotka (8 kDa) má jeden disulfidický (S-S) můstek a jsou to inhibitory vykazující inhibiční aktivity vůči enzymům trypsinu a  $\alpha$ -chymotrypsinu s mnohem menší afinitou k trypsinu (Pouvreau, 2004). Dalším inhibitorem řazeným do této skupiny je PI-2, který byl izolován i z rajčete jedlého (Taylor *et al.*, 1993). PI-2 je dimerická bílkovina s molekulovou hmotností 22 kDa obsahující v jedné podjednotce 16 cysteinových zbytků, ze kterých pouze 6 tvoří intramolekulární disulfidické můstky. PI-2 vykazuje inhibiční aktivitu vůči trypsinu,  $\alpha$ -chymotrypsinu a elastáze (Pouvreau, 2004). PKPI patří do velké skupiny bílkovin, které jsou ve většině případů monomerní, byly ale popsány i zástupci této skupiny, jejichž podjednotky jsou spojeny disulfidickým můstkem (Richardson, 1991). PKPI jsou bílkoviny se strukturou ze 170-190 aminokyselin, které obvykle mají 4 cysteinové zbytky, které spojují 2 disulfidické můstky. PKPI mají obvykle jedno aktivní místo (Richardson, 1991), ale byly popsány i PKPI se dvěma aktivními místy (Pouvreau, 2004). Specifita této skupiny inhibitorů je založena na umístění aminokyseliny v pozici P1, takže se inhibitory chovají jako pseudo-substrát (Sweet *et al.*, 1974). V práci Shah *et al.* (2016) byla izolována bílkovina se dvěma řetězci 15 kDa a 5 kDa, podobná s Kunitz-type inhibitoru serinových proteas (na základě analýzy MALDI-TOF/MS). Tato bílkovina byla nazvána PotHg a kromě inhibice trypsinu vykazovala i aktivitu podobnou inhibiční aktivitě lektinu (hemagglutinace).

Inhibitory cysteinových proteas, někdy nazývané také jako „Cystatin superfamily“, se nachází především v rostlinách, ale jsou přítomny i v tělech savců (Barret, 1987). V rostlinách *Solanaceae* byly popsány inhibitory řazené do tzv. Multicystatin family a Kunitz-type family. Inhibitory v Kunitz-type family vykazují podobnost s PKPI, např. bramborový inhibitor cysteinových proteas (Krizaj *et al.*, 1993), inhibují papain a někdy také i trypsin. Inhibitorem v Multicystatin family vyskytujícím se v hlízách bramboru je např. multicystatin, bílkovina s molekulovou hmotností 85 kDa (Walsh, Strickland, 1993).

Výskyt inhibitorů aspartátových proteas je na rozdíl od aspartátových proteas relativně vzácná. Nejvíce jsou tyto inhibitory prozkoumány právě u zástupců čeledi *Solanaceae* (Mareš *et al.*, 1989). Do této skupiny jsou řazeny inhibitory proteas s molekulovou hmotností 20 – 22 kDa a dvěma disulfidickými můstky, které ukazují sekvenční homologii s inhibitorem

Kunitzova typu. Všechny z nich jsou inhibitory aktivity katepsinu D a v některých případech i trypsinu (Pouvreau, 2004).

Čtvrtou skupinou jsou inhibitory metaloproteáz, jejichž nejprozkoumanějším zástupcem je inhibitor carboxypeptidázy (PCI) izolovaný z bramboru hlíznatého (Haas *et al.*, 1975; Molina *et al.*, 1994). PCI je malá bílkovinná molekula skládající se z 38-39 aminokyselinových zbytků, které mají 3 disulfidické můstky a jsou známe pro svou velkou teplotní odolnost (Huang *et al.*, 1981). V práci Lufrano *et al.* (2015) je popsán inhibitor metaloproteáz s názvem imaPCI izolovaný z hlíz *Solanum tuberosum*, subsp. *andigenum* cv. Imilla morada, který vykazuje 89% homologii primárních sekvencí s PCI (liší se ve 4 z 39 aminokyselinových zbytků).

### 2.3.3. Ostatní hlízové bílkoviny

Mezi ostatní hlízové bílkoviny jsou řazeny takové bílkoviny hlíz bramboru, které nedisponují vlastnostmi bílkovin patatinového komplexu, ani je nelze zařadit k inhibitorům proteas. Jedná se především o bílkoviny s vyšší molekulovou hmotností, kterými jsou lektiny a polyfenoloxidas, proteinkinasy a fosforylasy tvořící asi 10 % bílkovin izolovaných z průmyslové hlízové vody (Schoenbeck *et al.*, 2013).

Z této skupiny bílkovin je asi nejprozkoumanější lektin, bílkovina o molekulové hmotnosti 100 kDa, který je charakterizován jako glykoprotein vázající se na chitin, hrající svou roli v obranném mechanismu rostlin a mající schopnost způsobovat aglutinaci červených krvinek (Allen *et al.*, 1978). Polyfenoloxidas jsou enzymy o molekulové hmotnosti 60 a 69 kDa zodpovědné za hnědnutí dužniny hlíz brambor (Kim *et al.*, 2011). Proteinkinasy (140 kDa) jsou skupinou enzymů, které katalyzují přenos fosfátu z ATP na některé aminokyseliny v bílkovinách a jsou tak např. součástí systému kontroly buněčného cyklu (Scarpitta, Canavesi, Jegorov, 2011). Fosforylasy (180-600 kDa) se podílejí na syntéze škrobu (Green, Stumpf, 1942).

## 2.4. Funkce a vlastnosti inhibitorů proteas v rostlinách

Inhibitory proteas mají klíčový význam při regulaci enzymatických pochodů odpovídajících proteas a byly popsány jako běžně přítomné bílkoviny nejen zásobních orgánů (semen a hlíz), ale i v listech jako odpověď rostliny na napadení hmyzem, patogenními organismy či poranění (Garcia-Olmedo *et al.*, 1987; Ryan, 1990) a byla také potvrzena jejich přítomnost jako reakce rostliny na vodní stres (Downing *et al.*, 1992).

V případě, že inhibitory proteas dosahují podílu 5 % z celkových bílkovin, jsou inhibitory proteas řazeny i mezi zásobní bílkoviny. Mohou v hlízách a semenech rostlin sloužit jako důležitý zdroj aminokyselin obsahující síru a hrající významnou roli při dozrávání semen (Pusztai, 1972). Tuto teorii potvrzuje např. i práce Jongsmy (1995), ve které jsou inhibitory proteas popsány jako bílkoviny o nízké molekulové hmotnosti (3-13 kDa) bohaté na cysteinové zbytky (více než 20 %) a u bílkovin větších než 13 kDa obsahují pouze PI-2 a thaumatin (20 kDa) větší množství cysteinových zbytků a to méně než 10 %.

Třetí rolí je funkce regulátorů proteas během dormance semen, která byla studována na semenech salátu, a bylo zjištěno, že částečně purifikované bílkoviny zpomaloval v suchém osivu enzymovou aktivitu podobnou trypsinu (Shain, Mayer, 1965).

Funkce inhibitorů proteas v obranném mechanismu rostlin je celkem jasná, ale jejich role jako zásobních bílkovin je komplikovaná a to i díky tomu, že zrání je doprovázeno expresí celé řady různých inhibitorů proteas (McManus, 1999).

Inhibitory proteas jsou podle Jongsmy (1995) považovány za jednu z nejprozkoumanějších skupin bílkovin a je u nich popsáno hned několik velice zajímavých vlastností, které byly zkoumány v řadě prací.

#### 2.4.1. Antimikrobiální vlastnosti

Antimikrobiální aktivita hlízových bílkovin brambor byla prokázána u celé řady houbových a bakteriálních původců chorob rostlin,

Jedna z důležitých obranných strategií rostliny funguje na principu syntézy inhibičních polypeptidů způsobujících inhibici proteas důležitých pro trávení fytopatogena, zapříčiňující snížení dostupnosti aminokyselin důležitých pro růst a vývoj jeho organismu (Lawrence, Koundal, 2002). Poprvé byl tento mechanismus zaznamenán u rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.), které bylo napadeno fytopatogenem *Phytophthora infestans*. V rostlině bylo objeveno zvýšené množství inhibitorů trypsinu a chymotrypsinu, které souviselo s odolností rostliny vůči patogenu (Woloshuk *et al.*, 1991). Tato práce byla potvrzena v pracích Valueva *et al.* (1998, 2003), kde byl popsán stejný mechanismus hromadění serinových inhibitorů proteas o hmotnosti 20 až 24 kDa jako odpověď na mechanické poranění a infekci patogenem *Phytophthora infestans*.

Vzhledem k tomu, že inhibitory proteas mají jednu z klíčových rolí v obraně rostliny proti napadení, je snaha zmapovat spektrum mikroorganismů, na jejichž životní pochody mají inhibitory proteas vliv.

Následující tabulky 10 a 11 uvádí příklady mikroorganismů, na kterých byly úspěšně prováděny antifungální či antibakteriální testy s uvedením zdroje izolovaného inhibitoru proteas.

Tabulka 10: Houbové a kvasinkové patogeny a oomycety, na kterých byly úspěšně provedeny antimikrobiální testy s použitím inhibitorů proteas izolovaných z uvedených rostlin.

Mikroorganismus	Původ bílkoviny	Zdroj
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Wang, Rao, 2010
<i>Alternaria brassicae</i>	<i>Psoralea corylifolia</i>	Yang <i>et al.</i> , 2006
<i>Alternaria solani</i>	<i>Engelmannia pinnatifida</i> , <i>Solanum tuberosum</i>	Hyunth <i>et al.</i> , 1996
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Duan <i>et al.</i> , 2013
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Mucuna pruriens</i> , <i>Psoralea corylifolia</i>	Chandrashekharaiah, 2013
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Actinidia deliciosa</i> , <i>Phaseolus limensis</i> , <i>Solanum tuberosum</i>	Popovic <i>et al.</i> , 2012; Wang, Rao, 2010; Hermosa <i>et al.</i> , 2006
<i>Candida albicans</i>	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Capsicum chinense</i> , <i>Capsicum annuum</i> , <i>Ginkgo biloba</i>	Kim <i>et al.</i> , 2006, 2013; Dias <i>et al.</i> 2013, Ribeiro <i>et al.</i> , 2007, Sawano <i>et al.</i> , 2007
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2007
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Psoralea corylifolia</i> , <i>Engelmannia pinnatifida</i>	Sawano <i>et al.</i> , 2007; Yang <i>et al.</i> , 2006; Hyunth <i>et al.</i> , 1996
<i>Fusarium solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Guevara <i>et al.</i> , 2004, 2011
<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Ananas comosus</i>	Lopez-Garcia, Hernandez, Segundo, 2012



<i>Gaeumannomyces graminis</i>	<i>Engelmannia pinnatifida</i>	Hyunth <i>et al.</i> , 1996
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Capsicum chinense</i> , <i>Capsicum annuum</i>	Dias <i>et al.</i> 2013; Ribeiro <i>et al.</i> , 2007
<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Capsicum chinense</i> , <i>Capsicum annuum</i>	Dias <i>et al.</i> 2013; Ribeiro <i>et al.</i> , 2007
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Engelmannia pinnatifida</i>	Guevara <i>et al.</i> , 2004, 2011; Mendieta <i>et al.</i> , 2006; Hyunth <i>et al.</i> , 1996
<i>Phytophthora megasperma</i>	<i>Engelmannia pinnatifida</i>	Hyunth <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	<i>Psoralea corylifolia</i>	Yang <i>et al.</i> , 2006
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Kim <i>et al.</i> , 2005, 2006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Capsicum chinense</i> , <i>Capsicum annuum</i>	Dias <i>et al.</i> 2013; Ribeiro <i>et al.</i> , 2007
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Helianthus annuus</i> , <i>Engelmannia pinnatifida</i>	Giudici, Regente, Canal, 2000; Hyunth <i>et al.</i> , 1996
<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Ginkgo biloba</i>	Sawano <i>et al.</i> , 2007
<i>Trichoderma viridae</i>	<i>Mucuna pruriens</i>	Chandrashekharaiyah, 2013

Tabulka 11: Bakteriální patogeny, na kterých byly úspěšně provedeny antimikrobiální testy s použitím inhibitorů proteas izolovaných z uvedených rostlin.

Mikroorganismus	Původ bílkoviny	Zdroj
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Guevara <i>et al.</i> , 2011
<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>michiganense</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Kim <i>et al.</i> , 2005, 2006, 2013
<i>Escherichia coli</i>	<i>Lavatera cashmeriana</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Solanum tuberosum</i>	Rakashanda <i>et al.</i> , 2012; Kim <i>et al.</i> , 2006; Rehman, Khanum, 2011; Guevara <i>et al.</i> , 2011
<i>Klebsella pneumonia</i>	<i>Pisum sativum</i>	Rehman, Khanum, 2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Rehman, Khanum, 2011; Kim <i>et al.</i> , 2006
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Pisum sativum</i>	Rehman, Khanum, 2011
<i>Pectobacterium carotavorum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Guevara <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pisum sativum</i>	Rehman, Khanum, 2011
<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pisum sativum</i>	Rehman, Khanum, 2011
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Pisum sativum</i>	Kim <i>et al.</i> , 2006, 2013; Rehman, Khanum, 2011; Guevara <i>et al.</i> , 2011
<i>Staphylococcus epidermis</i>	<i>Pisum sativum</i>	Rehman, Khanum, 2011
<i>Streptomyces scabiei</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Guevara <i>et al.</i> , 2011

#### 2.4.2. Insekticidní vlastnosti

Inhibiční účinky inhibitorů proteas popsané na patogenech a býložravcích vedly vědce ke zkoumání jejich potenciálního vlivu na hmyz v transgenních rostlinách, ale do současné doby nebyly inhibitory využity v komerčních produktech insekticidů.

Inhibitory proteas mají negativní vliv na růst a vývoj larev motýlů a to tvorbou stabilních komplexů s trávicími proteasami, které zpozdí nebo blokují trávení bílkovin a omezují dostupnost esenciálních aminokyselin nezbytných pro růst, vývoj a reprodukci hmyzu (Stevens *et al.*, 2013). U některých druhů hmyzu byla pozorována zvláštní reakce na inhibici trávicích proteas a to nadměrnou produkcí těchto proteas, aby tak bylo umožněno trávení bílkovin (De Leo *et al.* 1998; Markwick *et al.* 1998) či produkce takových proteas, které byly k inhibitorům nesenzitivní (Dunse *et al.*, 2010) nebo produkce hmyzích proteináz, které jsou schopny inhibitory degradovat (Dunse, Anderson, 2011).

### 2.4.3. Antikancerogenní vlastnosti

Některé inhibitory proteas vykazují i vlastnosti týkající se potlačení bujení nádorových buněk. Byl popsán mechanismus účinku inhibitoru karboxypeptidázy (PCI), který se naváže na receptor epidermálního růstového faktoru (epidermální růstový faktor je bílkovina kontrolující velké množství různých procesů v buňkách a stimuluje např. i dělení buněk) a inhibuje aktivaci receptoru proteinu tyrosin kinázy, čímž v konečném důsledku způsobí zastavení nekontrolovaného růstu buněk, které jsou důležitým krokem pro rozvoj nádorového bujení (Blanco-Aparicio *et al.*, 1998; Sitja-Arnau *et al.*, 2010). Účinek tohoto inhibitoru byl zkoušen *in vitro* i na lidských pankreatických nádorových buňkách a prokazatelný inhibiční vliv na růst buněk byl pozorován již při koncentraci PCI 10  $\mu\text{g/ml}$  s maximálním inhibičním efektem při použití koncentrace 50  $\mu\text{g/ml}$  izolátu, při zvyšování koncentrace izolátu již nebylo pozorováno zesílení inhibičního efektu (Blanco-Aparicio *et al.*, 1998).

Huang *et al.* (1997) ve své práci prokázali, že PI-1 a PI-2 izolované z hlíz brambor po aplikaci na myši kožní buňky blokovaly aktivaci transkripčního faktoru aktivátorového proteinu-1 (AP-1), který se ukázal jako zodpovědný za vznik nádoru na savčích buňkách po jejich vystavení UV záření. V práci Graham *et al.* (1985) byl zaznamenán zvýšený obsah inhibitorů proteas v listech rostlin jako odpověď na silné UV záření.

### 2.4.4. Termostabilita

Tato významná vlastnost inhibitorů proteas je závislá na iontové síle-při nízké iontové síle (15 mM) denaturují (termokoagulují) bílkoviny při vystavení teplotě 58-71 °C, zatím co při 200 mM se dle van Koningsveld *et al.* (2001b) hranice teploty denaturace zvyšuje na 58-75 °C a většina inhibiční aktivity proteas vůči trypsinu a chymotrypsinu se ztrácí po 15minutové expozici teplotám mezi 55 °C a 70 °C. Existuje však několik inhibitorů proteas, které byly identifikovány jako teplotně stabilní.

V práci Ryan *et al.* (1976) byla studována tato vlastnost na třech inhibitech PI-1 (39 kDa), PI-2 (21 kDa) a CPI (4,1 kDa), které si své biologické vlastnosti zachovaly i po vystavení teplotě 80 °C po dobu 10 minut. Tyto inhibitory proteas byly izolovány z hlíz brambor odrůdy Russet Burbank a představovaly asi 7 % celkových rozpustných bílkovin hlízové šťávy. Kim *et al.* (2006) izolovali ze sušiny hlíz brambor odrůdy Golden Valley antimikrobiální peptid o molekulové hmotnosti 5,6 kDa, který nazvali „Potide-G“ a který kromě zmíněných antimikrobiálních vlastností (seznam patogenů uveden v tabulkách 10 a 11) vykazoval termostabilitu při vystavení teplotě 70 °C po dobu 20 minut.

## 2.5. Metody izolace a purifikace vybraných skupin hlízových bílkovin – laboratorní metody a metody používané v provozní praxi

Proteiny jsou z rostlinných tkání izolovány z mnoha důvodů, např. pro fyziologické studie testovaných enzymů, purifikaci proteinů za účelem jejich genetické identifikace či identifikace pomocí SDS-PAGE. Rostlinné buňky mají v porovnání se živočišnými buňkami velké vakuoly, které obsahují sekundární rostlinné produkty (zejména fenolické látky a polyfenoly), organické kyseliny a proteinázy. Zpracováním rostlinného materiálu

(mechanickým, fyzikálním či chemickým) dochází k narušení stěn vakuol a k uvolnění jejich obsahu, který může modifikovat, inaktivovat, srážet či degradovat proteiny (Laing, Christeller, 2004).

V poslední době se pracuje na optimalizaci celé řady speciálních metod izolace a purifikace vybraných skupin hlízových bílkovin, aby nedocházelo k výše uvedeným reakcím s obsahem vakuol. Tyto metody vychází z požadavků na finální bílkovinný izolát (denaturovaná vs. nativní bílkovina) tak, aby zůstaly zachovány všechny požadované vlastnosti a nutriční hodnoty izolovaných bílkovin, z provozní kapacity pracoviště (laboratoř vs. provozní praxe), se kterou souvisí i povaha vstupní suroviny (hlízy bramboru vs. sekundární produkty provozu). Všechny tyto požadavky mezi sebou navzájem souvisí. Některé postupy používané v provozní praxi je možné aplikovat a simulovat přizpůsobenou metodiku i v laboratorních podmínkách, např. pro ověření, optimalizaci či rozšíření dosavadních znalostí dané oblasti a naopak je snaha aplikovat v laboratoři vyvinuté metody do praxe, s ohledem na ekonomickou udržitelnost celého procesu.

V této práci bylo přistoupeno k rozdělení postupů na metody nejčastěji používané v laboratorních podmínkách a v podmínkách provozní praxe:

### **2.5.1. Metody izolace bílkovin používané v laboratorních podmínkách**

Laboratorní metody se využívají hlavně z důvodů izolace bílkovin v menších množstvích, především za účelem ověření a optimalizace dané metody či pro získání menších množství bílkovinného izolátu s obvykle vysokými kvalitativními vlastnostmi jako je čistota izolátu a zachování funkčních vlastností izolovaných skupin bílkovin.

#### **2.5.1.1. Chromatografické metody**

Pro izolaci hlízových bílkovin se používají chromatografické metody, jejichž optimalizace by zajistila šetrnou separaci bílkovin v nativní formě, která by mohla nahradit postupy, během kterých dochází k denuraci získaných bílkovin.

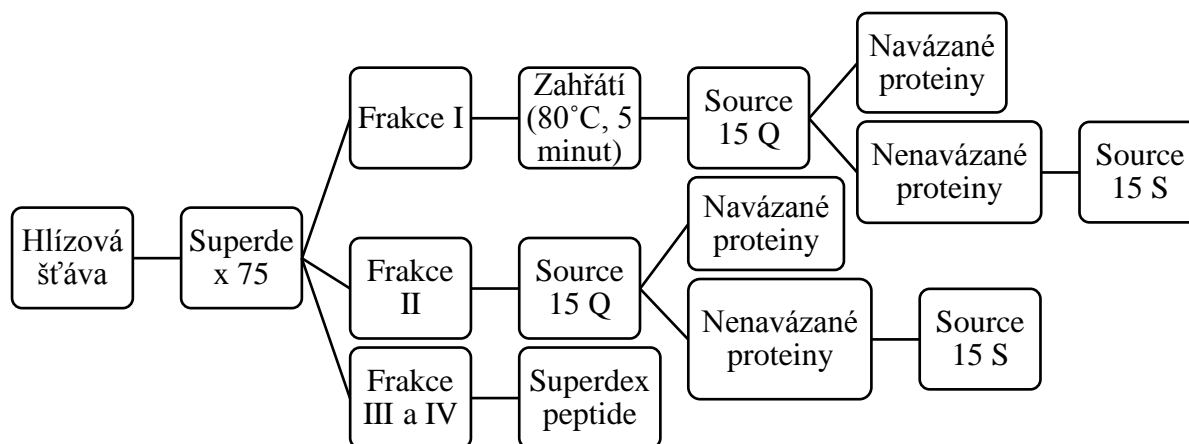
Detailní izolaci inhibitorů proteas se zabývala Pouvreau (2004). Použila ve své práci jako první krok gelovou filtraci (Superdex 75), které rozdělila bílkoviny na čtyři frakce (I; II; III; IV). Ve frakci I byl přítomen patatin a PI-1 a pro izolaci PI-1 byla použita termokoagulace (80°C, 5 minut). Ve frakci II byly obsaženy bílkoviny s molekulovou hmotností 20 až 25 kDa a podle SDS-PAGE elektroforézy nebyly ve frakcích III a IV identifikovány žádné bílkoviny (podle vlnové délky 320 nm se pravděpodobně jednalo o polyfenoly a oxidované polyfenoly), ale testování frakcí na inhibiční aktivity proteas naznačovalo přítomnost PCI.

Dalším krokem byla ionexová chromatografie termokoagulované frakce I (po filtraci 0,22 µm) na měniči aniontů (Source 15 Q) s lineární gradientovou elucí (chlorid sodný). V této frakci byl identifikován patatin ve zbytkovém množství a osm isoform PI-1 lišící se izoelektrickými body. Nenavázané bílkoviny byly aplikovány na měnič kationtů (Source 15 S), na kterém byl vzorek rozdělen na dvě frakce, obě obsahující PI-1.

Frakce II byla dělena měničem aniontů (Source 15 Q) s lineární gradientovou elucí (chlorid sodný) a asi 50 % bílkovin se nenavázalo, navázané bílkoviny měly hmotnost kolem 20 kDa a byly vyhodnoceny jako isoformy PI-2, pro zvýšení čistoty izolátu byla provedena separace na hydrofobní koloně (HR 5/5 Phenyl Sepharose) s gradientovou elucí (síran amonný) a izolované bílkoviny byly identifikovány (MALDI-TOF MS) jako bílkoviny s molekulovou hmotností 22,7 kDa menší frakce obsahující PI-2 a bílkoviny o molekulové hmotnosti 20 kDa. Nenavázané bílkoviny byly děleny měničem kationtů (Source 15 S) a vykazovaly vysoké pI mezi 7 a 9. Následná separace na hydrofobní koloně (HR 5/5 Phenyl Sepharose) přinesla rozdělení bílkovin podle pI na šestnáct subfrakcí.

Pro separaci peptidů ve frakcích III a IV byla použita gelová filtrace (Superdex peptide) a subfrakce obsahovaly bílkoviny o molekulové hmotnosti 20 kDa, které vykazovaly nízkou

inhibiční aktivitu vůči trypsinu a bílkoviny o molekulové hmotnosti 4,27 kDa, které hmotností i vykazovanou inhibiční aktivitou vůči karboxypeptidáze odpovídá PCI. Proces použitých kroků separace hlízové šťávy na jednotlivé inhibitory proteas je uveden na obrázku 1.



Obrázek 1: Diagram procesu separace inhibitorů proteas, převzato z Pouvreau (2004).

Další možnost izolace bílkovin z hlízové šťávy, aniž by však došlo ke znehodnocení patatinu, je uvedena v publikaci Bárta *et al.* (2013). V prvním stupni je použit anionový měnič iontů (celulosové medium s ligandem DEAE) a následně je využita afinitní chromatografie (concanavalinové medium) pro purifikaci patatinových bílkovin. Nezachycené frakce na medium s DEAE ligandem byly separovány na katexovém iontoměnič (UNO S6 column) s gradientovou elucí a jednalo se o několik frakcí (10-14 podle genotypu) různých tříd inhibitorů proteas, které je možné dále separovat na hydroxyapatitové koloně nebo stejně jako v práci Pouvreau (2004) na principu hydrofobních interakcí.

## 2.5.2. Metody izolace bílkovin používané v provozní praxi

U metod určených pro využití v praxi jde především o ekonomickou stránku izolačních postupů a to z hlediska spotřeby energie a odpadového hospodářství. Především jde tedy o maximální využití ideálně všech sekundárních produktů vznikajících při výrobě škrobu z brambor a jejich zhodnocení a následné uplatnění na trhu. Díky jejich uplatnění především v krmivářském a potravinářském průmyslu, případně dalších odvětvích, je minimalizováno množství těchto sekundárních produktů, které dosud byly, případně ještě stále jsou, používány jako ne příliš vhodné hnojivo zemědělsky využívané půdy, díky čemuž nedochází k nadměrnému zasolování těchto půd a znečišťování vodních zdrojů pod pozemky, kde jsou tyto postupy praktikovány. Důležitým a neopomenutelným hlediskem je samozřejmě i kvalitativní stránka finálních produktů a snaha o optimalizaci izolačních postupů s ohledem na typ produktu ve smyslu cílové skupiny.

### 2.5.2.1. Srážení

Srážení, nebo též precipitace se provádí působením zvýšené teploty, snížením pH, ionty kovů, organickými rozpouštědly, komplexací s přírodními elektrolyty nebo pomocí změny iontové síly. Pro zvýšení výtěžnosti bílkovin je také běžné použití kombinací těchto technik, např. působením tepla s předchozím snížením hodnoty pH (pH 4,8; 98 - 99°C) (Knorr, Kohler, Betschart, 1977).

Použitím zvýšené teploty je možné získat velkou výtěžnost izolované bílkoviny, která ale není rozpustná ve vodě při neutrálním pH. Tato metoda způsobuje denaturaci termolabilních

bílkovin (ireversibilní precipitace) a tím ztrácí tyto bílkoviny své funkční vlastnosti a rozpustnost takto získané bílkoviny je nepřímo úměrná teplotě (van Koningsveld, 2001), nicméně je vhodná např. pro izolaci termostabilních bílkovin, které si zachovávají své biologické vlastnosti i po vystavení vysokým teplotám a patří mezi ně některé inhibitory proteas. Rozpětí používaných teplot je variabilní od 40°C do 100°C (vytemperováním ve vodní lázni). Další nevýhodou této metody je poměrně vysoká energetická náročnost při zahřívání.

Snížení pH se provádí kyselinou sírovou, kyselinou citronovou nebo kyselinou octovou v rozmezí pH od 2,5 do 5,5. Úprava sráženého vzorku na pH 3 sice zajistí optimální množství precipitátu, ale při neutrálním pH má takto připravený precipitát sníženou rozpustnost (Knorr *et al.*, 1977). Vysoké výtěžnosti precipitátu spojené s výbornou rozpustností při neutrálním pH je možné dosáhnout precipitací kyselinou citronovou (van Koningsveld, 2001).

Pro srážení ionty se používají soli kovů, např. FeCl<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub> (van Koningsveld, 2001; Bártová, Bárta, 2009) a při použití trojmocných solí v dostatečné koncentraci se použitím těchto metod docílí vysoké výtěžnosti i vysoké rozpustnosti izolované bílkoviny, následně je ale obtížné odstranění kovových iontů z bílkovinných komplexů (Waglay *et al.*, 2014; Bárta, Bártová, 2007; van Koningsveld, 2001).

Srážení organickými činidly dosahují nejlepších výsledků při sledování schopnosti bílkovin se srážet a následně rozpouštět (obojí 91 %). Používají se organická rozpouštědla jako je etanol, metanol, isopropanol a aceton, v koncentracích od 0 do 40 % (v/v), negativní stránkou této techniky je vysoká ekonomická náročnost (van Koningsveld, 2001b).

Další možnost získávání bílkovin vyplývá z jejich schopnosti vytvářet komplexy s přírodními elektrolyty, kterými jsou např. karboxymethylcelulóza, chitosan, caragenan, alginát sodný, xantánová guma a arabská guma. Ve studii Kong *et al.* (2015) byla porovnána výtěžnost a čistota bílkovinného vzorku při použití všech výše uvedených polysacharidů za různých kombinací podmínek (pH, poměr proteinového vzorku a polysacharidu). Chitosan byl úspěšně použit na selektivní izolaci patatinu s čistotou vzorku 88,6 %, kdy nejvyšších výnosů (51,9 %) bylo dosaženo při úpravě pH na hodnotu 6,0, inhibitory proteas byly však touto metodou získány pouze s čistotou 9,4 %. Specializace chitosanu pro navázání na bílkovinu je dána isoelektrickým bodem bílkoviny, který se v případě patatinu pohybuje v rozmezí 4,5 až 5,2 (Løkra *et al.*, 2009) a může tak být ve směsi hlízových bílkovin považován za kyselou bílkovinu a díky tomu může negativní náboj patatinu při pH 6,0 reagovat s chitosanem prostřednictvím elektrostatické atraktivity. Naopak inhibitory proteas mají isoelektrický bod v rozmezí 5,1 až 9,0 (Løkra *et al.*, 2009) a s chitosanem se tak odpuzují na základě podobných elektrických nábojů. Použitím caragenanu bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti (100 %) ze všech použitých polysacharidů při hodnotě pH 3,5 s čistotou bílkovinného izolátu 67,2 %. U inhibitorů proteas o molekulové hmotnosti 15 – 20 kDa bylo shledáno, že jejich izolace těmito metodami byla nejtěžší, největší část v izolovaných vzorcích při použití pH zaujímal patatin (51,7 %), inhibitory proteas pak zaujímal 30,2 %. V porovnání s chitosanem neprokázaly anionické polysacharidy při získávání bramborových bílkovin z hlízové vody žádné selektivní vlastnosti.

Polysacharid karboxymethylcelulóza (KMC) je derivát celulózy s karboxymetylovými skupinami tvořící polymer využívající záporně nabitých karboxylových skupin, na které se váží kladně nabitě bílkoviny, vykazující pozoruhodné pěnicí vlastnosti v přítomnosti KMC o střední viskozitě díky vysoké povrchové aktivitě bílkovin (Gonzalez, *et al.*, 1991; Vikelouda, Kiosseoglou, 2004; Waglay *et al.*, 2014). Největší výtěžnost bílkovin z hlízové vody byla při použití KMC 85 % při hodnotě pH 3,5, což je největší hodnota výtěžnosti z dosud publikovaných prací. Kromě výše uvedených vlastností izolátů je výhodou této metody použití „bezpečných“ činidel a mírných reakčních podmínek (Kong *et al.*, 2015).

Precipitace změnou iontové síly se nejčastěji provádí síranem amonným, který je vyhledávaným činidlem i pro své bakteriostatické účinky. K výhodám jeho použití patří vysoká

rozpuštěnost bílkovinného izolátu a izolace bílkovin v nativním stavu, negativní stránkou je nutnost následného odsolení precipitátu (van Koningsveld *et al.*, 2001).

Porovnáním výše uvedených metod izolace bílkovin precipitací s ohledem na výtěžnost se zabýval kolektiv autorů Waglay *et al.* (2014). Porovnávali různé koncentrace činidel a data vyhodnocovali na základě výtěžnosti (vyjádřené jako podíl obsahu původních bílkovin v PFJ na celkový obsah precipitátu) a purifikačního faktoru (vyjádřené jako podíl obsahu bílkovin v sušině PFJ na obsah bílkovin v extraktu). Vysoké výtěžnosti (90,2 %) bylo dosaženo při použití kombinace termické a kyselá precipitace (pH 4,8 a 5,5; 100°C po dobu 2 minut), ale s nízkým purifikačním faktorem (0,74), který poukazuje na nízkou selektivitu této metody a získání dalších nebílkovinných složek z PFJ. Použití samotné precipitace nízkým pH sice přineslo nižší výtěžnost (64,7 %), nicméně byl pozorován vyšší purifikační faktor (1,26). Nejvyššího faktoru purifikace (6,24) bylo docíleno při precipitaci 5 mM FeCl<sub>3</sub>, nicméně výtěžnost byla v porovnání s ostatními metodami průměrná (60,8 %). Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo při použití 80% (w/v) síranu amonného (98,8 % s purifikačním faktorem 2,99) a 60% síranu amonného (w/v) (98,6 % s purifikačním faktorem 3,28). V případě použití etanolu byl nejvyšší výtěžek při 20% koncentraci (55,2 %) s purifikačním faktorem 3,79. Zároveň se ve stejné práci zabývali relativním zastoupením jednotlivých skupin hlízových bílkovin v izolátech a nejvyšší zastoupení patatinu bylo v extraktu při precipitaci 30 % etanolem (49,2 % celkových bílkovin), inhibitory proteas o velikosti 25-21 kDa byly nejvíce zastoupeny v precipitátu 40 mM FeCl<sub>3</sub> (18,7 %), inhibitory proteas o velikosti 20-15 kDa a menší než 15 kDa byly nejvíce zastoupeny v precipitátu MnCl<sub>2</sub> (30,9 % a 44,2 %). Skupina ostatních bílkovin s vyšší molekulovou hmotností byla nejvíce (64,2 %) zastoupena při izolaci KMC v poměru k bílkovině 0,6 (w/w).

### **2.5.2.2. Ultrafiltrace**

Volbou vhodného rozsahu velikosti pórů membrány se ultrafiltrací oddělují frakce o nízké molekulové hmotnosti, jako jsou soli, rostlinná barviva, organické kyseliny, volné aminokyseliny a sacharidy, které projdou skrz membránu a oddělí se tak od makromolekul (Strætkevorn, Schwarz, 2012). Ultrafiltrace není příliš vyhledávanou metodou separace bílkovin, i když jejím velkým pozitivem je získání bílkovin v nativním stavu, protože při toku směsi bílkovin přes membránu se rychle zkracuje životnost membrány díky přítomnosti rostlinných mikrovláken a vysoké pěnovosti hlízové vody a také dochází ke koncentraci anti nutričních látek-glykoalkaloidů (Bárta, Bártová, 2007). Používá se spíše k odstranění nízkomolekulárních látek, jako jsou cukry, toxické látky a polyfenoly. Zwijnenberg *et al.* (2002) ve své studii porovnávali ultrafiltraci při použití různých materiálů membrán (hydrofilizovaný polyetersulfon, hydrolyzovaný polyvinilidenfluorid a regenerovanou celulózu), velikosti pórů (5 až 150 kDa) a došli k závěru, že bílkoviny izolované ultrafiltrací mají vyšší kvalitu, než bílkoviny izolované reverzní osmózou.

### **2.5.2.3. Chromatografické metody**

Pro izolaci patatinu z PFJ ve větším měřítku byla poprvé použita tzv. Expanded bed adsorption, s velikostí náplně 250 ml a z jednoho cyklu byly získány 4 g patatinu (Strætkevorn *et al.*, 1999). Kromě velké výtěžnosti je při této izolační metodě odstraněna i větší část nežádoucích glykoalkaloidů (Løkra *et al.*, 2008). Firma Avebe U. A. se pokoušela o optimalizaci postupu izolace inhibitorů proteas a patatinu, (Patent Coöperatie Avebe U. A. WO2008069650 A1). Optimalizovaný postup se skládal z flokulace a následné absorpce bramborového bílkovinného izolátu za použití tzv. mixed mode ligandů v matici. (Reinshagen, 2013). Tato izolační metoda nebyla ideální, neboť se jednalo o finančně nákladný postup a ligandy použité při této metodě vykazovaly relativní nestabilitu v přítomnosti PFJ. Následný

výzkum firmy Avebe U.A. se zaměřil na povahu používaných ligandů v absorpčním materiálu - způsoby spojení ligandu s absorpčním materiálem, porozita absorbentu, které mají silný vliv na účinnost absorpce bílkovin a jejich rozdělení dle isoelektrického bodu (na vysokobílkovinnou a nízkobílkovinnou frakci bez obsahu nečistot). V roce 2014 se podařilo postup optimalizovat do té míry, že byl firmou Avebe U.A. patentován (Coöperatie Avebe U. A. WO2014011042 A1) a spočíval v několika zásadních krocích: a) úprava pH hlízové vody na hodnotu 4,0 – 6,5; b) nanesení hlízové vody na podpůrný nosič - porézní syntetický polymer, porézní polysacharid, porézní anorganický materiál či kombinace uvedených materiálů - z nichž má alespoň 90 % pórů velikost v rozmezí 10 až 200 nm a hydrofobní mixed-mode ligand s pKa 2,5 – 5 a který je navázán na nosič prostřednictvím S- nebo O-molekuly. PFJ se na tomto mediu následně rozdělila na dvě frakce - v první frakci převažoval patatin (eluce při pH 5,7 až 8,9) a ve druhé frakci inhibitory proteas (eluce při hodnotě pH nižší než 3 nebo více než 9). Získané frakce se vyznačovaly po zakoncentrování ultrafiltrací více než 75% obsahem nativních bílkovin v sušině vzorku.

### **2.5.3. Materiál používaný pro izolaci hlízových bílkovin v laboratorních podmínkách**

Izolace hlízových bílkovin se v laboratorních podmínkách provádí z několika druhů materiálů: z čerstvých hlíz brambor, z hlízové vody, tzv. Potato Fruit Juice (PFJ), ze zdrtek či z lyofilizované sušiny hlíz. Ve velkokapacitních zařízeních se pak spíše jedná o zpracování materiálu, který vzniká jako sekundární produkt a tento materiál je blíže popsán v kapitole 2.2. Sekundární produkty vznikající při zpracování brambor při výrobě škrobu V následujícím textu jsou stručně představeny základní běžně používané materiály a metody jejich zpracování:

#### **2.5.3.1. Metody izolace bílkovin z lyofilizovaných hlíz**

K izolaci bílkovin z lyofilizovaných hlíz se přistupuje především v situaci, kdy je potřeba izolovat bílkoviny nerozpustné ve vodě, nebo tehdy, když není možné získat šťávu, při jejíž přípravě dochází k poměrně velkým ztrátám materiálu, může se jednat o zpracování malých hlíz brambor, které jsou u nás nepůvodními druhy nebo o izolaci velmi sensitivních bílkovin, které mohou být snadno poškozeny kvůli delší době zpracování a izolaci bílkovin v případě hlízové šťávy. Vstupní materiál se připraví zmrazením důkladně omytých, osušených a na plátky nakrájených hlíz brambor s následnou lyofilizací na konstantní hmotnost (nebo zmrazením tekutým dusíkem). Důkladně se zhomogenizuje na jemný prášek a následně se takto vzniklá bramborová mouka nechává hydratovat několik hodin v nadbytku např. Tris(hydroxymetyl)aminometanového pufru upraveném na požadované pH obvykle kolem hodnoty 7, v přítomnosti konzervantu např. 2 % (w/v) dodecylsírany sodného (SDS) a další postup se odvíjí od biochemických vlastností izolované skupiny bílkovin (Bárta, Bártová, 2008) podobně jako u bílkovin izolovaných z hlízové šťávy.

#### **2.5.3.2. Metody izolace bílkovin z hlízové šťávy**

Bílkoviny rozpustné ve vodě je možné izolovat z hlízové šťávy, která vzniká jako druhotný produkt výroby bramborového škrobu, nebo je možné simulovat průmyslové struháky jejich nahrazením za výkonný kuchyňský odšťavňovač. Tento postup je vhodné využít především v laboratorních podmínkách při potřebě menšího množství čerstvého materiálu, či při přípravě šťáv z jednotlivých odrůd brambor. Takto získanou šťávu je nezbytné zbavit zbytkového škrobu, vlákniny a dalších látek centrifugací a důkladnou filtrací. Velkou výzvou je izolace bílkovin se zachovanými funkčními vlastnostmi. Tabulka 4 uvádí látkové složení hlízové šťávy, resp. její sušiny, které je v hlízové šťávě obsaženo 4-5 %, zbytek je voda.

## 2.6. Nejčastěji používané metody pro identifikaci bílkovin v dnešní době

Pro identifikaci a následnou klasifikaci bílkovin byla vyvinuta celá řada metod. Ve starších publikacích jsou hlízové bílkoviny brambor klasifikovány dle rozpustnosti do čtyř tříd - albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny (Osborne, 1909), podle novějších poznatků jsou hlízové bílkoviny brambor klasifikovány především na základě moderních elektroforetických technik na polyakrylamidovém gelu dle velikosti molekul (PAGE), dále isoelektrickou fokusací (IEF), během které jsou molekuly rozděleny dle isoelektrického bodu či kombinací IEF a PAGE, tzv. 2-D PAGE, kde jsou v prvním kroku bílkoviny rozděleny IEF a následuje jejich rozdělení dle molekulové hmotnosti na PAGE. Asi nejvýznamnější a nejčastěji používanou metodou je SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného), která funguje na principu elektroforetické pohyblivosti proteinů (Laemli U. K., 1970).

## 2.7. Možnosti využití bílkovinných izolátů a koncentrátů z brambor v praxi

V současné době na zahraničním trhu stoupla nabídka bílkovinných izolátů či produktů bílkovinných izolátů v několika zajímavých odvětvích.

### 2.7.1. Potravinářství

Nizozemská společnost Avebe propaguje na svých webových stránkách několik řad potravinových doplňků a svou reklamní kampaň zakládá na produkci kvalitních, čistě veganských produktů, které jsou cenově dostupné a mají košer a halal certifikaci. Jedná se o přísady do jídel (značky Solanic® a Perfectasol™), které jsou bez alergenů (clean label) s pět až deset krát menší ekologickou stopou, než mají živočišné bílkoviny, propůjčující výrobkům výbornou vaznost a texturu (produkt určený pro finský trh „Grandma’s meat balls“). Přidávají se i do zmrzlin čistě rostlinného původu, u kterých je propagována vysoká chutnost a kvalita, či do fitness nápojů, proteinových tyčinek. Používají se při výrobě dressingů bez přidání vajec, smetany a mléka a při výrobě cukrovinek se jimi nahrazuje mléko (karamely, cukrářské výrobky) a želatina (Anonym 2, 2016). Produkt Perfectasol je připravován jako kombinace bramborových bílkovin a bramborového škrobu a je vhodný na přípravu lisovaných bonbonů, žvýkaček, želé pěn a vícevrstvých bonbonů (Anonym 3, 2016). Obecně se bramborové bílkoviny vyznačují výbornou pěnivostí, stabilizačními vlastnostmi (van Koningsveld, 2001; van Koningsveld *et al.*, 2002) a emulgačními vlastnostmi (Ralet and Gueguen, 2000).

V prosinci roku 2013 byl zapsán bramborový protein firmy Solanic do Nařízení Evropské unie jako produkt vhodný pro čiření vína, tedy zjemňování trpkosti vína srážením bílkovin s tříslovinami ve víně obsaženými (Gambutí *et al.*, 2012). Přidal se tak k proteinu z pšenice a hrachu, které se do této doby pro tento účel používaly.

### 2.7.2. Zemědělství

Proteinové koncentráty z brambor se používají ve výživě selat, skotu, drůbeže, domácích zvířat i v systému akvakultur a pro každý druh těchto zvířat produkuje dánská firma AKV Langholt krmné směsi s ideálním poměrem živin s ohledem na druh, stáří, kondici a užitkový směr zvířat (Anonym 4, 2016). Ve stejném odvětví podniká i francouzská firma Roquette (Anonym 5, 2016), dánská firma KMC (Anonym 6, 2016) a rakouská firma Agrana Stärke GmbH – Wek Gmünd (Anonym 7, 2016).

Ve studii Jin *et al.* (2008) byl prokázán antimikrobiální vliv bramborových bílkovin (odrůda Gogu Valley) na nežádoucí střevní mikroflóru selat *in vivo* a v budoucnosti by tak mohl nahradit nyní používaná antibiotika, resp. řešit situaci, kdy je používání antibiotik ve výkrmu



hospodářských zvířat omezováno. Podobná studie byla provedena i na brojlerech (Ohh *et al.*, 2009).

Další využití nachází proteinové koncentráty z brambor v podobě hnojiv v ekologickém zemědělství, jako zdroj materiálu pro výrobu biopaliv (Karup Kartoffelmelfabrik, Denmark, 2007; Fang, Boe, Angelidaki, 2011) a v souvislosti s antimikrobiálním potenciálem hlízových bílkovin se uvažuje i o používání těchto izolátů (PI-2) v ochraně rostlin před závažnými škůdci zemědělských plodin (Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., EP 2918281 A1).

### **2.7.3. Kosmetický průmysl**

V kosmetickém průmyslu by mohly mít uplatnění výrobky s obsahem PI-2, které by v produktech plnily funkci tzv. anti-aging složek a složek s funkcí pro bělení pleti (Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V., EP 2918281 A1). Firma Solanic, dceřiná firma nizozemské společnosti Avebe, se zabývala i produkcí bramborových bílkovin pro použití ve farmaceutických a kosmetických přípravcích jako protizánětlivých složek v krémech či ubrouscích, které přechází podráždění pokožky u dospělých i u dětí (Anonym 8, 2007). Tyto bílkovinné izoláty byly k dispozici ve formě prášku s obsahem proteinu více než 90 – 95 % či v tekuté formě s obsahem proteinu více než 15 – 20 %.

Další možností je využití inhibitorů proteas v lokálních přípravcích pro eliminaci zápachu při pocení, tzv. deodorantů (Bayer Aktiengesellschaft, US 3950509 A). Díky obsaženým inhibitorům proteas, které slouží ve výše uvedených přípravcích i jako přírodní emulgátory, dochází k eliminaci chemických složek v přípravku s využitím obnovitelných neolejových složek.

### **2.7.4. Medicína**

S inhibitory proteas by mohlo být počítáno do budoucnosti i jako s cennými izoláty využívanými při léčbě některých druhů nádorových onemocnění či v léčbě nadváhy (Sun *et al.*, 2013; Komarnytsky, Cook, Raskin, 2011; Peters *et al.*, 2011) a dermatitid (Berger *et al.*, 2012; Ruseler-van Embden *et al.*, 2004; Selitrennikoff, 2001). V roce 2015 byla publikována patentová přihláška (Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., EP 2918281 A1), která se zabývá představením inhibitorů proteas odvozených od inhibitorů proteas hlíz bramboru, které mohou být použity jako prostředky pro léčbu osteoporózy, alergií, bronchiálního astmatu, viru HIV či Alzheimerovy choroby, neboť tyto bílkoviny jsou schopny inhibovat katepsin K, 5-lipoxegenasu, HIV-proteas a lidskou  $\beta$ -secretasu.

### 3. Cíle a hypotézy práce

#### Cíle práce:

- Studium antimikrobiálních aktivit bílkovin a peptidů získaných z hlíz různých genotypů brambor rodu *Solanum* spp. formou sledování a studia inhibice růstu mycelia fungálních patogenů.
- Optimalizace testování antimikrobiálních aktivit zkoumaných skupin bílkovin a peptidů a jejich frakcí na vybraných druzích mikrobiálních patogenů (patogenní houby vs. bakterie).
- Optimalizace izolačních postupů pro jednotlivé skupiny bílkovin a/nebo jejich frakcí.
- Hodnocení základních biochemických vlastností a aktivit bílkovin a peptidů.
- Studium a optimalizace metod izolace a purifikace skupin extracelulárních bílkovin z hlíz bramboru *Solanum tuberosum* L.

#### Na základě dostupných literárních informací byly navrženy následující hypotézy:

- Antimikrobiální aktivity bílkovin a peptidů se vzájemně liší v závislosti na použitém genotypu brambor rodu *Solanum* spp., ze kterých byly získány (např. evropské kulturní odrůdy vs. brambory pěstované v původní domovině).
- Stejně skupiny bílkovin a peptidů izolované z hlíz brambor rodu *Solanum* spp. působí různou mírou inhibice růstu na jednotlivé druhy mikrobiálních patogenů.
- Antimikrobiální aktivita izolovaných bílkovin a peptidů se liší v závislosti na použité metodě izolace a následném způsobu modifikace izolovaných bílkovin a peptidů.
- Jednotlivé skupiny bílkovin a jejich frakce vyžadují optimalizaci izolačních postupů v závislosti na biochemických vlastnostech jednotlivých skupin bílkovin a peptidů.

## 4. Výsledky

### 4.1. Recenzované publikace

#### 4.1.1. Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinů a peptidů bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

Brambor hlíznatý patří mezi světově významné hlíznaté okopaniny a z hospodářského hlediska patří i k nejvýznamnějším zemědělským plodinám. Chemické složení hlíz s vysokým obsahem vody a sacharidů řadí brambor mezi plodiny s vysokou náchylností k napadení bakteriálními patogeny, houbovými patogeny i patogeny virového původu. V celém rostlinném těle jsou pak jak konstitutivně, tak i indukovaně syntetizovány proteiny a peptidy jako reakce obranných mechanismů rostlin na poranění nebo napadení těmito patogeny či predátory. Antimikrobiální peptidy a proteiny kulturního druhu bramboru hlíznatého jsou heterogenní skupinou proteinů, jejichž klasifikace se provádí především dle společných biochemických vlastností. Díky ujasnění a utřídění specifických biochemických vlastností jednotlivých skupin proteinů a peptidů bramboru hlíznatého je usnadněna jejich klasifikace do jednotlivých tříd a následně jsou stanovovány a optimalizovány metody izolace a případného využívání proteinů a peptidů v praxi, např. použití inhibitorů proteas v zemědělských biotechnologiích v procesu zvyšování resistance zemědělských plodin, či využití v krmivářském a potravinářském průmyslu nebo v různých oblastech humánní i veterinární medicíny.

Kompletní informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty v publikaci:

Bártová V., Bárta J., **Kamenová A.**, Staňková A., Čurn V. (2012): Charakteristika a potenciál využití antimikrobiálních proteinů a peptidů bramboru (*Solanum tuberosum* L.), Chemické Listy, 106: 365-372.

## CHARAKTERISTIKA A POTENCIÁL VYUŽITÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH PROTEINŮ A PEPTIDŮ BRAMBORU (*Solanum tuberosum* L.)

VERONIKA BÁRTOVÁ, JAN BARTA, ANDREA KAMENOVÁ, ADÉLA STAŇKOVÁ a VLADISLAV ČURN

Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Studentská 13, 370 05 České Budějovice  
vbartova@zjf.jcu.cz

Došlo 20.10.11, přijato 15.12.11.

Klíčová slova: antimikrobiální proteiny, *Solanum tuberosum* L., inhibitory proteas, patatin, bramborové defensiny

### Obsah

1. Úvod
2. Význam druhu *Solanum tuberosum* L. a jeho fytopatologická specifčnost
3. Antimikrobiální potenciál proteinů izolovaných z druhu *S. tuberosum* L.
  - 3.1. Antimikrobiální potenciál proteinů patatinového komplexu
    - 3.1.1. Biochemické vlastnosti patatinu s možným vztahem k obrannému systému
    - 3.1.2. Antimikrobiální aktivita patatinových proteinů
  - 3.2. Antimikrobiální potenciál inhibitorů proteas hlíz bramboru
    - 3.2.1. Klasifikace inhibitorů proteas hlíz bramboru a jejich biochemické vlastnosti
    - 3.2.2. Antimikrobiální vlastnosti inhibitorů proteas hlíz bramboru
  - 3.3. Antimikrobiální potenciál defensinů a ostatních proteinů
    - 3.3.1. Antimikrobiální aktivita a charakteristika defensinů
    - 3.3.2. Charakteristika ostatních antimikrobiálních proteinů
4. Praktické aspekty využití antimikrobiálních proteinů
5. Závěr

### 1. Úvod

Antimikrobiální proteiny a peptidy (*Antimicrobial Proteins*; AMPs) rostlin jsou specifické stresové proteiny, které mají schopnost omezovat až zcela inhibovat růst mikroorganismů<sup>1</sup>. Většina AMPs byla identifikována jako peptidy o malé až velmi malé molekulové hmotnosti, s bohatým zastoupením cysteinu ve své struktuře, které

vykazují konstitutivní i indukovanou expresi<sup>2</sup>. Antimikrobiální aktivita proteinů je chápána v širším smyslu a neomezuje se pouze na antibakteriální aktivitu (inhibice růstu bakterií), ale bývají do této skupiny zahrnuty také antifungální proteiny (inhibice růstu hub) a často zjednodušeně také proteiny s antivirovou aktivitou. Byly popsány i proteiny, které vykazují kombinovanou aktivitu – velmi typickými zástupci tzv. bifunkčních proteinů jsou rostlinné inhibitory proteas, které vykazují nejen negativní vliv na růst a vývoj bakterií, hub a v několika případech i virů, ale mají také schopnost inhibovat trávicí enzymy hmyzu – především trypsin a  $\alpha$ -amylasu<sup>3</sup>. Studium rostlinných proteinů s aktivitou vůči patogenním či potenciálně patogenním mikroorganismům nabývá v poslední době na významu, neboť tyto proteiny nabízejí široké možnosti využití.

### 2. Význam druhu *Solanum tuberosum* L. a jeho fytopatologická specifčnost

Lilek hlíznatý nebo-li brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří celosvětově mezi významné hlíznaté okopaniny. Z hlediska hospodářského patří spolu s pšenicí, rýží a kukuřicí k nejdůležitějším zemědělským plodinám. Podle údajů organizace FAO je celosvětová produkce na úrovni 315 milionů tun hlíz ročně a dle historických zdrojů je druh *S. tuberosum* L. pěstován jako kulturní plodina již více než 10 000 let (cit.<sup>4</sup>).

Brambor patří do skupiny plodin s vysokou náchylností k chorobám. Hlízy obsahují značné množství vody a sacharidů, což vytváří ideální živné médium pro rozvoj nejrůznějších patogenů. *Phytophthora infestans* patří k historicky nejzávažnějším chorobám brambor a odhaduje se, že až 3,5 miliard dolarů ročně činí náklady spojené s ochranou brambor proti této chorobě<sup>5</sup>. Produkce rezistentních genotypů bramboru je vzhledem k vysoké plasticitě patogena obtížná a studium genů rezistence, proteinů, peptidů a dalších látek podílejících se na procesu patogenese mohou být klíčovými aspekty zvyšování rezistence nových genotypů. Z houbových patogenů lze dále jmenovat často se vyskytující *Rhizoctonia solani* způsobující tzv. vložkovitost hlíz bramboru, *Fusarium solani* jako hlavní příčina fusariové hniloby brambor či *Alternaria solani* způsobující hnědou skvrnitost listů bramboru.

Z bakteriálních patogenů patří k významným původcům onemocnění *Ralstonia solanacearum* způsobující tzv. hnědou hnilobu brambor a *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* způsobující bakteriální kroužkovitost brambor. Obě tyto bakterie jsou na území ČR dle platné legislativy řazeny mezi karanténní organismy. Vzhledem k vegetativnímu množení brambor představují významné zdravotní hledisko také virové choroby<sup>6</sup>.

### 3. Antimikrobiální potenciál proteinů izolovaných z druhu *S. tuberosum* L.

Informace o AMPs izolovaných z druhu *S. tuberosum* L. jsou omezené a dostupné ve značně roztržité podobě. Kim a spol.<sup>7</sup> rozděluje proteiny a peptidy druhu *S. tuberosum* s možnou antimikrobiální aktivitou do tří skupin. První skupina zahrnuje hlavní hlízový protein – globulinovou frakci označovanou také jako tuberin. Tato proteinová frakce byla později označena jako patatin a pod tímto názvem je všeobecně známá. Druhou skupinu představují hlízové inhibitory proteas a třetí skupina AMPs jsou tzv. bramborové defensiny.

#### 3.1. Antimikrobiální potenciál proteinů patatinového komplexu

Patatinové proteiny jsou majoritní skupina hlízových proteinů<sup>8</sup>. Tyto proteiny jsou homogenní skupina glykoproteinů s molekulovou hmotností od 39 do 43 kDa a hodnotou isoelektrického bodu v rozsahu pH 4,6 až 5,2 (cit.<sup>9</sup>). Zastoupení patatinu v komplexu extrahovatelných bílkovin vykazuje vysokou míru genotypové variability, ale obvykle se pohybuje v rozpětí mezi 20 až 40 % (cit.<sup>10</sup>). Patatin je považován především za zásobní protein<sup>11</sup>, ale vzhledem ke specifické enzymové aktivitě této skupiny proteinů byla vyslovena také hypotéza o možné účasti v obranném systému hlízy<sup>9</sup>.

##### 3.1.1. Biochemické vlastnosti patatinu s možným vztahem k obrannému systému

U patatinových proteinů byly zjištěny enzymové aktivity, o kterých se předpokládá, že mají vztah k stresové či obranné fyziologii hlíz, neboť pro zásobní protein nemají opodstatnění.

##### Aktivita nespecifické lipidacylhydrolasy

Patatinové proteiny vykazují nespecifické hydrolasové aktivity (EC 3.1.1), tedy esterasovou aktivitu pro tvorbu voskových esterů i pro deacylace lipidů<sup>12</sup>. Teorie týkající se fyziologické role LAH aktivity patatinu v obranném systému hlízy zahrnuje dvě hypotézy, které uvádí Pots<sup>9</sup>. Podle jedné z nich se LAH aktivita patatinu podílí na uvolnění mastných kyselin při poškození buňky napadené rostliny. Mastné kyseliny jsou následně oxidovány lipoxygenasami, což vede ke vzniku cytotoxických oxidovaných mastných kyselin. LAH aktivita má také za následek tvorbu ve vodě nerozpustných vosků, které zabraňují šíření patogena v rostlině. Podle teorie, kterou uvádí Strickland a spol.<sup>13</sup>, působí LAH aktivita patatinu na invazivní organismy přímou inhibicí, pravděpodobně narušením integrity buněčných stěn. Žádná z uvedených teorií nebyla nikdy přímo potvrzena.

##### Aktivita cytosolové fosfolipasy A<sub>2</sub> a A<sub>1</sub>

Patatin také vykazuje aktivitu cytosolové fosfolipasy A<sub>2</sub> a A<sub>1</sub> (PLA<sub>2</sub>; PLA<sub>1</sub> aktivita; EC 3.1.1.4). Aktivita fosfolipasy A<sub>2</sub> je vyšší, a proto je patatin označován jako enzym

s PLA<sub>2</sub> aktivitou. PLA<sub>2</sub> je lipolytický enzym, který katalyzuje hydrolyzu esterové vazby mastných kyselin v pozici *sn*-2 u diacylfosfolipidů. Výrazná PLA<sub>2</sub> aktivita byla zaznamenána především při použití substrátu fosfatidylcholinu s linolovou kyselinou navázanou v pozici *sn*-2. Významná je závislost aktivity PLA<sub>2</sub> na pH prostředí. V rozsahu hodnot pH 7,5 až 9,0 byla zaznamenána nejvyšší aktivita; při poklesu hodnoty pH pod 7,0 byla aktivita minimální. Tento vztah naznačuje, že PLA<sub>2</sub> aktivita patatinu je v rostlině regulována jeho lokalizací<sup>14</sup>. Patatin je neaktivní, pokud se nalézá ve vakuolách rostlinných buněk, kde převládá kyselé pH. Pokud je vlivem poškození buněk uvolněn z vakuol a transportován do cytosolu, dostává se do zásaditého prostředí a stává se aktivním. PLA<sub>2</sub> aktivita patatinu je indukována přítomností Ca<sup>2+</sup> a předpokládá se, že na aktivaci PLA<sub>2</sub> aktivity má také podíl protein kinasa<sup>15</sup>. Fyziologická funkce rostlinných fosfolipas spočívá ve schopnosti odštěpovat z membránových fosfolipidů nenasyčené mastné kyseliny; u rostlinných buněk se uvolňuje linolová kyselina nebo linolenová kyselina. Uvolněné mastné kyseliny slouží jako signální látky vedoucí k expresi „obránných“ genů<sup>16</sup>. Účast PLA<sub>2</sub> na signální transdukcii vyvolávající rezistentní reakci v bramborových buňkách při inokulaci inkompatibilní rasou houbového patogena *P. infestans*, nebo při kontaktu s elicitorem stěn hyf tohoto patogena byla potvrzena v práci Senda a spol.<sup>17</sup>.

##### Aktivita kyselého β-1,3-glukanasy

Z hlíz bramboru byl také izolován enzym s aktivitou kyselého β-1,3-glukanasy (GLU-40; EC 3.2.1.39), který byl následně identifikován jako patatin<sup>18</sup>. Proteiny s β-1,3-glukanasovou aktivitou patří mezi velmi typické PR proteiny rostlin mající schopnost vázat se na buněčné stěny hub a degradovat je, a tím omezit růst houbových organismů<sup>19</sup>. Obdobný mechanismus lze předpokládat i u patatinových proteinů, přestože toto nebylo nikdy přímo potvrzeno.

##### Aktivita β-1,2-xylosidasy

Poslední enzymovou aktivitou, která byla detegována u patatinu je aktivita β-1,2-xylosidasy (EC 3.2.1.37). Izolovaný enzym byl identifikován jako patatin až na základě charakterizace biochemických vlastností – molekulová hmotnost v rozsahu 39–40 kDa, pH pro optimální aktivitu 4,0–4,5 (teplota 50 °C) a vysoká homologie *N*-koncové sekvence polypeptidu s patatinem. β-1,2-Xylosidasa uvolňuje z *N*-glykanů xylosidasové molekuly vázané β-1,2 vazbou na β-mannosu. Podstata fyziologické funkce β-1,2-xylosidasy v hlízách je neznámá, ale předpokládá se její účast na obranném mechanismu hlíz<sup>20</sup>.

##### 3.1.2. Antimikrobiální aktivita patatinových proteinů

Informace týkající se prokázaného antimikrobiálního působení patatinu jsou velmi omezené. U patatinových proteinů, resp. isoforem patatinových proteinů vykazujících β-1,3-glukanasovou aktivitu, je popsána schopnost inhibice klíčení zoospor patogena *P. infestans*<sup>21, 22</sup> – patatin izolovaný z hlíz rezistentního genotypu vykazoval až

70% inhibici klíčení zoospor *P. infestans* při koncentraci 2,5 µg ml<sup>-1</sup> (cit.<sup>23</sup>). Vztah patatinu k obrannému mechanismu vůči tomuto patogenu dokládá také odlišný způsob exprese proteinů patatinového komplexu u rezistentní a náchylné odrůdy – množství β-1,3-glukanasy detegované v hlízách rezistentní odrůdy po 14 hodinách od inokulace kompatibilní rasou *P. infestans* dosahuje až čtyřnásobné koncentrace oproti náchylné odrůdě; po 72 hodinách lze zaznamenat indukci syntézy patatinu i ve stoncích<sup>22</sup>.

### 3.2. Antimikrobiální potenciál inhibitorů proteas hlíz bramboru

Při napadení rostliny produkují patogenní organismy hydrolasy, které usnadňují pronikání patogena do rostlinných buněk. K nejvýznamnějším hydrolasám tohoto typu patří aktivní extracelulární proteinasy, které se podílejí na degradaci pektino-proteinového komplexu buněčných stěn rostlin. Logickým obranným mechanismem rostlin je schopnost syntézy inhibitorů proteas, které aktivitu proteas snižují nebo zcela inhibují<sup>25</sup>. Nejvýznamnější patogen brambor, *P. infestans*, produkuje extracelulární serinové proteasiny. Infekce hlíz tímto patogenem je logicky doprovázena kumulací serinových inhibitorů proteas s Mr v rozsahu 20 až 25 kDa (cit.<sup>24</sup>). Inhibitory proteas tvoří v hlízách bramboru velmi rozsáhlou skupinu (až 40 % všech extrahovatelných proteinů hlíz) s vysokou mírou strukturní i funkční variability<sup>8</sup>.

#### 3.2.1. Klasifikace inhibitorů proteas hlíz bramboru a jejich biochemické vlastnosti

Inhibitory proteas hlíz bramboru se liší svou molekulovou hmotností, aminokyselinovým složením, hodnotou pI a inhibiční aktivitou<sup>25</sup>. Nejčastěji jsou proteasové inhibitory klasifikovány dle aminokyselinového zbytku v aktivním místě na 1) serinové inhibitory proteas (serin či histidin v aktivním místě); 2) cysteinové inhibitory proteas (cystein v aktivním místě); 3) aspartátové inhibitory proteas (aspartát v aktivním místě) a 4) metalloproteasové inhibitory (kovové ionty v aktivním místě)<sup>26</sup>. Pro inhibitory proteas hlíz bramboru se v současné době uplatňují dva klasifikační systémy. Starší systém dělí hlízové inhibitory proteas do tří skupin<sup>27</sup>. První skupinu tvoří bramborový inhibitor I (PI-I; serinový inhibitor, pentamer, 40 kDa); druhou bramborový inhibitor II (PI-II, serinový inhibitor, dimer) a konečně třetí představují inhibitory proteas o hmotnosti 20 a 22 kDa, které lze dále rozlišit na inhibitory proteas Kunitzova typu, inhibitory cysteinových proteas, inhibitory aspartátových proteas a inhibitor karboxypeptidasy<sup>9</sup>. Detailnější klasifikační systém dělí hlízové inhibitory proteas do sedmi tříd dle jejich molekulové hmotnosti, stavby molekuly, hodnoty isoelektrického bodu a počtu sulfidických můstků v molekule, jak je uvedeno v tabulce I (cit.<sup>25</sup>).

Schopnost inhibovat trávicí proteasy hmyzu předurčuje tyto proteiny k insekticidnímu působení. Přesto inhibitory proteas hlíz bramboru jsou považovány i za zásobní

Tabulka I  
Základní vlastnosti inhibitorů proteas hlíz bramboru dle klasifikačního systému<sup>25</sup>

Skupina	MW	pI	Klasifikace	Inhibované enzymy
Bramborový inhibitor proteas I (PI-I; Potato inhibitor I)	7,7–7,9 kDa pentamer 8 isoform	pH 5,1–7,8	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor proteas II (PI-2; Potato inhibitor II)	10,2 kDa dimer 7 isoform	pH 5,5–6,9	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Bramborový cysteinový inhibitor proteas (PCPI, Potato Cystein Protease Inhibitor)	20,1–22,8 kDa 6 inhibitorů	pH 5,8–9,0	cysteinový inhibitor	papain trypsin chymotrypsin
Bramborový aspartátový inhibitor proteas (PAPI, Potato Aspartyl Protease Inhibitor)	19,9–22,0 kDa 6 inhibitorů	pH 6,2–8,7	aspartátový inhibitor	cathepsin D trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor Kunitzova typu (PKPI, Potato Kunitz Protease Inhibitor)	20,2 kDa 2 inhibitory	pH 8,0–9,0	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Ostatní serinové inhibitory (OSPI, Other Serine Protease Inhibitor)	21,0 a 21,8 kDa 2 inhibitory	pH 7,5–8,8	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Bramborový karboxypeptidasový inhibitor proteas (PCI, Potato Carboxypeptidase Inhibitor)	4,3 kDa	pH	metalloproteasový inhibitor	karboxypeptidasa A

proteiny; u řady z nich byla prokázána antimikrobiální činnost a byla u této skupiny proteinů popsána také indukce jejich syntézy na základě působení řady abiotických i biotických faktorů<sup>7</sup>. Jako příklad lze uvést kumulace inhibitorů chymotrypsinu v hlízách bramboru po jejich infekci patogenem *P. infestans* – konkrétně se jednalo o kumulaci proteinů o molekulové hmotnosti 21, 22 a 23 kDa. Tyto proteiny byly později identifikovány jako serinové inhibitory proteas Kunitzova typu a označeny jako PSPI-21 a PSPI-22. Protein o velikosti 23 kDa byl charakterizován jako cysteinový inhibitor proteas a označen jako PCPI-23 (cit.<sup>28</sup>). Klíčovým faktorem kumulace inhibitorů proteas je pravděpodobně arachidonová kyselina, která je produkována patogenem *P. infestans* a je významným elicitorem obranné reakce brambor.

### 3.2.2. Antimikrobiální vlastnosti inhibitorů proteas hlíz bramboru

Antimikrobiální aktivita inhibitorů proteas hlíz bramboru byla doposud popsána pouze u několika málo zástupců. Hlízové inhibitory proteas Kunitzova typu patří k nejvýznamnější skupině. Jak již bylo uvedeno, při napadení hlíz patogenem *P. infestans* byla zjištěna kumulace inhibitorů Kunitzova typu s označením PSPI-21, PSPI-22, PCPI-23 a PKSI (cit.<sup>28</sup>).

Inhibitor PSPI-21 je tvořen dvěma polypeptidovými řetězci o velikosti 16,5 a 4,5 kDa a vykazuje inhibiční aktivitu vůči trypsinu, chymotrypsinu a elastase. Protein PKSI je tvořen pouze jedním polypeptidovým řetězcem o velikosti 21 kDa a je aktivní vůči subtilisinu Carlsberg<sup>29</sup>. Obdobně proteiny PSPI-22 a PCPI-23 jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem o hmotnosti 22 a 23 kDa (cit.<sup>28</sup>). Zatímco inhibitor PSPI-22 inhibuje trypsin a chymotrypsin, PCPI-23 vykazuje aktivitu pouze vůči papainu. U inhibitorů (PSPI-21, PSPI-22 a PKSI) byl zjištěn průkazný inhibiční vliv na růst hyf a klíčení zoospory patogena *P. infestans*; inhibitory PSPI-21 a PKSI vykazovaly *in vitro* inhibiční účinky na růst mycelia a klíčení konidií houby *Fusarium culmorum*<sup>29</sup>.

Ke skupině hlízových inhibitorů Kunitzova typu pravděpodobně náleží také protein označený jako AFP-J (Mr = 13,5 kDa; inhibice trypsinu, chymotrypsinu a pepsinu), u kterého byla zjištěna silná aktivita vůči kvasinkám *C. albicans*, *Trichosporon beigelii* a *Saccharomyces cerevisiae*. Antifungální aktivita nebyla u tohoto proteinu zaznamenána<sup>30</sup>.

N-Koncová sekvence peptidu označeného jako Potide-G naznačuje, že i tento peptid patří do skupiny inhibitorů proteas Kunitzova typu. Jedná se o malý peptid (Mr = 5578,9 Da) s pozoruhodnou termostabilitou<sup>31</sup>. Inhibiční aktivita byla popsána vůči trypsinu, chymotrypsinu a papainu. Antimikrobiální aktivita peptidu Potide-G zahrnuje bakteriální (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*) i houbové (*C. albicans*, *R. solani*) patogeny<sup>32</sup>. U tohoto peptidu se také předpokládá antivirový účinek – Potide-G byl izolován z hlíz odrůdy Golden valley, která se vyznačuje vysokou mírou polní rezistence vůči viru Y (cit.<sup>31</sup>).

Geny kódující inhibitory proteas Kunitzova typu v hlízách bramboru se dělí do tří homogenních tříd s označením A, B a C (cit.<sup>33</sup>). Antifungální aktivita, konkrétně vůči houbovému patogenu *Fusarium moniliforme*, byla zaznamenána u homogenní skupiny A a B (cit.<sup>33</sup>).

Inhibitor karboxypeptidasy (PCI) představuje nejmenší inhibitor proteas (4,3 kDa; 39 aminokyselinových zbytků) hlíz bramboru vykazující vysokou míru termostability<sup>25</sup>. U tohoto peptidu byla zjištěna silná antifungální aktivita vůči významným patogenům rýže *Fusarium verticillioides* a *Magnaporthe oryzae* a z tohoto důvodu byl gen *pci* využit pro transgenózu rýže. Rostliny syntetizující hlízový inhibitor karboxypeptidasy vykazovaly zvýšenou rezistenci vůči zmíněným patogenům rýže i vůči hmyzím škůdcům *Chilo suppressalis* a *Spodoptera littoralis*<sup>34</sup>.

Ke skupině inhibitorů proteas pravděpodobně patří i skupina extracelulárních hlízových proteinů o nízké molekulové hmotnosti, které popisují Rymareva a spol.<sup>35</sup>. Extracelulární protein získaný z hlíz odrůdy náchylné vůči *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* obsahoval proteiny o velikosti 13, 12 a 11 kDa; u odolné odrůdy byl zaznamenán navíc výskyt proteinů o velikosti 21,5 a 19,5 kDa. Proteinový extrakt odolné odrůdy také vykazoval výrazně intenzivnější inhibiční aktivitu vůči patogenu *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

### 3.3. Antimikrobiální potenciál defensinů a ostatních proteinů

Rostlinné defensiny jsou variabilní skupinou malých proteinů/peptidů bohatých na cystein. Mechanismus účinku těchto obranných proteinů není zcela znám<sup>3</sup>. Defensiny izolované z hlíz bramboru jsou charakterizovány pouze částečně bez přesné znalosti mechanismu jejich působení. Do skupiny bramborových defensinů jsou řazeny proteiny/peptidy Snakin-1 (StSN1), Snakin-2 (StSN2), pseudothionin bramboru (StPth1) a defensiny DL1 a DL2 (cit.<sup>7</sup>).

#### 3.3.1. Antimikrobiální aktivita a charakteristika defensinů

Bramborový pseudothionin (StPth1) vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči významným bakteriálním a houbovým patogenům bramboru – mezi jinými i vůči bakteriálním patogenům *Pseudomonas solanacearum*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* a houbovým patogenům *Fusarium solani*, *Coletotrichum coccoides* a *Botrytis cinerea*<sup>36</sup>. Struktura tohoto defensinu s Mr 5 kDa je tvořena 47 aminokyselinami. U peptidu StPth1 nebyla zaznamenána inhibiční aktivita vůči trypsinu a stejně tak na rozdíl od „pravých“ thioninů neovlivňuje syntézu proteinů buněčné stěny a aktivitu β-glukuronidasy. Vysoká koncentrace tohoto defensinu byla nalezena především v květech, hlízách a listech bramboru. Peptid StPth1 vykazuje aktivitu vůči závažnému patogenu *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Navíc byla zjištěna schopnost peptidu způsobovat agregaci lyosomů, což naznačuje schopnost peptidu interagovat s membránovými strukturami buněk<sup>37</sup>.

Další významnou skupinou bramborových defensinů jsou peptidy označované jako snakin-1 a snakin-2. U basického peptidu Snakin-1 (StSN1) byla prokázána rozsáhlá antimikrobiální aktivita. Struktura peptidu obsahuje 63 aminokyselinových zbytků (mol. hmot. 6,9 kDa), z nichž 12 je cysteinových a tvoří 6 sulfidických můstků. Gen *StSN1* je v rostlině bramboru exprimován konstitutivně v různých tkáních v průběhu vývoje rostliny. U tohoto peptidu nebyla zjištěna indukce syntézy po ošetření tkáně gibberelinovou kyselinou ani v reakci na různé abiotické a biotické stresory. Spektrum antimikrobiálního působení StSN1 je podobný jako u peptidu StSN2 (cit.<sup>35</sup>). Při transformaci kulturních brambor geny *StSN1* druhu *Solanum chacoense* byla u transgenních linií zaznamenána zvýšená rezistence vůči patogenům *Pectobacterium corotovora* a *R. solani*<sup>39</sup>.

Snakin-2 (StSN2) je basický peptid (pI = 9,16) s molekulovou hmotností 7 kDa, jehož struktura je tvořena signálním peptidem, kyselým peptidem (pI = 3,1) a následnou sekvencí 66 aminokyselinových zbytků. Struktura peptidu obsahuje 12 cysteinových zbytků a dle N-koncová sekvence představuje tento peptid jednu ze tří podtříd skupiny snakin/GASA proteinů. V průběhu života rostliny je

StSN2 exprimován v hlízách, stoncích, květech a listech. Expres genů *StSN2* nebyla detegována v kořenech a stolonech a byla zjištěna indukce syntézy v reakci na mechanické poškození a ošetření tkáně absicovou kyselinou. Expres genů *StSN2* byla na lokální úrovni zvýšena ošetřením tkáně kompatibilní rasou patogena *B. cinerea* a snížena po ošetření virulentní bakterií *Ralstonia solanacearum* a *Pectobacterium chrysanthemi*. Snakin-2 vykazuje antimikrobiální aktivitu již při velmi nízké koncentraci (EC<sub>50</sub> = 1–20 μM) vůči rozsáhlé skupině houbových i bakteriálních patogenů – podrobnější informace jsou uvedeny v tab. II. V současné době je peptid StSN2 považován za významnou komponentu konstitutivního i indukovaného obranného systému bramboru<sup>38</sup>.

Málo informací je známo o skupině bramborových defensinů s označením DL1 a DL2 (angl. desintegrin-like). Jedná se o skupinu peptidů, které mohou být fylogeneticky příbuzní s proteiny hadích jedů tzv. hadími desintegranty a sdílejí s touto skupinou proteinů některé z obecných vlastností<sup>7</sup>. Peptidy DL1 a DL2 byly izolovány z hlíz bramboru a u obou peptidů byla prokázána schopnost inhibovat růst bakterie *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. U peptidu DL2 byla zjištěna schopnost agregovat lyposo-

Tabulka II

Inhibice vybraných bakteriálních a houbových organismů působením snakinů StSN1 a StSN2 a defensinu STPTH1 izolovaných z brambor<sup>38</sup>

Patogen	Inhibiční aktivita proteinu (EC <sub>50</sub> ) <sup>a</sup> [μM]		
	StSN2	StSN1	STPTH1
Bakterie			
<i>Clavibacter michiganensis</i>	1	4	7
<i>Ralstonia solanacearum</i>	NA	NA	25
<i>R. solanacearum (rfa)</i>	30	15	25
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	NA	NA	NA
<i>Rhizobium meliloti</i>	8	nt	NA
Houby			
<i>Botrytis cinerea</i>	2	0,8	1
<i>Fusarium solani</i>	3	2	0,2
<i>Fusarium culmorum</i>	2	2	NA
<i>Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans</i>	10	13	nt
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	20	13	nt
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	10	10	10
<i>Colletotrichum graminicola</i>	10	20	2
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	10	10	nt
<i>Bipolaris maydis</i>	20	20	10
<i>Aspergillus flavus</i>	20	20	nt

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub> – koncentrace účinné látky způsobující 50% inhibici cílového organismu; NA – peptid neaktivní při koncentraci ≤ 20 μM; nt – varianta nebyla testována



my, což naznačuje schopnost tohoto peptidu interagovat s buněčnými membránami inhibovaných bakteriálních buněk; v případě peptidu DL1 schopnost agregace lysosomů zjištěna nebyla a mechanismus účinku tohoto peptidu zůstává neznámý.

### 3.3.2. Charakteristika ostatních antimikrobiálních proteinů druhu *S. tuberosum*

Převažující část izolovaných proteinů druhu *S. tuberosum*, u kterých byla popsána antimikrobiální aktivita, byla uvedena v předchozích částech. Z hlíz či jiných částí rostlinného těla druhu *S. tuberosum* byly izolovány také proteiny, které nelze řadit k žádné z již uvedených skupin, přesto je ale nutné se o nich zmínit.

Z listů bramboru byl izolován protein označený jako AP<sub>1</sub>, který vykazoval inhibiční aktivitu vůči pěti patovarům bakteriálního patogena *R. solanacearum* a houbovým patogenům *Alternaria solani*, *R. solani*. Molekulová hmotnost proteinu je 32 kDa a na základě analýzy cDNA byla zjištěna přítomnost 343 aminokyselin. Protein obsahuje C-koncovou doménu, která má schopnost vazby na ATP a aminokyselinová sekvence N-konce proteinu vykazuje 58% podobnost s kyselou fosfatase izolovanou z druhu *Mesorhizobium loti*. Předpokládá se, že funkce AP<sub>1</sub> proteinu má souvislost s fosforylací a energetickým metabolismem rostliny<sup>40</sup>. Potenciál z pohledu využití v genovém inženýrství má bramborový lektin, označovaný jako *Solanum tuberosum* agglutinin (STA). Bramborový lektin je chimerická, na chitin se vázající bílkovina skládající se z lektinové a glykoproteinové domény bohaté na hydroxyprolin<sup>41</sup>. Hmotnost bramborového lektinu v nativním stavu je 100 kDa, přičemž hmotnost sacharidické složky představuje 50 % (w/w)<sup>42</sup>. Doposud byla popsána schopnost lektinu inhibovat růst hyf a klíčení spór hub *Trichoderma viride* a *B. cinerea*<sup>43</sup>.

Nedávno byla popsána antimikrobiální a proteolytická funkce rostlinných aspartátových proteas (APs)<sup>44</sup>. U druhu *S. tuberosum* byly identifikovány tři aspartátové proteasy, z nichž jedna byla izolována<sup>45</sup> z hlíz (StAP1) a dvě z listů (StAP2 a StAP3). Purifikace a charakterizace byla provedena u proteinů StAP1 a StAP3, které oba mají extracelulární lokalizaci a jsou syntetizovány indukovaně v reakci na biotický i abiotický stres. Zmiňované proteiny pravděpodobně sehrávají klíčovou roli v obraně vůči *P. infestans*, neboť oba vykazují velmi silný, inhibiční účinek na klíčení zoospor *P. infestans* a konidii druhu *F. solani*<sup>44</sup>. Podstatou mechanismu účinku proteinů StPA je pravděpodobně jejich schopnost interakce s povrchem spor a hyf zmiňovaných patogenů a následné zvýšení permeability buněčných membrán<sup>46</sup>. Molekulová hmotnost aspartátové proteasy izolované z listů bramboru je 40 kDa; jedná se o monomerní glykoprotein s hodnotou optimálního pH kolem 3, který je inhibován pepstatinem<sup>45</sup>. Vlastnosti aspartátové proteasy izolované z hlíz jsou podobné – molekulová hmotnost glykoproteinu 40 kDa, monomerní struktura, optimální pH 4–5 a inhibice pepstatinem<sup>47</sup>.

## 4. Praktické aspekty využití antimikrobiálních proteinů druhu *S. tuberosum*

Proteiny či peptidy s antimikrobiální aktivitou mají široké možnosti uplatnění zahrnující oblasti lidské i veterinární medicíny (léčba houbových, kvasinkových a bakteriálních chorob, sterilizace nemocničního a chirurgického materiálu), potravinářský průmysl (např. konzervace potravin, produkce obalových materiálů nové generace) či oblasti zemědělských biotechnologií při tvorbě nových genotypů zemědělských plodin se zvýšenou rezistencí vůči klíčovým patogenům<sup>1,5</sup>.

Inhibitory proteas hlíz bramboru patří k proteinové frakci, u které můžeme předpokládat nejširší varianty využití. Potenciál uplatnění inhibitorů proteas hlíz bramboru při léčbě různých onemocnění bylo již dříve shrnuto<sup>48</sup>. Jako příklad lze uvést hlízový inhibitor karboxypeptidasy, který je dosud jediný známý inhibitor lidského epidermálního růstového faktoru (EGF). EGF spolu s receptorem (EGFR) tvoří součást některých aspektů vývoje nádoru<sup>49</sup>. Antikarcinogenní účinky byly taktéž popsány u hlízových inhibitorů PI-1 a PI-2 (cit.<sup>50</sup>).

Hlavní směr využití antimikrobiálních proteinů hlíz bramboru lze spatřovat ve zvyšování rezistence zemědělských plodin prostřednictvím zemědělských biotechnologií nebo šlechtitelských postupů – např. úspěšné využití genů *pci* (geny inhibitoru karboxypeptidasy) pro tvorbu GMO rýže se zvýšenou odolností vůči patogenům *F. verticillioidea* a *M. oryzae*<sup>34</sup>. Potenciál markerů rezistence pro šlechtění druhu *S. tuberosum* má řada popsáných proteinů s prokázanou antibakteriální či antifungální aktivitou – např. patatin izolovaný z rezistentní odrůdy vykazoval vyšší míru inhibice klíčení spor patogena *P. infestans*<sup>22</sup>; extracelulární protein (pravděpodobně skupina inhibitorů proteas) izolovaný z genotypů s prokázanou rezistencí vůči bakteriálnímu patogenu *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* obsahuje proteiny, které u náchylných odrůd nalezeny nebyly<sup>35</sup>; protein Potide-G (inhibitor proteas Kunitzova typu) byl dosud izolován pouze z hlíz odrůdy Golden valley, která se vyznačuje vysokou mírou polní rezistence vůči viru Y (cit.<sup>31</sup>).

## 5. Závěr

Antimikrobiální proteiny a peptidy kulturního bramboru (*Solanum tuberosum* L.) byly dosud detegovány ve většině částí rostlinného těla, ale nejčastěji jsou izolovány z hlíz a listů. Jedná se o heterogenní skupinu proteinů, kterou lze klasifikovat dle společných biochemických vlastností do čtyř skupin. První skupinou je komplex patatinových proteinů, u nichž byla dosud popsána schopnost inhibice klíčení spor patogena *P. infestans*. Druhou skupinou jsou inhibitory proteas, a to zejména inhibitory proteas Kunitzova typu, u kterých byla popsána různorodá antifungální i antibakteriální aktivita. Třetí skupinou jsou tzv. bramborové defensiny, jejichž společným znakem je struk-

tura malých peptidů bohatých na cystein. A konečně poslední skupina zahrnuje proteiny vykazující antimikrobiální aktivitu, které nelze přiřadit k žádné z předchozích skupin, ať již z důvodu neexistence podobnosti či nedostatečnému množství informací o těchto proteinech. Jedná se např. o AP<sub>1</sub> protein izolovaný z listů nebo velmi perspektivní skupinu aspartátových proteas. Potenciál využití antimikrobiálních proteinů druhu *Solanum tuberosum* je široký, zahrnující oblasti veterinární a humánní medicíny i uplatnění v zemědělských biotechnologiích při produkci genotypů plodin se zvýšenou rezistencí vůči patogenním organismům.

Referát vznikl v rámci řešení projektu GAČR 522/09/1693, GAJU 064/2010/Z a výzkumného záměru MSM 6007665806.

## LITERATURA

- Neubauerová T., Macková M., Macek T., Koutek B.: Chem. Listy 103, 460 (2009).
- Broekaert W. F., Cammue B. P. A., De Bolle M. F. C., Thevissen K., De Samblanx G. W., Osborn R. W.: Crit. Rev. Plant Sci. 16, 297 (1997).
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 100, 495 (2006).
- FAOSTAT: <http://www.potato2008.org/en/world/index.html>, staženo 2.8. 2011.
- Wang M., Allefs S., van den Berg R. G., Vleeshuwers V. G. A. A., van der Vossen E. A. G., Vosman B.: Tudor. Appl. Genet. 116, 933 (2008).
- Rasocha V., Hausvater E., Doležal P.: Škodlivý činitele bramboru abionózy, choroby a škůdci. Výzkumný ústav bramborařský Havlíčkův Brod s.r.o, Havlíčkův Brod (2008).
- Kim J.-Y., Park S.-Ch., Hwang I., Cheong H., Nah J.-W., Hahm K.-S., Park Y.: Int. J. Mol. Sci. 10, 2860 (2009).
- Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 98, 373 (2004).
- Pots A. M.: *Disertační práce*. Wageningen Agricultural University, Wageningen 1999.
- Bárta J., Bártová V.: Czech J. Food Sci. 26, 347 (2008).
- Rosahl S., Schmidt R., Schell J., Willmitzer L.: Mol. Gen. Genet. 203, 214 (1986).
- Dennis S., Galliard T.: Phytochemistry 13, 2469 (1974).
- Strickland J. A., Orr G. L., Walsh T. A.: Plant Physiol. 109, 667 (1995).
- Senda K., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K.: Plant Cell Physiol. 37, 347 (1996).
- Kawakita K., Senda K., Doke N.: Plant Sci. 92, 183 (1993).
- Bostock R. M., Stermer B. A.: Annu Rev. Phytopathol. 27, 343 (1989).
- Senda K., Doke N., Kawakita K.: Plant Cell Physiol. 39, 1080 (1998).
- Tonón C., Daleo G., Oliva C.: Physiol. Biochem. 39, 849 (2001).
- Selitrennikoff C. P.: Appl. Environ. Microbiol. 7, 2883 (2001).
- Peyer C., Boney P., Staudacher E.: Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics 1672, 27 (2004).
- Tonón C., Guevara G., Oliva C., Daleo G.: J. Phytopathol. 150, 189 (2002).
- Sharma N., Gruszewski H. A., Park S.-W., Holm D. G., Vivanco J. M.: Plant Physiol. Bioch. 42, 647 (2004).
- Ryan C. A.: Annu. Rev. Phytopathol. 28, 303 (1990).
- Valueva T. A., Revina T. A., Gvozdeva E. L., Gerasimova N. G., Ozeretskovskaya O. L.: Bioorg. Khim. 29, 499 (2003).
- Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S. R., Broek van den L. A. M., Koningsveld van G. A., Voragen A. G. J.: J. Agric. Food Chem. 49, 2864 (2001).
- Jongsma M. A.: *Disertační práce*. Wageningen Agricultural University, Wageningen 1995.
- Richardson M.: Methods Plant Biochem. 5, 259 (1991).
- Valueva T. A., Revina T. A., Kladnitskaya G. V., Mosolov V. V.: FEBS Lett. 426, 131 (1998).
- Revina T. A., Gerasimova N. G., Kladnitskaya G. V., Halenko G. I., Valueva T. A.: Appl. Biochem. Microbiol. 44, 89 (2008).
- Park Y., Choi B. H., Klak J.-S., Kang Ch.-W., Lim H.-T., Cheong H.-S., Hahm K.-S.: J. Agric. Food Chem. 53, 6491 (2005).
- Tripathi G. R., Park J., Park Y., Hwang I., Park Y., Hahm K. S., Cheong H.: J. Agric. Food Chem. 54, 8437 (2006).
- Kim M. H., Park S. C., Kim J. Y., Lee S. Y., Kim Lim H. T., Cheong H. S., Hahm K. S., Park Y. K.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 346, 681 (2006).
- Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F.: Mol. Genet. Genomics 269, 526 (2003).
- Quallis J., Meynard D., Vila L., Avilés F. X., Guirderdoni E.: Plant Biotechnol. J. 5, 537 (2007).
- Kovalskaya N., Hammond R. W.: Protein Expression Purif. 63, 12 (2009).
- Caaveiro J. M. M., Molina A., González-Mañas J. M., Rodríguez-Palenzuela P., García-Olmedo F., Goñi F. M.: FEBS Lett. 410, 338 (1997).
- Berrocal-Lobo M., Segura A., Moreno M., López G., García-Olmedo F., Molina A.: Plant Physiol. 128, 951 (2002).
- Almasia N. I., Bazzini A. A., Hopp E., Vazquez-Rovere C.: Mol. Plant Pathol. 9, 329 (2008).
- Feng J., Juan F., Gao Y., Liang Ch., Xu J., Zhang Ch., He L.: Biochem. J. 376, 481 (2003).
- Kieliszewski M. J., Showalter A. M., Leykam J. F.: Plant J. 5, 849 (1994).
- Damme van E. J. M., Barre A., Rougé P., Peumans W. J.: Plant J. 37, 34 (2004).
- Mirelman D., Galun E., Sharon N., Lotan R.: Nature 256, 414 (1975).

43. Guevara M. G., Verissimo P., Pires E., Faro C., Daleo G. R.: *J. Plant Pathol.* 86, 233 (2004).
44. Guevara M. G., Daleo G. R., Oliva C. R.: *Physiol. Plant* 112, 321 (2001).
45. Mendieta J. R., Pagano M. R., Muñoz F. F., Daleo G. R., Guevara M. G.: *Microbiology* 152, 2039 (2006).
46. Guevara M. G., Oliva C. R., Machinandiarena M., Daleo G. R.: *Physiol. Plant* 106, 164 (1999).
47. Stanford A., Bevan M., Northcote D.: *Mol. Genet. Genomics* 215, 200 (1989).
48. Pourveau L.: *Disertační práce*. Wageningen Agricultural University, Wageningen 2004.
49. Sitja-Amat M., Molina M. A., Blanco-Aparicio C., Ferrer-Soler L., Lorenzo J., Avilés F. C., Querol E., Llorens de R.: *Cancer Lett.* 226, 169 (2005).
50. Huang C., Ma W.-Y., Ryan C. A., Dong Z.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11957 (1997).

V. Bártová, J. Bárta, A. Kamenová, A. Staňková, and V. Čurn (Department of Plant Production and Agroecology, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice): Characteristics of Potato Antimicrobial Proteins and Peptides and Their Application Potential

The review is focused on antimicrobial proteins and peptides isolated from cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* L.). The heterogenous group of specific proteins can be divided into four classes. The first is formed by patatin proteins which inhibit zoospore germination of the potato key pathogen *Phytophthora infestans*. The second class involves protease inhibitors mainly of the Kunitz type, which exhibit a wide range of antifungal and antibacterial activities. The third class contains potato defensins, small cysteine-rich peptides that are active against pathogens such as *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. The fourth class includes the antibacterial proteins that could not be classified into any of the mentioned classes. The AP<sub>1</sub> protein isolated from potato leaves or perspective aspartic proteases isolated from both potato tubers and leaves belong to this class. The application potentials of potato antimicrobial proteins and peptides are utilized in agricultural biotechnologies for creating resistant GMO genotypes of cultivated crops.

#### **4.1.2. Antifungální potenciál nízkomolekulárních proteinů a peptidů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) izolovaných z hlízové vody**

Hlízová voda je vedlejším produktem průmyslového zpracování brambor pro výrobu bramborového škrobu, po jehož odstranění zůstává v sušině (max. 5 až 6 %) poměrně vysoký obsah nevyužitých hodnotných proteinů (kolem 27 %) a peptidů (kolem 4 %). Takto získaná hlízová voda je směsí průmyslových odrůd bramboru hlíznatého pěstovaných právě pro účely získání škrobu. Některé ze skupin inhibitorů proteas se vyznačují vysokou termostabilitou a antifungální aktivitou při zpracování za vysokých teplot. Tyto vlastnosti byly využity při izolaci těchto skupin proteinů z hlízové vody a potenciál jejich antifungálních účinků byl ověřen na fytopatogenních houbách *Fusarium solani* a *Fusarium oxysporum* sledováním a hodnocením vlivu účinných látek na inhibici růstu mycelia těchto mikroskopických hub.

Kompletní informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty v publikaci:

**Kamenová A., Bártová V., Bárta J. (2011):** Antifungální potenciál nízkomolekulárních proteinů a peptidů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Úroda - vědecká příloha, 12: 213-216.

## ANTIFUNGÁLNÍ POTENCIÁL NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH PROTEINŮ A PEPTIDŮ HLÍZ BRAMBORU (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)

### Antifungal potential of low molecular proteins and peptides gained from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.)

Kamenová A., Bártová V., Bárta J.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

#### Abstrakt

Příspěvek se zabývá antifungálními účinky skupiny termostabilních proteinů a peptidů s převahou inhibitorů proteas, které byly izolovány z hlízové vody (vedlejší produkt průmyslového zpracování brambor na škrob, odrůdová směs *Solanum tuberosum* L.). Pro izolaci proteinů byla využita kombinace snížení pH a vysoké teploty (100°C). Izolované proteiny byly detekovány analýzou SDS-PAGE na peptidovém gelu v oblasti od 6 do 17 kDa. Majoritní podíl těchto proteinů byl v oblasti 17 kDa a další výrazný band byl zaznamenán v oblasti okolo 6,5 kDa. Testovaný vzorek byl aplikován v různých koncentracích ke třem kmenům fytopatogenní houby *Fusarium solani* a ke dvěma kmenům fytopatogenní houby *Fusarium oxysporum*. Byl zaznamenán inhibiční účinek na tyto kmeny hub u všech testovaných koncentrací účinné látky.

**Klíčová slova:** hlízová voda, *Solanum tuberosum* L., antifungální aktivita, inhibitory proteas

#### Abstract

The contribution deals with antifungal activities of group of thermostable proteins and peptides with a predominance of protease inhibitors recovered from potato fruit juice (by-product of industrial potato starch production, cultivar mixture of *Solanum tuberosum* L.). Combination of high temperature (100°C) and pH adjustment was used for protein isolation. Isolated proteins were detected in the SDS-PAGE analysis on peptide gel in range of 6 - 17 kDa. Two major significant bands were detected. First in 17 kDa area and second significant band was detected in area about 6,5 kDa. These proteins and peptides seem to be the major part of the isolated protein mixture. Different protein concentrations were applied to three different phytopathogenic fungal strains of *Fusarium solani* and two different phytopathogenic fungal strains of *Fusarium oxysporum*. Verifiable inhibition effect of all concentrations of active substance was marked on these fungi strains.

**Key words:** potato fruit juice, *Solanum tuberosum* L., antifungal activity, protease inhibitors

#### Úvod

Hlízová voda je vedlejší produkt výroby bramborového škrobu, obsah sušiny se pohybuje v rozsahu 5 až 6 %, obsah proteinů (N x 6,25) v sušině se pohybuje kolem 27 % a peptidů kolem 4 % (Bárta, Bártová 2007). Hlízové proteiny byly rozděleny dle práce Pots (1999) následovně: proteiny patatinového komplexu (molekulová hmotnost kolem 43 kDa), inhibitory proteas (molekulová hmotnost 8-25 kDa) a tzv. ostatní proteiny (molekulová hmotnost nad 45 kDa). Některé ze skupin **inhibitorů proteas** se vyznačují vysokou termostabilitou a optimální aktivitou i při zpracování za vysokých teplot. Inhibitory proteas jsou podle práce Jongmsma (1995) klasifikovány na principu aktivního místa, které inhibují (serinové, cysteinové, aspartátové, metalloproteasové), dle práce Pots (1999) jsou členěny na tři podtřídy podle molekulové velikosti, nebo dle práce Pouvreau et al. (2001) do sedmi tříd podle molekulové hmotnosti, stavby molekuly, hodnoty isoelektrického bodu a počtu sulfidických můstků.

Rostlinné inhibitory proteas jsou variabilní skupinou proteinů s mnoha funkcemi – v rostlinách jsou syntetizovány konstitutivně i indukovaně jako reakce na poranění, mohou mít funkci zásobních proteinů, ale často jsou také součástí obranných reakcí rostlin a vykazují inhibiční aktivitu vůči mnoha organismům, působí jako regulátory endogenní proteolytické aktivity a jsou nezastupitelné ve vývojových procesech včetně buněčné smrti (Hraška et al.

2006). Inhibitory proteas představují v hlízách bramboru velmi významnou, převážně konstitutivně syntetizovanou složku hlízových proteinů. Antimikrobiální vlastnosti byly dosud popsány pouze u některých skupin hlízových inhibitorů proteas - Speranskaya et al. (2006) popsali ve své práci vliv hlízových inhibitorů Kunitzova typu na růst a vývoj fytopatogenní houby *Fusarium culmorum*; Kim et al. (2005) ve své práci potvrdili antimikrobiální aktivitu bramborového inhibitoru proteas I (PI-1) proti fytopatogenní houbě *Rhizoctonia solani* Cílem příspěvku bylo studium antifungální aktivity termostabilních proteinů hlíz brambor s převahou inhibitorů proteas získaných z hlízové vody testovaných na fytopatogenních houbách *Fusarium solani* a *Fusarium oxysporum*.

#### **Materiál a Metody**

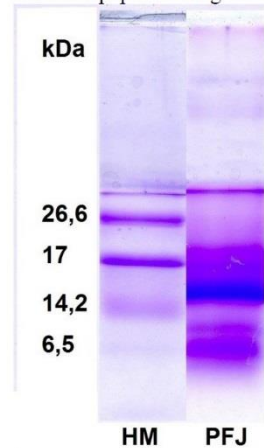
Rostlinným materiálem pro zdroj proteinů byla hlízová voda z průmyslového zpracování brambor na škrob (směs odrůd druhu *Solanum tuberosum* L.), která byla získána z podniku Lyckeby Amylex a. s., Horažďovice. Tento materiál byl centrifugací a filtrací zbaven škrobu, vlákniny a dalších ve vodě nerozpustných látek. Následně byla upravena reakce na pH 5 a tepelnou koagulací se provedla deproteinizace (oddělení majoritních, termolabilních proteinů) vytemperováním vzorku ve vodní lázni na 100°C. Po ukončení koagulace se provedla dialýza získaného supernatantu (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, Thermo Scientific) a vzorek se zakoncentroval lyofilizací. Získaná směs proteinů a peptidů byla rozpuštěna v ultra čisté vodě, roztok byl sterilizován bakteriálním filtrem (22 µl, Millipore) a aplikován v objemu 30µl do každé z jamek, které byly přesně umístěny na okraj rostoucího mycelia. U každé varianty pokusu byla jako kontrola aplikována sterilní, destilovaná voda. Antifungální testy byly prováděny na třech kmenech fytopatogenní houby *Fusarium solani* a na dvou kmenech fytopatogenní houby *Fusarium oxysporum*. Uvedené kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů v Brně. Izolovaná směs termostabilních proteinů byla aplikována v koncentracích 1mg/ml, 5 mg/ml a 10 mg/ml a byl sledován vliv na růst mikroskopických hub. Antifungální aktivita byla hodnocena po 24 a 48 hodinách kultivace při 26°C (Huynt et al. 1996). Izolované termostabilní peptidy a proteiny byly detekovány pomocí SDS-PAGE na peptidovém gelu.

#### **Výsledky a diskuze**

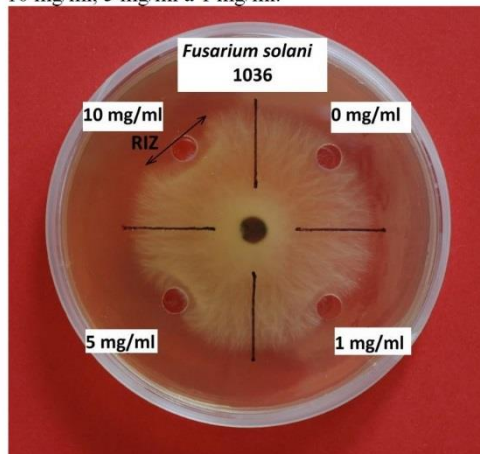
Termostabilní proteiny a peptidy byly detekovány pomocí SDS-PAGE na peptidovém gelu v oblasti od 6 do 17 kDa v pěti výrazných zónách (obrázek 1). Nejintenzivnější band se nacházel v oblasti kolem 14 kDa, což naznačuje majoritní podíl těchto peptidů ve směsi. Pravděpodobně se jedná o hlízové inhibitory proteas II (PI-2), serinové inhibitory proteas 2 a inhibitory proteas Kunitzova typu. Další výrazné bandy se nachází v oblasti kolem 6 kDa. V tomto případě by se mohlo jednat o hlízové inhibitory proteas I (PI-1) a serinové inhibitory proteas. Kim et al. (2005) ve své práci uvádí detekci antimikrobiálních termostabilních peptidů o molekulové hmotnosti 5,6 kDa.

Antifungální aktivita izolované směsi peptidů a proteinů získaných z hlízové vody byla testována na čtyřech kmenech fytopatogenní houby *F. solani* (kmeny 1036, 8014 a 8079) a *F. oxysporum* (kmeny 17, F-65). U všech kmenů byla zaznamenána tvorba inhibiční zóny po 24 hodinách kultivace (obrázek 2) a byla měřena hodnota rozpětí inhibiční zóny-RIZ (znázorněno na obrázku 2). Největší RIZ bylo naměřeno u varianty s koncentrací 10 mg/ml a to v rozpětí RIZ=16 až 24 mm v porovnání všech testovaných mikroskopických hub.

**Obr. 1:** Detekce termostabilních proteinů a peptidů pomocí SDS-PAGE na peptidovém gelu.



**Obr. 2:** Ukázka měření RIZ a vytvořené inhibiční zóny na okrajích mycelia kultury *F. solani* u koncentrací 10 mg/ml, 5 mg/ml a 1 mg/ml.



HM – hmotnostní marker; PFJ – deproteinizovaná odrůdová směs *S. tuberosum* L.; RIZ – rozpětí inhibiční zóny

Inhibiční zóna byla zřetelná i u varianty koncentrace 5 mg/ml (rozpětí RIZ=11 až 21), méně zřetelný byl účinek testované látky o koncentraci 1 mg/ml, kdy bylo zpomalení růstu mycelia patrné až po 48 hodinách kultivace u všech testovaných kmenů kromě kmenů *F. solani* 8079 a *F. oxysporum* 17, u nichž se projevila zvýšená citlivost k nižší koncentraci účinné látky již po 24 hodinách kultivace, na rozdíl od ostatních testovaných kmenů. Při vzájemném porovnání působení směsi proteinů na testované kmeny rodu *F. solani*, jako typického patogena druhu *S. tuberosum*, a testovanými kmeny *F. oxysporum* nebyly zaznamenány žádné výrazné rozdíly jak při porovnání obou rodů navzájem, tak při vzájemném porovnání jednotlivých kmenů, byla však zaznamenána zvýšená citlivost kmenů *F. solani* 8079 a *F. oxysporum* 17 na nižší koncentraci účinné látky (1 mg/ml). Z výsledků vyplývá, že termostabilní frakce hlízových proteinů izolovaná z „odpadního“ produktu škrobárenského průmyslu vykazuje zajímavé antifungální vlastnosti, které je nutné dále podrobněji studovat, neboť tyto proteiny by mohly být v budoucnu využitelné v řadě biotechnologických aplikací.

#### Závěr

Příspěvek se zabýval antifungální aktivitou nízkomolekulárních proteinů a peptidů získaných z hlízové vody. Izolované proteiny byly analyzovány SDS-PAGE na peptidovém gelu detekovány v oblasti 14 kDa a v oblasti kolem 6 kDa, tedy v oblasti výskytu inhibitorů proteas. Tyto proteiny si i přes expozici teplotě 100°C uchovaly svou antifungální aktivitu, která byla prokázána na fytopatogenních druzích hub *Fusarium solani* a *Fusarium oxysporum* tvorbou inhibičních zón u koncentrací 10 a 5 mg/ml po kultivaci 24 hodin při teplotě 26°C a u kmenů *F. solani* 8079 a *F. oxysporum* 17 byla pozorována tvorba inhibiční zóny již při koncentraci 1 mg/ml po kultivaci 24 hodin. Po kultivaci 48 hodin (26°C) bylo zpomalení růstu pozorováno i u ostatních kmenů při koncentraci 1 mg/ml testované látky. Získané výsledky naznačují zajímavý potenciál termostabilní frakce hlízových proteinů s možným budoucím využitím v mnoha biotechnologických aplikacích.

### Dedikace

Výsledky byly získány v rámci řešení výzkumných projektů GAČR 522/09/1693, GAJU 064/2010/Z a výzkumného záměru MSM 6007665806.

### Použitá literatura

- Bárta J., Bártová V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 116 s.
- Hraška M., Rakouský S., Čurn V. (2006): Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenozí rostlin. *Chemické Listy* 100: 501-507.
- Huynh Q. K., Borgmeyer J. R., Smith C. E., Bell L. D., Shah D. M. (1996): Isolation and characterization of a 30 kDa protein with antifungal activity from leaves of *Engelmannia pinnatifida*. *Biochemical Journal*, 316: 723-727.
- Jongsma M. A. (1995): The resistance of insect to plant proteinase inhibitors. Centre for Plant Breeding and Reproduction. Wageningen. Wageningen University.
- Kim J.-Y., Park S.-C., Kim M.-H., Lim H.-T., Park Y., Hahn K.-S. (2005): Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330: 921-927.
- Liu G., Chen N., Kaji A., Bode A. M., Ryan C. A., Dong Z. (2001): Proteinase inhibitors I and II from potatoes block UVB-induced AP-1 activity by regulating the AP-1 protein compositional patterns in JB6 cells. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 10: 5786-5791.
- Pots A. M. (1999): Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein. Ph. D thesis. Wageningen Agricultural university, Wageningen, The Netherlands, 123 p.
- Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S. R., Broek van der L.A.M., Koningsvald van G.A., Voragen A. G. J. (2001): Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato fruit juice from cv. Elkana. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49: 2864–2874.
- Speranskaya A. S., Krinitsina A. A., Revina T. A., Gerasimova N. G., Keruchenko Y. A. S., Shevelev A. B., Valueva T. A. (2006): Heterologous expression, purification, and properties of a potato protein inhibitor of serine proteinases. *Biochemistry (Moscow)*, 11: 1176-1182.

### Kontaktní adresa:

Ing. Andrea Kamenová  
Oddělení pěstování rostlin  
Katedra rostlinné výroby a agroekologie  
Zemědělská fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice  
email: [Andrea.Kamenova@seznam.cz](mailto:Andrea.Kamenova@seznam.cz)



#### 4.1.3. Hodnocení vlivu odrůdových rozdílů termostabilních proteinů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) na inhibici růstu vybraných druhů fytopatogenních hub.

Majoritní složkou termostabilních proteinů jsou skupiny inhibitorů proteas, které jsou variabilní skupinou proteinů hrající důležitou roli i v obraně rostlin proti predátorům a patogenům. Hlavní roli v těchto obranných mechanismech hrají s největší pravděpodobností inhibitor proteas I a inhibitory Kunitzova typu. Antimikrobiální vlastnosti byly dosud popsány pouze na některých druzích fytopatogenních hub, do současnosti však se žádný příspěvek nezabýval hodnocením rozdílů antifungálních vlastností odrůd bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) v kombinaci s porovnáním teplotních variant hlízové šťávy (tepelně nezpracované a tepelně zpracované při 80°C) a jejich vliv na inhibici růstu mycelia fytopatogenních druhů hub *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani*. Získanými výsledky bylo ověřeno, že hlízová šťáva nabývá svých antifungálních vlastností teprve po tepelném zpracování a následném zakoncentrování proteinů s těmito vlastnostmi a dále bylo zjištěno, že se od sebe odrůdy ve svých antifungálních vlastnostech liší a to přímo úměrně s rostoucím množstvím izolátu v testovaném vzorku.

Kompletní informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty v publikaci:

**Kamenová A., Bárta J., Bártová V. (2012):** Hodnocení vlivu odrůdových rozdílů termostabilních proteinů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) na inhibici růstu vybraných druhů fytopatogenních hub. Úroda - vědecká příloha, 12: 61-66.

**HODNOCENÍ Vlivu ODRŮDOVÝCH ROZDÍLŮ  
TERMOSTABILNÍCH PROTEINŮ HLÍZ BRAMBORU (*Solanum  
tuberosum* L.) NA INHIBICI RŮSTU VYBRANÝCH DRUHŮ  
FYTOPATOGENNÍCH HUB**

**The variety assessments of thermostable proteins gained from different  
potato tuber cultivars (*Solanum tuberosum* L.) and their influence on  
growth inhibition of selected phytopathogenic fungi**

Kamenová A., Bárta J., Bártová V.

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta*

**Abstrakt**

Príspevek se zabýval hodnocením rozdílů antifungálních vlastností dvou odrůd bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) Fabia a Laura lišící se užitkovým směrem a délkou vegetační doby a porovnáním antimikrobiálních aktivit u dvou teplotních variant hlízové šťávy. Izolace proteinů probíhala za podmínek sníženého pH a působení vysoké teploty (80°C) a pro porovnání pouze za podmínek sníženého pH. Izolované termostabilní proteiny byly detekovány analýzou SDS-PAGE na peptidovém gelu v oblasti 6 a 14 kDa a u tepelně nezpracované hlízové šťávy od 17 do 26 kDa. Testované vzorky byly aplikovány v různých koncentracích ke čtyřem druhům fytopatogenních hub *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani*. Největší inhibice růstu mycelia bylo dosaženo při koncentraci 10 mg/ml, v průměru měla vyšší antifungální účinnost odrůda Laura, všeobecně byly k těmto termostabilním proteinům citlivější houbové kultury *F. graminearum* a *R. solani*, antifungální aktivita však nebyla zaznamenána u směsi proteinů tepelně nezpracované hlízové šťávy

Klíčová slova: hlízová šťáva, *Solanum tuberosum* L., antifungální aktivita, termostabilní proteiny, odrůdové rozdíly

**Abstract**

The contribution deals with the variety assessments of antifungal potential of two potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) Fabia and Laura differing in the market and maturity and comparison of two potato fruit juice alternatives differing in processing temperature. Combination of pH adjustment and high temperature (80°C) or pH adjustment only was used for protein isolation. Isolated thermostable proteins were detected in the SDS-PAGE analysis on peptide gel in range of 6 and 14 kDa and in range from 17 to 26 kDa in the sample of the thermally untreated potato fruit juice. Different protein concentrations were applied to four different phytopathogenic fungi *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani*. The greatest inhibition of mycelial growth was achieved at a concentration of 10 mg/ml, Laura variety had greater antifungal effect in average, phytopathogenic fungi *F. graminearum* and *R. solani* were more sensitive to the thermostable proteins in general but inhibition effect of thermally untreated substance was not registered.

**Key words:** potato fruit juice, *Solanum tuberosum* L., antifungal activity, thermostable proteins, cultivar variability

## Úvod

Majoritní složkou termostabilních proteinů jsou skupiny inhibitorů proteas, které jsou variabilní skupinou proteinů a hrají důležitou roli i v obraně proti predátorům a patogenům. Inhibitory proteas jsou charakterizovány molekulovou hmotností v rozmezí od 3 do 25 kDa a tvoří v hlízách bramboru velmi významnou, převážně konstitutivně syntetizovanou složku hlízových proteinů představující asi 50 % všech proteinů v hlízové šťávě (Pouvreau 2004). Studie, které se do současnosti zabývaly antimikrobiální aktivitou hlízových bílkovin brambor, pracovaly pouze s jednou odrůdou bramboru hlíznatého (Kim et al. 2005; 2006; Speranskaya et al. 2006, Jin et al. 2009, Ohh et al. 2009) nebo byla, jako zdroj proteinů, použita hlízová voda z průmyslového zpracování brambor na škrob, která je směsí odrůd druhu *Solanum tuberosum* L. (Kamenová et al. 2011, Bárta et al. 2012) a vzájemné porovnání antimikrobiálních vlastností odrůd mezi sebou publikováno nebylo.

Antimikrobiální vlastnosti byly dosud popsány pouze u některých kultur fytopatogenních hub - Kim et al. (2005) ve své práci popsal antimikrobiální aktivitu bramborového inhibitoru proteas I (PI-1) proti fytopatogenní houbě *Rhizoctonia solani*, Mendieta et al. (2006) a Seliternikoff (2001) potvrdili pozitivní antifungální účinek hlízových proteinů na druh *Fusarium solani*, Speranskaya et al. (2006) potvrdili ve své práci vliv hlízových inhibitorů Kunitzova typu na růst a vývoj fytopatogenní houby *Fusarium culmorum*.

Cílem příspěvku bylo vzájemné porovnání antimikrobiální aktivity proteinů izolovaných z hlízové šťávy dvou odrůd brambor připravené ve dvou teplotních variantách - před tepelnou koagulací a po tepelné koagulaci při 80°C. Antimikrobiální aktivita byla testována na čtyřech kmenech fytopatogenních hub *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani*.

## Materiál a metody

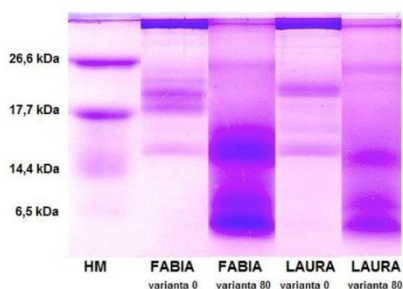
Rostlinným materiálem pro zdroj proteinů byla hlízová šťáva připravená ze dvou odrůd bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.). Obě odrůdy brambor byly vypěstovány za přesně definovaných podmínek v roce 2011 formou maloparcelkových pokusů na stanovišti v Českých Budějovicích (380 m n. m.). Odrůda Fabia je raná a používá se pro zpracování na škrob, Laura je poloraná a je odrůdou konzumní. Z hlíz brambor každé odrůdy byly odšťavněním na kuchyňském odšťavňovači připraveny hlízové šťávy, které byly centrifugací (4500 rpm, 30 minut) a filtrací zbaveny škrobu, vlákniny a dalších ve vodě nerozpustných látek. U takto získaných šťáv byla upravena reakce na pH 5 a následně byl materiál rozdělen na hlízovou šťávu, která nebyla tepelně zpracována (tzv. varianta 0) a na šťávu, u které se provedla deproteinizace tepelnou koagulací (oddělení majoritních, termolabilních proteinů) vytemperováním vzorku ve vodní lázni na 80°C. U získaného supernatantu obou variant se provedla dialýza (3,5 K MWCO, Pierce SnakeSkin Dialysis Tubing, Thermo Scientific) a vzorek se zakonzentroval lyofilizací. Získaná směs proteinů a peptidů byla rozpuštěna v ultra čisté vodě, roztok byl sterilizován bakteriálním filtrem (0,22 µm, Millex Filter Units, Millipore) a aplikován v objemu 30 µl do každé z jamek, které byly přesně umístěny na okraj rostoucího mycelia. Jako kontrola byla, u každé varianty pokusu, aplikována sterilní, destilovaná voda. Antifungální testy byly prováděny na fytopatogenních kmenech hub *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani*. Testované kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů v Brně. Izolované směsi proteinů byly aplikovány v koncentracích 1 mg/ml, 5 mg/ml a 10 mg/ml a byl sledován vliv na růst mikroskopických hub. Antifungální aktivita byla hodnocena po 24 hodinách kultivace při 26°C (Hunth et al. 1996). Inhibice růstu mycelia byla vyhodnocována na digitálních fotografiích pomocí počítačového software metodou měření ploch inhibičních zón u jednotlivých opakování.

Izolované peptidy a proteiny byly analyzovány pomocí SDS-PAGE na 16% peptidovém gelu.

### Výsledky a diskuze

Proteiny tepelně nezpracované hlízové šťávy byly detekovány v oblasti 14 kDa a další výrazná zóna bandů byla v oblasti od 17 do 26 kDa u obou odrůd (obrázek 1). Antifungální aktivita izolovaných proteinů byla testována na čtyřech fytopatogenních kmenech hub (*Fusarium graminearum* F-683, *Fusarium oxysporum* F-65, *Fusarium solani* 8079 a *Rhizoctonia solani* F-1). U žádného z testovaných kmenů nebyla pozorována inhibice růstu mycelia po 24 hodinách kultivace při aplikaci proteinového izolátu odrůdy Fabia a Laura v koncentracích 1; 5 a 10 mg/ml účinné látky (obrázky 2 a 3).

Obrázek 1: Detekce proteinů pomocí SDS-PAGE na peptidovém gelu. (HM - hmotnostní marker)



Obrázek 2: Ukázka účinku tepelně nezpracované hlízové šťávy z odrůdy Laura v koncentracích účinné látky 1; 5; 10 mg/ml a 0 značící kontrolu na houbové kultuře *Rhizoctonia solani*.



Obrázek 3: Ukázka účinku tepelně nezpracované hlízové šťávy z odrůdy Fabia v koncentracích účinné látky 1; 5; 10 mg/ml a 0 značící kontrolu na houbové kultuře *Fusarium solani*.



Termostabilní proteiny byly detekovány pomocí SDS-PAGE na 16% peptidovém gelu v oblasti kolem 6 kDa a 14 kDa a ve dvou výrazných zónách s vyšší intenzitou bandů u odrůdy Fabia a méně intenzivní bandy byly detekovány v oblasti 26 kDa u obou odrůd (obrázek 1). V práci Kim et al. (2005) byly detekovány termostabilní antimikrobiální peptidy o molekulové hmotnosti 5,6 kDa. Antifungální aktivita izolovaných proteinů byla testována na stejných čtyřech výše uvedených fytopatogenních kmenech hub. Inhibice růstu mycelia byla pozorována u všech testovaných houbových kultur, koncentrací a odrůd po 24 hodinách kultivace (obrázky 4-7).

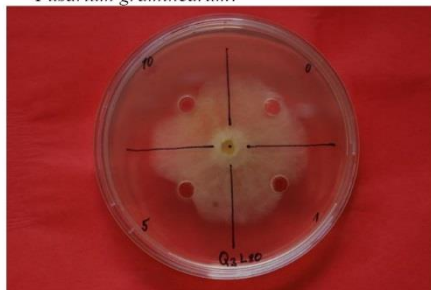
Obrázek 4: Ukázka účinku tepelně zpracované hlízové šťávy při 80°C z odrůdy Fabia v koncentracích účinné látky 1; 5; 10 mg/ml a 0 značící kontrolu na houbové kultuře *Fusarium graminearum*.



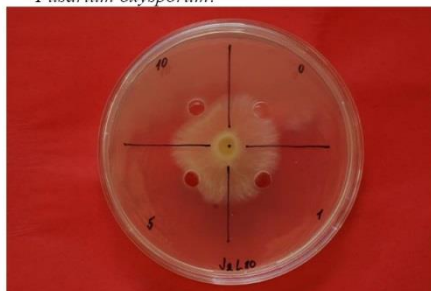
Obrázek 6: Ukázka účinku tepelně zpracované hlízové šťávy při 80°C z odrůdy Fabia v koncentracích účinné látky 1; 5; 10 mg/ml a 0 značící kontrolu, na houbové kultuře *Rhizoctonia solani*.



Obrázek 5: Ukázka účinku tepelně zpracované hlízové šťávy při 80°C z odrůdy Laura v koncentracích účinné látky 1; 5; 10 mg/ml a 0 značící kontrolu na houbové kultuře *Fusarium graminearum*.



Obrázek 7: Ukázka účinku tepelně zpracované hlízové šťávy při 80°C z odrůdy Laura v koncentracích účinné látky 1; 5; 10 mg/ml a 0 značící kontrolu, na houbové kultuře *Fusarium oxysporum*.



Digitální fotografie s testovanými kulturami byly vyhodnoceny citlivým počítačovým softwarem a to tak, že byla měřena velikost plochy inhibičních zón u jednotlivých opakování a koncentrací, průměry měření těchto opakování jsou zaznamenány v tabulce 1. Největší antifungální účinek se projevil při koncentraci účinné látky 10 mg/ml u obou testovaných odrůd, větší plochy inhibičních zón byly u odrůdy Laura. K izolátům proteinů byla výrazně nejcitlivější kultura *F. graminearum* (obrázky 4 a 5), naopak nejméně citlivou kulturou bylo *F. solani*. Při koncentraci 5 a 10 mg/ml měla větší antifungální účinek odrůda Laura s výjimkou účinku na *F. solani* při koncentraci účinné látky 10 mg/ml (rozdíl mezi odrůdami 2,9 mm<sup>2</sup>).

Tabulka 1: Plocha inhibičních zón u testovaných houbových kultur při aplikaci termostabilních proteinů odrůd Fabia a Laura v koncentracích 1; 5 a 10 mg/ml.

Odrůda <i>Solanum tuberosum</i> L.	Fabia	Laura	Fabia	Laura	Fabia	Laura
	1mg/ml	1mg/ml	5mg/ml	5mg/ml	10mg/ml	10mg/ml
<b>Houbová kultura</b>	plocha inhibiční zóny [mm <sup>2</sup> ]					
<i>Fusarium graminearum</i> F-683	17,1 <sup>hi</sup>	17,1 <sup>hi</sup>	54,9 <sup>cde</sup>	73,0 <sup>bc</sup>	62,9 <sup>bcd</sup>	106,7 <sup>a</sup>
<i>Fusarium oxysporum</i> F-65	7,6 <sup>i</sup>	17,8 <sup>hi</sup>	20,5 <sup>ghi</sup>	40,5 <sup>efg</sup>	29,2 <sup>fgh</sup>	67,1 <sup>bcd</sup>
<i>Fusarium solani</i> 8079	4,0 <sup>i</sup>	5,5 <sup>i</sup>	22,6 <sup>ghi</sup>	29,8 <sup>fgh</sup>	54,3 <sup>cde</sup>	51,4 <sup>de</sup>
<i>Rhizoctonia solani</i> F-1	8,1 <sup>i</sup>	6,5 <sup>i</sup>	34,4 <sup>efgh</sup>	49,1 <sup>def</sup>	74,9 <sup>bc</sup>	83,47 <sup>ab</sup>

Poznámka: Písmena indikují statistickou významnost průměrů na hladině významnosti P<0,05 (Fisher LSD test). Písmena jsou seřazena v abecedním pořádku podle snižující se hodnoty plochy inhibiční zóny.

Z výsledků vyplývá, že širší spektrum proteinů izolovaných z tepelně nezpracované hlízové šťávy nemá prokazatelný antifungální účinek v testovaných koncentracích na rozdíl od termostabilních frakcí proteinů odrůd Fabia a Laura, u kterých byly sledovány výrazné antifungální vlastnosti. Největší inhibice růstu mycelia bylo dosaženo při koncentraci 10 mg/ml, v průměru má vyšší antifungální účinnost odrůda Laura, všeobecně jsou k těmto termostabilním proteinům citlivější houbové kultury *F. graminearum* a *R. solani*.

### **Závěr**

Príspevek se zabýval hodnocením rozdílů antifungálních vlastností odrůd bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) Fabia a Laura a porovnáním teplotních variant hlízové šťávy (tepelně nezpracované a tepelně zpracované při 80°C). Izolované termostabilní proteiny byly detekovány analýzou SDS-PAGE na peptidovém gelu v oblasti 6 a 14 kDa a od 17 do 26 kDa u tepelně nezpracované hlízové šťávy. Při termokoagulaci a následné centrifugaci došlo k zakoncentrování termostabilních proteinů, které si i přes expozici teplotě 80°C uchovaly svou antifungální aktivitu, která byla prokázána na fytopatogenních druzích hub *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani* inhibicí růstu mycelia při aplikaci testované látky v koncentracích 1; 5 a 10 mg/ml po kultivaci 24 hodin při teplotě 26°C. V průměru měla větší inhibiční aktivitu odrůda Laura u všech testovaných koncentrací, nejcitlivější byla z testovaných fytopatogenů kultura *Fusarium graminearum* u které byla zaznamenána největší inhibice růstu při aplikaci testované látky odrůdy Laura v koncentraci 10 mg/ml. Získanými výsledky bylo ověřeno, že hlízová šťáva nabývá svých antifungálních vlastností teprve po tepelném zpracování a následném zakoncentrování proteinů s těmito vlastnostmi a dále bylo zjištěno, že se od sebe odrůdy ve svých antifungálních vlastnostech liší a to přímo úměrně s rostoucím množstvím účinné látky v testovaném vzorku. Z těchto závěrů vyplývá, že je do budoucna vhodné cíleně využívat k výzkumu a následným biotechnologickým aplikacím konkrétní odrůdy brambor, které se vyznačují větším množstvím termostabilních inhibitorů proteas s vykazujícími antimikrobiálními vlastnostmi.

### **Dedikace**

Výsledky byly získány v rámci řešení výzkumných projektů GAJU 030/2012/Z a GAČR 522/09/1693.

### **Použitá literatura**

- Bárta, J., Bártová V., Kamenová A., Zdráhal Z., Brabcová A., Čurn V. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta. Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností. Česká republika. Užitečný vzor, CZ 23983 U1. Zapsáno 18. 6. 2012. Dostupné z: <http://spisy.upv.cz/UtilityModels/FullDocuments/FDUM0023/uv023983.pdf> [online 21. 8. 2012]
- Huynh Q. K., Borgmeyer J. R., Smith C. E., Bell L. D., Shah D. M (1996): Isolation and characterization of a 30 kDa protein with antifungal activity from leaves of *Engelmannia pinnatifida*. *Biochemical Journal*, 316: 723-727.
- Jin Z., Shinde P. L., Yang Y. X., Choi J. Y., Yoon S. Y., Hahn T.-W., Lim H. T., Park Y. K., Hahn K. S., Joo J. W., Chae P. J. (2009): Use of refined potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as an alternative to antibiotics in weanling pigs. *Livestock Science*, 124: 26-32.
- Kamenová A., Bártová V., Bárta J. (2011): Antifungální potenciál nízkomolekulárních proteinů a peptidů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). *Úroda*, 12: 213-216.

---

Kim J.-Y., Park S.-C., Kim M.-H., Lim H.-T., Park Y., Hahm K.-S. (2005): Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330: 921-927.

Kim M.-H., Park S.-C., Kim J.-Y., Lee S. Y., Lim H.-T., Cheong H., Hahm K.-S., Park Y. (2006): Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden Valley". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346: 681-686.

Mendieta J. R., Pagano M. R., Muñoz F. F., Daleo G. R., Guevara M. G. (2006): Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology*, 1052: 2039-2047.

Ohh S. H., Shinde P. L., Jin Z., Choi J. Y., Hahn T.-W., Lim H. T., Kim G. Y., Park Y., Hahm K.-S., Chae B. J. (2009): Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as an antimicrobial agent in the diets of broilers. *Poultry Science*, 88: 1227-1234.

Pouvreau L. (2004): Occurrence and physic-chemical properties of protease inhibitors from potato tuber (*Solanum tuberosum*). Ph.D. thesis, Wageningen University, The Netherlands, 157.

Selitrennikoff C. P. (2001): Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 288-2894.

Speranskaya A. S., Krinitsina A. A., Revina T. A., Gerasimova N. G., Keruchenko Y. A. S., Shevelev A. B., Valueva T. A. (2006): Heterologous xpression, purification, and properties of a potato protein inhibitor of serine proteinases. *Biochemisty (Moscow)*, 11: 1176-1182.

**Kontakní adresa**

Ing. Andrea Kamenová

Oddělení pěstování rostlin

Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Zemědělská fakulta

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Studentská 13

370 05 České Budějovice

email: Andrea.Kamenova@seznam.cz

#### 4.1.4. Postup izolace frakcí extracelulárních proteinů hlíz bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.)

Extracelulární proteiny izolované z hlíz bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) lze charakterizovat jako relativně malé proteiny s antimikrobiální aktivitou nacházející se mimo vnitřní prostor buňky. Mohou být vázány v buněčných stěnách nebo na jejich povrchu a patří do skupiny proteinů, při jejichž izolaci se používají silná precipitační činidla, neboť jen část z nich je dobře rozpustná ve vodě. Jedná se o proteiny, které mají molekulovou hmotnost od 6 do 30 kDa a byly izolovány z rostlin čeledi *Brassicaceae*, *Solanaceae* a podčeledi *Panicoideae*. Jejich antimikrobiální aktivita byla prokázána na celé řadě bakterií, které jsou původci onemocnění rostlin, např. *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas solanacearum*, *Rastonia meliloti* a byla prokázána i na houbových patogenech, např. *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Colletotrichum graminicola* a *Aspergillus flavus*. Dle autorského kolektivu Taran et al. 2002 je výhodou těchto proteinů, že v porovnání s antibiotiky nevyvolávají alergenní reakce a organismus si k nim nevytváří rezistenci při opakované aplikaci.

Kompletní informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty v publikaci:

**Kamenová A.**, Bártová V., Bárta J. (2013): Postup izolace frakcí extracelulárních proteinů hlíz bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.). Úroda vědecká příloha 12: 206-209.



## POSTUP IZOLACE FRAKČÍ EXTRACELULÁRNÍCH PROTEINŮ HLÍZ BRAMBORU HLÍZNATÉHO (*SOLANUM TUBEROSUM* L.)

### Isolation of extracellular protein fractions from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.)

Kamenová A., Bárta J., Bártová V.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta

#### Abstrakt

Cílem tohoto příspěvku byla izolace extracelulárních proteinů, které jsou zakomponovány v buněčných stěnách hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a jsou součástí obranného mechanismu při napadení rostlin patogenem. Z hlíz bramboru odrůdy Siby byly izolovány proteiny v oblastech 6-14 kDa, 14-17 kDa a 26-29 kDa. Po dialýze pomocí 3,5 MWCO membrány nebyly po elektroforetické analýze detekovány žádné ztráty proteinů. Část extracelulárních proteinů však byla ve vodě nerozpustná a po jejich odstranění centrifugací došlo ke změně proteinového spektra v supernatantu a to v podobě ztráty dvou skupin proteinů. Proteiny rozpuštěné v supernatantu byly detekovány v oblastech 14-17 kDa a 26 kDa.

**Klíčová slova:** izolace extracelulárního proteinu, hlízy bramboru, *Solanum tuberosum* L.

#### Abstract

The goal of this work was to isolate extracellular proteins which are part of cell walls of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) and play an important role in the defence mechanism when plants are attacked by pathogens. Isolated proteins were gained from potato tubers variety Siby and their molecular weight was from 6-14 kDa, 14-17 kDa and 26-29 kDa. After dialysis by 3.5 MWCO membrane were not detected any protein losses. Part of extracellular proteins in the sample was not dissolved in water and there were detected differences in the protein spectrum in the supernatant after the removal of the undissolved proteins by centrifugation. These dissolved proteins in supernatant were detected as two bands of molecular weight from 14-17 kDa (main band) and 26 kDa.

**Key words:** extracellular protein isolation, potato tubers, *Solanum tuberosum* L.

#### Úvod

Extracelulární proteiny izolované z bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) lze charakterizovat jako relativně malé proteiny s antimikrobiální aktivitou nacházející se mimo vnitřní prostor buňky. Mohou být vázány v buněčných stěnách nebo na jejich povrchu a patří do skupiny proteinů, při jejichž izolaci se používají silná precipitační činidla (Rymareva et al. 2003). Jedná se o proteiny, které mají molekulovou hmotnost od 6 do 30 kDa a byly izolovány z rostlin čeledi *Brassicaceae*, *Solanaceae* a podčeledi *Panicoideae* (de Souza Cândido et al. 2011). Jejich antimikrobiální aktivita byla prokázána na celé řadě bakterií, které jsou původci onemocnění rostlin, např. *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas solanacearum*, *Rastonia meliloti* a byla prokázána i na houbových patogenech, např. *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Colletotrichum graminicola* a *Aspergillus flavus* (Moreno, Segura, García-Olmedo 1994, Segura et al. 1999, Berrocal-Lobo et al. 2002, Rymareva et al. 2003). Výhodou těchto proteinů je, že v porovnání s antibiotiky nevyvolávají alergenní reakce a organismus si k nim nevytváří rezistenci při opakované aplikaci (Taran et al. 2002).

## Materiál a metody

Zdrojem rostlinného materiálu byly hlízy bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) odrůdy Sibů, která se používá při průmyslovém zpracování na škrob a je odrůdou polopozdní až pozdní s vysokou odolností vůči virovým chorobám, plísní bramboru na nati a plísněvé hnilobě (*Phytophthora infestans*) (Čermák 2012). Materiál byl vypěstován v roce 2012 na pokusném pozemku Zemědělské fakulty JU na stanovišti v Českých Budějovicích (380 m n. m.).

Hlízy byly rozkrájeny na tenké plátky, okamžitě zmrazeny, lyofilizovány a zhomogenizovány. Takto připravená bramborová mouka (125 g) byla rozpuštěna v 500 ml pufru (0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,5). Po 20 minutách hydratace byl vzorek centrifugován (4500 RPM, 30 minut, 4°C) a supernatant odstraněn. Pelet byl třikrát promyt 500 ml destilované vody a supernatant byl opět po centrifugaci (4500 RPM, 30 minut 4°C) odstraněn. Následně byl pelet extrahován ve 1250 ml 1,5M LiCl (Rymareva et al. 2003).

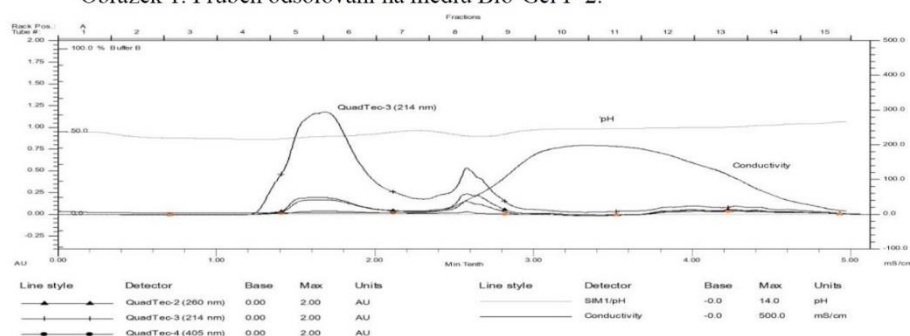
Získaný supernatant s rozpuštěnými extracelulárními proteiny byl centrifugován (4500 RPM, 10 minut, 4°C) a centrifugovaný supernatant byl dále filtrován přes papírový filtr (KA 4-M, Papírna Pernštejn Keseg&Rathouzský, ČR). Vzorek byl následně ještě jednou filtrován (filtr 0,22 µm, Fisherbrand, Thermo Fisher Scientific, USA) pro účely odsolování na FPLC. Odsolování (odstranění LiCl a dalších nízkomolekulárních látek) bylo provedeno na koloně Bio-Scale MT5 (BioRad, USA), jako náplň byl použit porézní polyakrylamidový gel s limitem zachytu částic o velikosti 0,1-1,8 kDa (Bio-Gel P-2 Gel, BioRad, USA) a jako ekvilibrační pufr byla použita voda (UV/UF ultra pure, 0,2 µm), průtok 1,5 ml/min. Pro odstranění případných zbytkových množství nízkomolekulárních látek byla u frakcí provedena dialýza (3,5K MWCO, SnakeSkin Dialysis Tubing, Thermo Fisher Scientific, USA) proti destilované vodě po dobu 24 hodin a vzorky byly následně zmrazeny a lyofilizovány na konstantní hmotnost.

Po centrifugaci (4500 RPM, 10 minut, 4°C) a sterilizaci vzorků (filtr 0,22 µm, Fisherbrand, Thermo Fisher Scientific, USA) byla pro detekci izolovaných proteinů provedena elektroforetická analýza na 16% gelu (SDS-PAGE) (Judd 2002), nanáška proteinu na gel 20 µl vzorku o koncentraci 10 mg/ml. K barvení gelů byl použit Plus Silver Staining Kit (BioRad, USA).

## Výsledky a diskuze

V první fázi izolačního procesu byly odmyty balastní proteiny, které se vyznačují rozpustností ve vodě, v následujících krocích byly pak chloridem lithným izolovány extracelulární proteiny. Průběh odsolování vzorků izolovaných extracelulárních proteinů je znázorněn na chromatogramu (obrázek 1). Vznikly dva píky (214 nm) a to ve frakcích 5-6 a 8-9, od 9. frakce pak začíná prudce stoupat konduktivita a dochází k uvolňování nízkomolekulárních látek, především LiCl.

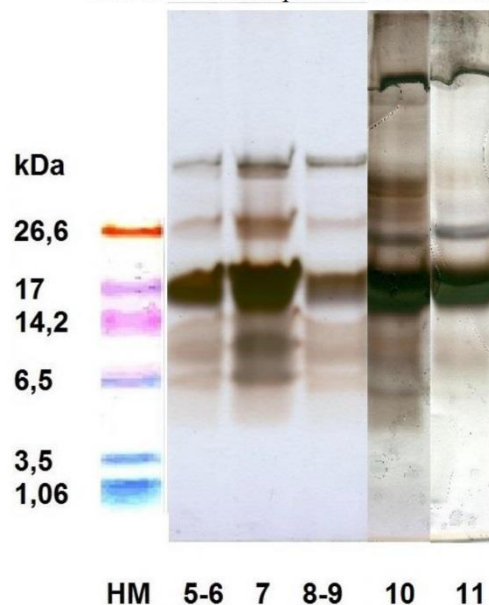
Obrázek 1. Průběh odsolování na médiu Bio-Gel P-2.



Získané frakce (5-6, 7 a 8-9) byly analyzovány pomocí SDS-PAGE na 16% polyakrylamidovém gelu (obrázek 2) a extracelulární proteiny byly detekovány jako výrazný pruh v oblasti od 14 do 17 kDa, což je shodné s výsledky izolace uvedenými v práci Rymareva a kol. (2003). Další proteiny byly detekovány v méně výrazných pruzích v oblastech kolem 6; 26 a 29 kDa shodně u všech tří analyzovaných frakcí, proteiny o této molekulové hmotnosti však v práci Rymareva a kol. (2003) uvedeny nejsou. Tyto tři vzniklé frakce byly spojeny (5-9) a byla provedena dialýza (kvůli odstranění případných zbytkových množství nízkomolekulárních látek) a lyofilizace do konstantní hmotnosti. Následně byl vzorek rozpouštěn v ultra čisté vodě (část extracelulárního proteinu byla nerozpustná) na koncentraci 10 mg/ml a byly detekovány proteiny pomocí SDS-PAGE na 16% gelu ve stejném rozmezí jako ve vzorku před dialýzou. Při porovnání proteinového spektra je patrné, že během dialýzy nedošlo k žádným detekovatelným ztrátám proteinů. Následně byl tento proteinový izolát centrifugován (4500 RPM, 10 minut, 4°C), došlo k vytvoření peletu, supernatant byl sterilizován mikrobiálním filtrem a rozpuštěné proteiny byly detekovány pomocí SDS-PAGE na 16% gelu od 14 do 17 kDa (majoritní pruh) a 26 kDa (méně výrazný pruh). Díky nedokonalé rozpustnosti části vzorku ve vodě tedy došlo po jejím odstranění centrifugací k detekovatelným změnám v proteinovém spektru a to ke ztrátě proteinů o molekulové hmotnosti 6-14 kDa a 29 kDa.

Vzhledem k tomu, že jsou extracelulárním proteinům často připisovány antimikrobiální vlastnosti, by bylo potřeba, aby byly vzorky plně rozpustné ve vodě, protože použití jiných chemických činidel pro zvýšení rozpustnosti proteinů při antimikrobiálním testování může narušit průběh pokusu například inhibicí růstu mycelia mikroskopických hub či množení bakterií.

Obrázek 2. Detekce proteinů na SDS-PAGE 16% gelu.



HM-hmotnostní marker, 5-6; 7; 8-9-frakce získané po odsolení na P-2 Bio-Gel, 10-frakce 5-9 po dialýze, 11-frakce 5-9 po dialýze a centrifugaci.

### **Závěr**

Většina prací se zabývá proteiny a peptidy hlíz bramboru, které jsou rozpustné ve vodě a jsou izolované z apoplastů jako součást hlízové šťávy. Cílem této práce byla izolace extracelulárních proteinů izolovaných z buněčných stěn hlíz bramboru, odstranění nízkomolekulárních látek a sledování změn v proteinovém spektru během procesu purifikace. Izolované proteiny byly detekovány na SDS-PAGE 16% peptidovém gelu ve dvou oblastech – výrazný pruh v oblasti 14-17 kDa a méně výrazný pruh kolem 26 kDa. Část izolovaných extracelulárních proteinů byla nerozpustná a po jejich odstranění došlo ke ztrátě dvou skupin proteinů o molekulové hmotnosti 6-14 kDa a 29 kDa.

Je žádoucí, aby byly během izolačních a purifikačních procesů extracelulárních proteinů minimalizovány změny v proteinovém spektru a to především minimalizace ztrát celých skupin proteinů. Bylo by ideální, pokud by byly izolované proteiny úplně rozpustné ve vodě a to jednak kvůli přesné detekci a identifikaci celého spektra proteinů a zároveň k ověření jejich antibakteriálních a antifungálních aktivit, které jsou s extracelulárními proteiny často spojovány.

### **Dedikace**

Výsledky byly získány v rámci řešení výzkumných projektů GAČR 522/09/1693, GAJU 065/2013/Z a GAJU 058/2013/Z.

### **Použitá literatura**

- Berrocal-Lobo M., Segura A., Moreno M., López G., García-Olmedo F., Molina A. (2002): Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. *Plant Physiology*, 128: 1-11.
- Čermák V. (2012): Seznam doporučených odrůd bramboru 2012. ÚKZUZ Brno, 104.
- de Souza Cândido E., Pinsto M. F. S., Pelegriny P. B., Lima T. B., Silava O. N., Pogun R., Grossi-de-Sá M. F., Franco O. L. (2011): Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanism. *The FASEB Journal*, 25: 3290-3305.
- Judd R. C. (2002): SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of peptides. Z Walker J. M. (ed.) *The Protein Protocols Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition. Humana Press Inc., Totowa New Jersey, 1146.
- Moreno M., Segura A., García-Olmedo F. (1994): Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. *European Journal of Biochemistry*, 223: 135-139.
- Rymareva E. V., Sukhareva O. N., Romanenko A. S., Salyaev R. K. (2003): Study of Antibacterial Activity of Potato Proteins. *Doklady Biological Sciences*, 390: 269-270.
- Segura A., Moreno M., Madueño F., Molina A., García-Olmedo F. (1999): Snakin-1, a Peptide from Potato That Is Active Against Plant Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12: 16-23.
- Taran S. A., Esikova T. Z., Mustaeva L. G., Baru M. B., Alakhov Yu. B. (2002): Synthesis and Antibacterial Activity of Analogues of the N-Terminal Fragment of the Sarcotoxin IA Antimicrobial Peptide. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 5: 357–362.

### **Kontaktní adresa**

Ing. Andrea Kamenová  
Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Oddělení pěstování rostlin  
Zemědělská fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice  
email: Andrea.Kamenova@seznam.cz

#### **4.1.5. The assessment of thermostable proteins gained from different potato tuber cultivars (*Solanum tuberosum* L.) and their influence on growth inhibition of selected phytopathogenic fungi**

Hlavní skupinou termostabilních hlízových proteinů je skupina inhibitorů proteas, které hrají důležitou roli v obraně rostlin proti predátorům a parazitům díky antimikrobiálním vlastnostem. Tato práce je zaměřena na porovnání rozdílů v proteinovém spektru a antifungálních vlastností jedné konzumní odrůdy (Marabel) a dvou průmyslových odrůd (David a Westamyl). Z těchto odrůd byly izolovány proteiny ve dvou variantách - úprava pH a úprava pH v kombinaci s vystavením hlízové šťávy teplotě 80°C po dobu 10 minut. Takto izolované a směsi proteinů byly následně použity v antifungálních testech na fytopatogenních kmenech hub *Alternaria solani*, *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani* formou měření ploch inhibičních zón u jednotlivých variant všech testovaných odrůd.

Kompletní informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty v publikaci:

**Kamenová A.**, Bártová V., Bárta J. (2013): The assessment of thermostable proteins gained from different potato tuber cultivars (*Solanum tuberosum* L.) and their influence on growth inhibition of selected phytopathogenic fungi. In: Součková H. (Ed.) Potato Agrophysiology 2013, VÚBHB, 24-29.

## The assessment of thermostable proteins gained from different potato tuber cultivars (*Solanum tuberosum* L.) and their influence on growth inhibition of selected phytopathogenic fungi

Kamenová A., Bártová V., Bárta J.

University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Agriculture

### Abstract

The contribution deals with the assessments of antifungal potential of thermostable proteins from three potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) David, Marabel and Westamyl differ in the market and maturity and comparison of two potato fruit juice alternatives differing in processing temperature. Combination of pH adjustment and high temperature (80°C) or pH adjustment only was used for protein isolation. Isolated proteins were detected by peptide SDS-PAGE in range from 6 to 14 kDa and in ranges 14 and 17 kDa in the sample of the thermally untreated potato fruit juice. Three different concentrations of protein samples were applied to three different varieties of phytopathogenic fungi *Alternaria solani*, *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani*. The inhibition of mycelial growth was evaluated after 24 hours of growth at 26°C on digital photos by special software using the method of measuring the inhibition area. The greatest inhibition area (108.9 mm<sup>2</sup>) was achieved on *F. solani* cultivar David at concentration 10 mg/ml (inhibition area of Marabel 86.1 mm<sup>2</sup> and Westamyl 103.3 mm<sup>2</sup>). No antifungal effect was achieved at cultivars Marabel and Westamyl at concentration 1 mg/ml at the phytopathogenic fungi *A. solani* (inhibition area of David was 5.9 mm<sup>2</sup>). The phytopathogenic fungi *F. solani* and *R. solani* were more sensitive to thermostable proteins in general and inhibition effect of thermally untreated substance was not registered.

**Key words:** potato fruit juice, *Solanum tuberosum* L., antifungal activity, thermostable proteins, cultivar variability

### Introduction

The major thermostable potato tuber proteins are groups of protease inhibitors (PIs), which are variable protein groups well established to play a role in defence against predators and pathogens. The molecular weight of PIs is in range from 3 to 25 kDa and they are very important part of tuber proteins which constitute approximately 50 % of all proteins in potato fruit juice (POUVREAU 2004). Antimicrobial activity of potato tuber proteins was studied on one potato cultivar-Gogu in KIM et al. 2005 and Golden Valley in KIM et al. 2006; cultivar Istrinskii in SPERANSKAYA et al. 2006, cultivar Gogu Valley in JIN et al. 2009 and OHH et al. 2009) or on industrial potato fruit juice (PFJ), which is cultivar mixture of the *Solanum tuberosum* L., produced as a secondary product during the process of starch production (KAMENOVÁ et al. 2011; BÁRTA et al. 2012) and reciprocal comparison of cultivars Fabia and Laura was published in study KAMENOVÁ et al. (2012).

Antimicrobial properties were described at some phytopathogenic fungi strains-KIM et al. (2005) studied antimicrobial activity of potato inhibitor I (PI-1) against phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani*, MEDIETA et al. (2006) and SELITERNNIKOFF (2001) described positive antifungal effect of potato tuber proteins against *Fusarium solani*, SPERANSKAYA et al. (2006) verified the influence of potato tuber Kunitz-type protease inhibitors (PKPIs) on growth and development of phytopathogenic fungi *Fusarium culmorum*.

The aim of this contribution was the reciprocal comparison of thermostable proteins gained from different potato tuber cultivars David, Marabel and Westamyl (*Solanum tuberosum* L.) and the assessment of their influence on growth inhibition of selected phytopathogenic fungi.

### Materials and Methods

Three cultivars of *Solanum tuberosum* L. (David, Marabel and Westamyl) were used as a plant protein source for the potato fruit juice (PFJ). All the potato cultivars were grown under strictly defined conditions in 2011 in the small plot experiment at the experimental station in České Budějovice (380 m asl.). David is mid-early cultivar used for starch production, Marabel is early cultivar used for consumption purposes and Westamyl is mid-late to late cultivar used for starch production.

The PFJs were prepared from each cultivar potato tubers on kitchen juicer. PFJs were centrifuged (4500 rpm, 30 minutes) and filtrated to remove starch, fiber and other water insoluble components. The pH of PFJs was adjusted to 5 and the PFJs were divided into two variants-PFJ with pH adjustment only (Variant 0) and Variant 80-PFJ with pH adjustment and high temperature treatment (80°C) which was achieved by tempering in the water bath for 10 minutes (Figure 1).

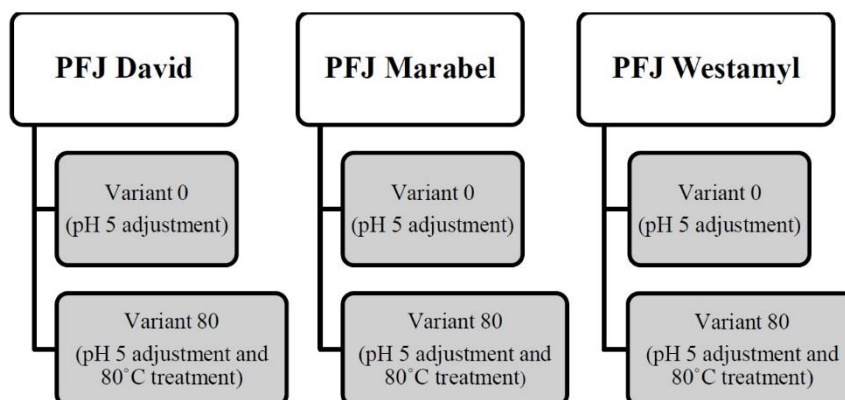


Figure 1. Schema of PFJs variant preparations.

Coagulated thermo labile proteins were removed by centrifugation (4500 rpm, 30 minutes) and filtration and the supernatant was dialyzed (3.5 K MWCO, Pierce SnakeSkin Dialysis Tubing, Thermo Fisher Scientific, USA) and concentrated by lyophilisation. Obtained protein mixture was dissolved in ultra pure water in concentrations 1 mg/ml, 5 mg/ml and 10 mg/ml, the substances were sterilized by bacterial filter units (0.22 µm, Fisherbrand, Thermo Fisher Scientific, USA) and used in volume of 30 µl into each hole in agar. The holes in agar were placed exactly 1 mm from the growing mycelium. Sterile ultra pure water was used as a control in each test on Petri dish. Variant 0 and Variant 80 were tested on phytopathogenic fungi strains *Alternaria solani* F-167, *Fusarium solani* 1036 and *Rhizoctonia solani* F-1 and their influence on phytopathogenic fungi grown was observed. Tested fungi strains were acquired from Czech Collection of Microorganisms in Brno. Antifungal activity was evaluated after 24 hours of growth at 26°C (HUNTH et al. 1996). The inhibition of mycelial growth was evaluated on digital photos in special software using the method of measuring the inhibition area. Isolated proteins were analysed by Tris-Tricine peptide SDS-PAGE (16% gels) and detected on gel by Coomassie Brilliant Blue solution (JUDD 2002).

### Results and Discussion

Proteins in Variant 0 were detected mainly in ranges of 14 kDa and 17 kDa on peptide gel (Figure 2). Antifungal activity of proteins isolated from cultivar PFJs was tested on three phytopathogenic fungi strains. No above-mentioned strain was inhibited by Variant 0 (thermally untreated PFJ) after 24 hours of mycelial growth after substance application (Figures 3, 5, 7).

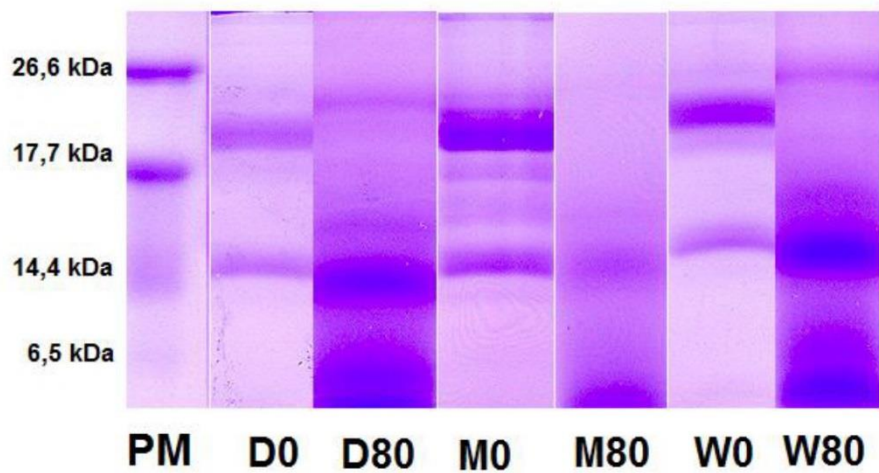


Figure 2. Protein detection on SDS-PAGE (PM-Protein Marker)



Figure 3. Variant 0, cultivar David, concentrations 1, 5, 10 mg/ml and 0 marking the control, *Fusarium solani*



Figure 4. Variant 80 application, cultivar David, concentrations 1, 5, 10 mg/ml and 0 marking the control, *Fusarium solani*



Figure 5. Variant 0 application, cultivar Marabel, concentrations 1, 5, 10 mg/ml and 0 marking the control, *Fusarium solani*

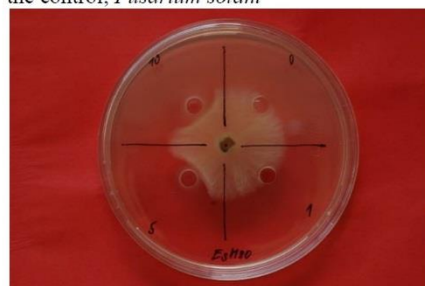


Figure 6. Variant 80 application, cultivar Marabel, concentrations 1, 5, 10 mg/ml and 0 marking the control, *Fusarium solani*



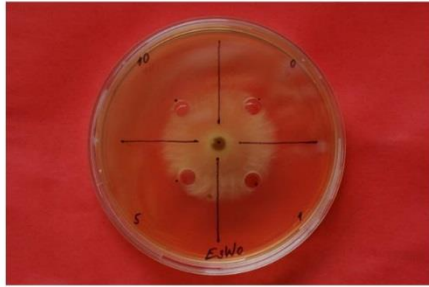


Figure 7. Variant 0 application, cultivar Westamyl, concentrations 1, 5, 10 mg/ml and 0 marking the control, *Fusarium solani*

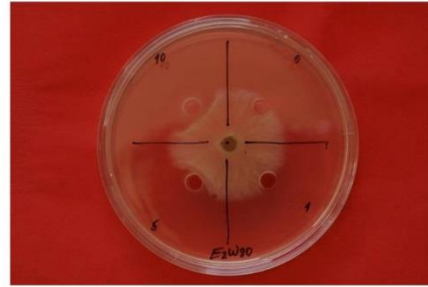


Figure 8. Variant 80 application, cultivar Westamyl, concentrations 1, 5, 10 mg/ml and 0 marking the control, *Fusarium solani*

Thermostable proteins in Variant 80 were detected in ranges of 6 kDa and 14 kDa on SDS-PAGE 16% peptide gel (Figure 2). According to the MS/MS analysis they are protease inhibitors I and II. KIM et al. (2005) described thermostable peptides named Potide G with molecular weight 5.6 kDa. Antifungal activity was tested on three above-mentioned fungi strains. Inhibition of mycelial growth was registered on all fungi strains, concentrations and varieties after 24 hours of cultivation (Figures 4, 6, 8).

Digital photos of antifungal tests were evaluated in sensitive software. Inhibition area sizes of all repetitions were measured and the average values of these measurements are shown in Table 1. The greatest inhibition area (108.9 mm<sup>2</sup>) was achieved on *F. solani* cultivar David at concentration 10 mg/ml (inhibition area of Marabel 86.1 mm<sup>2</sup> and Westamyl 103.3 mm<sup>2</sup>). No antifungal effect was achieved at cultivars Marabel and Westamyl at concentration 1 mg/ml at the phytopathogenic fungi *A. solani* (inhibition area of David was 5.86 mm<sup>2</sup>). The phytopathogenic fungi *F. solani* and *R. solani* were more sensitive to the thermostable proteins in general.

Cultivar <i>Solanum</i> <i>tuberosum</i> L.	Substances concentrations [mg/ml]	<i>Alternaria solani</i> F-167	<i>Fusarium solani</i> 1036	<i>Rhizoctonia solani</i> F-1
		Inhibition area [mm <sup>2</sup> ]		
David	1	5.9 a	17.1 abcd	6.7 abc
Marabel	1	*	9.0 abc	3.5 a
Westamyl	1	*	4.7 ab	6.9 abc
David	5	8.3 abc	65.8 efg	40.0 cde
Marabel	5	3.9 a	69.1 efg	39.1 bcde
Westamyl	5	3.6 a	44.8 def	25.7 abcd
David	10	16.9 abcd	108.9 g	82.3 gh
Marabel	10	11.3 abc	86.1 gh	65.3 efg
Westamyl	10	8.5 abc	103.3 g	76.9 fgh

Table 1. The average inhibition areas after the evaluation, Variant 80.

(Within column values followed by the same letter are not significantly different at P<0.05 (Tukey HSD test), the letters given in alphabetical order with increasing level of a parameter.) \*Not detected activity.

The results show that the great protein spectrum of thermally untreated PFJ (Variant 0) has no detectable inhibitory effect in tested concentrations. The thermocoagulation caused changes in protein composition of the Variant 80 samples and marked inhibitory properties were detected during testing thermostable protein fractions (Variant 80) of varieties David, Marabel and Westamyl. The thermo coagulation and subsequent centrifugation preconcentrated thermostable proteins which, despite to the temperature of 80°C exposure, maintained their antifungal activity. The greatest mycelium growth inhibition was achieved at concentration 10 mg/ml on *Fusarium solani*. The phytopathogenic fungi *F. solani* and *R. solani* were more sensitive to the thermostable proteins in general.

## Conclusion

The contribution deals with the cultivar assessments of thermally untreated and thermally treated (80°C, 10 minutes) proteins gained from three cultivars David, Marabel and Westamyl (*Solanum tuberosum* L.) and their influence on growth inhibition of selected phytopathogenic fungi. Isolated thermostable proteins (Variant 80) were analysed on Tris-Tricine SDS-PAGE peptide gel and detected mainly in ranges of 6 and 14 kDa and in the sample of the thermally untreated PFJ (Variant 0) in ranges about 14 and 17 kDa.

Proteins antifungal activity was demonstrated on phytopathogenic fungi strains *Alternaria solani*, *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* and inhibition of mycelial growth after the test substance application at concentrations 1 mg/ml, 5 mg/ml and 10 mg / ml was achieved after 24 hours of cultivation at 26°C. The greatest inhibition area (108.9 mm<sup>2</sup>) was achieved on *F. solani* cultivar David at concentration 10 mg/ml and the phytopathogenic fungi *F. solani* and *R. solani* were more sensitive to the thermostable proteins in general.

The results show that thermostable proteins with the antifungal properties are obtained after the thermal treatment and subsequent preconcentration of proteins with these properties and there are significant differences in potato varieties directly proportional with the increasing amounts of the active substance in the test samples. These conclusions indicate that the focus on the research and subsequent biotechnological applications of specific potato varieties rich on large amounts of thermostable protease inhibitors with antimicrobial properties should be implemented in the future.

## Acknowledgements

Supported by projects GAJU 030/2012/Z and GAČR 522/09/1693.

## References

- BÁRTA, J., BÁRTOVÁ V., KAMENOVÁ A., ZDRÁHAL Z., BRABCOVÁ A., ČURN V. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta. Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností. Česká republika. Užité vzor, CZ 23983 U1. Zapsáno 18. 6. 2012. <http://spisy.upv.cz/UtilityModels/FullDocuments/FDUM0023/uv023983.pdf> [online 21. 8. 2012]
- HUYNTH Q. K., BORGMAYER J. R., SMITH C. E., BELL L. D., SHAH D. M (1996): Isolation and characterization of a 30 kDa protein with antifungal activity from leaves of *Engelmannia pinnatifida*. *Biochemical Journal*, 316: 723-727.
- JIN Z., SHINDE P. L., YANG Y. X., CHOI J. Y., YOON S. Y., HAHN T.-W., LIM H. T., PARK Y. K., HAHM K. S., JOO J. W., CHAE P. J. (2009): Use of refined potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as an alternative to antibiotics in weanling pigs. *Livestock Science*, 124: 26-32.
- JUDD R. C. (2002) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of peptides. From. WALKER J. M. (ed.) *The Protein Protocols Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition. Humana Press Inc., Totowa New Jersey, 1146p.
- KAMENOVÁ A., BÁRTOVÁ V., BÁRTA J. (2011): Antifungální potenciál nízkomolekulárních proteinů a peptidů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). *Úroda*, 12: 213-216.
- KAMENOVÁ A., BÁRTA J., BÁRTOVÁ V. (2012): Hodnocení vlivu odrůdových rozdílů termostabilních proteinů hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) na inhibici růstu vybraných druhů fytopatogenních hub. *Úroda* 12, 2012, vědecká příloha, s. 61-66.
- KIM J.-Y., PARK S.-C., KIM M.-H., LIM H.-T., PARK Y., HAHM K.-S. (2005): Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330: 921-927.
- KIM M.-H., PARK S.-C., KIM J.-Y., LEE S. Y., LIM H.-T., CHEONG H., HAHM K.-S., PARK Y. (2006): Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato cultivar "Golden Valley". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346: 681-686.

MENDIETA J. R., PAGANO M. R., MUÑOZ F. F., DALEO G. R., GUEVARA M. G. (2006): Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (*StAPs*) involves membrane permeabilization. *Microbiology*, 1052: 2039-2047.

OHH S. H., SHINDE P. L., JIN Z., CHOI J. Y., HAHN T.-W., LIM H. T., KIM G. Y., PARK Y., HAHM K.-S., CHAE B. J. (2009): Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as an antimicrobial agent in the diets of broilers. *Poultry Science*, 88: 1227-1234.

POUVREAU L. (2004): Occurrence and physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tuber (*Solanum tuberosum*). Ph.D. thesis, Wageningen University, The Netherlands, 157.

SELITRENNIKOFF C. P. (2001): Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 288-2894.

SPERANSKAYA A. S., KRINITSINA A. A., REVINA T. A., GERASIMOVA N. G., KERUCHENKO Y. A. S., SHEVELEV A. B., VALUEVA T. A. (2006): Heterologous expression, purification, and properties of a potato protein inhibitor of serine proteinases. *Biochemistry (Moscow)*, 11: 1176-1182.

### Contact

Ing. Andrea Kamenová  
Department of Plant Production and Agro-ecology  
Faculty of Agriculture  
University of South Bohemia in České Budějovice  
Studentská 13  
370 05 České Budějovice  
Email: Andrea.Kamenova@seznam.cz

#### 4.1.6. Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*

Publikace shrnuje aktuální poznatky v oblastech klasifikace a charakteristiky bílkovin hlíz brambor, genotypový potenciál obsahu a kvality těchto bílkovin v hlízách brambor, možnostmi ovlivnění jejich kvality a obsahu pěstivelskou technologií, podmínkami prostředí a skladováním, metodami izolace hlízových bílkovin při zpracování brambor na škrob a potenciálu těchto izolovaných bílkovin pro krmné, potravinářské, medicínské a další využití.

Kompletní informace jsou uvedeny v publikaci:

Bárta J., Bártová V., Brabcová A., Diviš J., Horáčková V., **Kamenová A.**, Zdráhal Z. (2015): Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*, Kurent České Budějovice.

#### **Kapitola 3.2.8. Charakteristika a aktivity frakce hlízových inhibitorů proteas hodnocených druhů brambor**

Výběr metody separace je zásadním procesem pro všechny následující analýzy frakcí hlízových inhibitorů proteas. Kapitola se zabývá shrnutím a popisem použitých vhodných separačních metod těchto skupin bílkovin na základě jejich charakteristik, jako je molekulová hmotnost, výskyt isoforem hlízových inhibitorů proteas s různým rozpětím isoelektrického bodu a další účel použití izolovaných skupin či jednotlivých inhibitorů proteas. První jmenovanou metodou je dvoustupňová chromatografická separace patatinu a inhibitorů proteas, jako druhá metoda je uvedena separace globulinové a albuminové frakce z lyofilizované sušiny hlíz brambor. Frakce inhibitorů proteas získaných dle druhé jmenované metody z druhů *Solanum tuberosum* cv. Westamyl, *Solanum chacoense*, *Solanum sparsipilum* a *Solanum yungasense* byly následně použity pro testování antifungálních aktivit metodou schopnosti inhibice plošného růstu mycelia fytopatogenních hub rodů *Fusarium solani* 1036 a *Rhizoctonia solani* F1. Tyto druhy vykazovaly při vzájemném porovnání výsledků genotypovou specifitu. Byl zaznamenán největší inhibiční efekt (koncentrace frakcí 5 mg/ml) u frakcí získaných ze *S. sparsipilum* na *F. solani* (95,7 mm<sup>2</sup>) a *R. solani* (91,7 mm<sup>2</sup>). Naopak žádné inhibiční zóny nebyly pozorovány při aplikaci bílkovinných frakcí ze *S. tuberosum* cv. Westamyl a *S. chacoense* (koncentrace 1 mg/ml a 5 mg/ml) na *R. solani*. Bílkovinné frakce získané ze *S. tuberosum* cv. Westamyl a *S. chacoense* v testu celkově vykazovaly nejmenší vliv na růst mycelia výše zmíněných mikroskopických hub.

# Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*



Jan Bárta a kolektiv

2015

---

# Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*

**Autorský kolektiv:** doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.  
*ZF JU v Českých Budějovicích*  
Ing. Veronika Bártová, Ph.D.  
*ZF JU v Českých Budějovicích*  
Ing. Adéla Brabcová  
*ZF JU v Českých Budějovicích*  
doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.  
*ZF JU v Českých Budějovicích*  
Ing. Vendulka Horáčková, CSc.  
*VÚB Havlíčkův Brod, s.r.o.*  
Ing. Andrea Kamenová  
*ZF JU v Českých Budějovicích*  
doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.  
*CEITEC MU Brno*

**Lektoři:** prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.  
*AF Mendelu v Brně*  
Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.  
*VÚRV, v.v.i., Praha*

**Fotografie:** Jan Bárta, Adéla Brabcová,  
Vendulka Horáčková, Andrea Kamenová

Publikace neprošla jazykovou úpravou  
Vydáno v nakladatelství KURENT České Budějovice  
Vrbenská 197/23, 370 01 České Budějovice  
tel.: +420 387 202 310  
vydavatelství@kurent.cz, www.kurent.cz

Vydání první, 2015  
Náklad: 200 ks  
ISBN: 978-80-87111-42-0

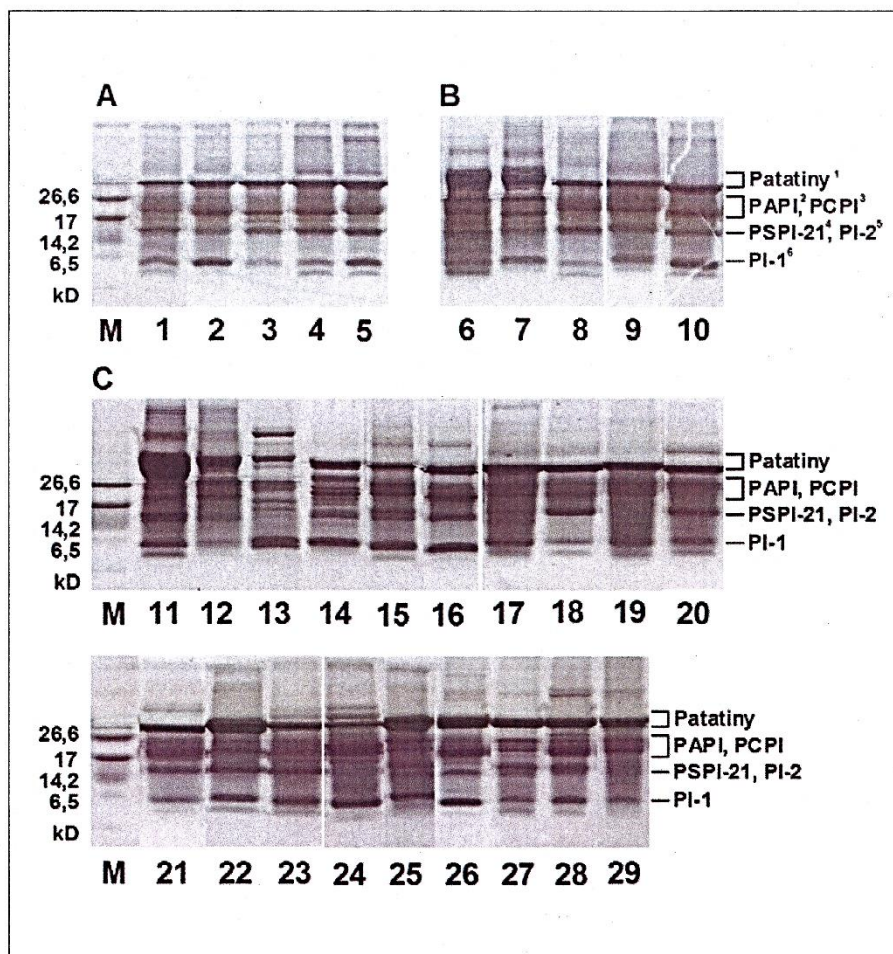
### 3.2.8. Charakteristika a aktivity frakce hlízových inhibitorů proteas hodnocených druhů brambor

V kapitole 3.2.5. bylo uvedeno, že relativní zastoupení frakce inhibitorů proteas v celkovém obsahu bílkovin hlíz dosahuje v rámci studovaného souboru druhů značnou variabilitu. Podle dostupných informací (Pouvreau, 2004) jsou ve velmi heterogenní frakci hlízových inhibitorů proteas zastoupeny proteiny vykazující inhibiční aktivitu vůči většině významných skupin proteas - inhibitory serinových proteas (např. trypsin, chymotrypsin), cysteinových proteas (např. papain), aspartátových proteas (např. kathepsin D, pepsin), metalloproteas (např. karboxypeptidasa A) a dalších proteolytických enzymů. Obrázek 9 tuto obecnou informaci potvrzuje i u druhově rozdílných genotypů analyzovaných v našich experimentech. Na profilech všech tří skupin genotypů - odrůdy druhu *S. tuberosum* (A), genotypy druhů pěstitelsky využívaných v oblastech původního výskytu (B), genotypy planých druhů (C) - byly, kromě patatinových proteinů (v oblasti 39–44 kDa), potvrzeny pomocí hmotnostní spektrometrie tři zóny proteinových pruhů obsahujících převážně inhibitory proteas. První zónu představují proteiny s molekulovou hmotností kolem 20–22 kDa, které byly převážně identifikovány jako bramborové inhibitory aspartátových proteas (PAPI) a bramborové inhibitory cysteinových proteas (PCPI). Druhou zónu představují proteiny v intervalu molekulové hmotnosti 10–15 kDa, převážně reprezentované bramborovým inhibitorem serinových proteas (PSPI-21) a bramborovým inhibitorem 2 (PI-2). Třetí zónu proteinových pruhů představují polypeptidy s molekulovou hmotností v rozmezí 5–8 kDa a zde byl identifikován zejména bramborový inhibitor 1 (PI-1), který je v nativním stavu

považován za pentamer skládající se z pěti polypeptidových podjednotek o molekulové hmotnosti kolem 8 kDa (Pouvreau, 2004).

Klíčovým bodem při všech analýzách frakce hlízových inhibitorů proteas je volba způsobu separace jednotlivých dílčích inhibitorů či jejich skupin. Problém přináší zejména soustředění hodnot molekulové hmotnosti do úzkého rozpětí kolem 10–20 kDa, čímž je omezena účinnost gelové permeační chromatografie při separaci a pak vytváření značného množství isoform s rozsáhlým rozpětím isoelektrických bodů, která se projevuje jak při některých elektroforetických separacích (IEF, 2D-PAGE), tak i při separaci pomocí iontovýmenné chromatografie. Záleží na vlastním účelu separace - zda jde „jen“ o izolaci jednoho konkrétního proteinu z extraktu nebo o případ, kdy má být z extraktu izolováno více proteinů včetně jejich isoform. To je pak obecně velmi obtížný úkol komplikovaný výraznou heterogenitou inhibitorové směsi. Jak je rozvedeno v samostatné kapitole této knihy (kapitola 5.4.), vypracováno bylo několik způsobů separace této poměrně složité skupiny proteinů.

V našich experimentech jsme pro získání frakcí inhibitorů proteas použili dva přístupy. První z nich využívá dvoustupňovou chromatografickou izolaci patatinu, kdy v prvním stupni jsou pomocí měniče aniontů zachyceny proteiny s pI v kyselé oblasti (hlavně patatiny a menší část inhibitorů), zatímco proteiny s hodnotami pI v neutrální a bazické oblasti zůstanou v nezachycené frakci (majoritní část frakce inhibitorů proteas, tzv. B frakce). Ve druhém stupni chromatografické separace je pak patatin oddělen



<sup>1</sup>Patatins, <sup>2</sup>PAPI - potato aspartate protease inhibitor, <sup>3</sup>PCPI - potato cysteine protease inhibitor, <sup>4</sup>PSPI-21 - potato serine protease inhibitor 21 kD, <sup>5</sup>PI-2 - potato inhibitor 2, <sup>6</sup>PI-1 - potato inhibitor 1  
 Legenda/Caption: M - hmotnostní standard v kilodaltech (kD)/molecular weight standard in kilodaltons (kD); Odrůdy druhu *Solanum tuberosum*/Cultivars of *Solanum tuberosum* species (A): 1 - Desirée, 2 - Kuras, 3 - Russet Burbank, 4 - Superior, 5 - Westamyl; Genotypy druhů pěstitelsky využívaných v oblastech původního výskytu/Genotypes of potato species cultivated in region of origin (B): 6 - *S. andigenum* 07S0300066, 7 - *S. andigenum* 07S0300235, 8 - *S. goniocalyx*, 9 - *S. phureja*, 10 - *S. stenotomum*; Genotypy planých druhů/Genotypes of wild species (C): 11 - *S. acaule*, 12 - *S. chacoense*, 13 - *S. bulbocastanum*, 14 - *S. berthaultii*, 15 - *S. guerreroense*, 16 - *S. fendleri*, 17 - *S. leptophyes*, 18 - *S. microdontum*, 19 - *S. mochiquense*, 20 - *S. polyadenium*, 21 - *S. polytrichon*, 22 - *S. sucrense*, 23 - *S. stoloniferum*, 24 - *S. pinnatisectum*, 25 - *S. sparsipilum*, 26 - *S. vernei*, 27 - *S. verrucosum*, 28 - *S. incamaoyense*, 29 - *S. yungasense*

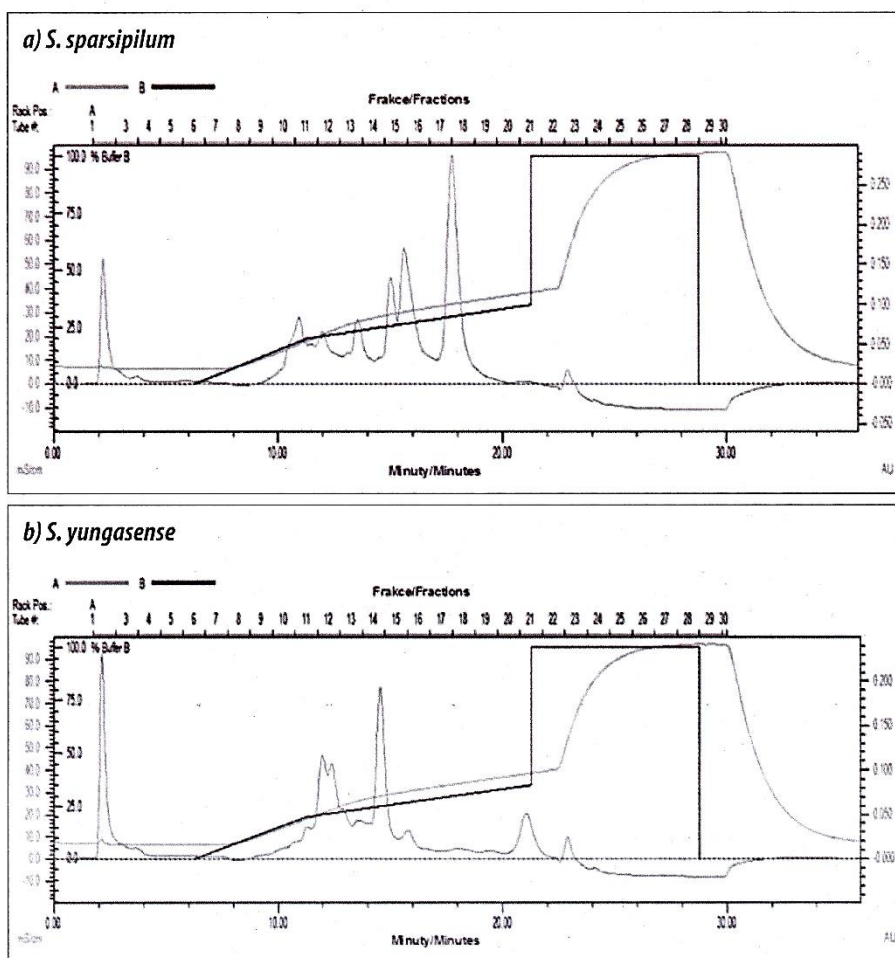
Obrázek 9: Elektroforetické proteinové profily hlíz u hodnoceného souboru genotypů brambor po analýze pomocí SDS-PAGE (16% separační gel) a detekci prostřednictvím roztoku Coomassie Brilliant Blue.

Figure 9: Electrophoretic profiles of tuber proteins in evaluated set of potato genotypes after analysis by SDS-PAGE (16 % separating gel) and detection using solution of Coomassie Brilliant Blue.



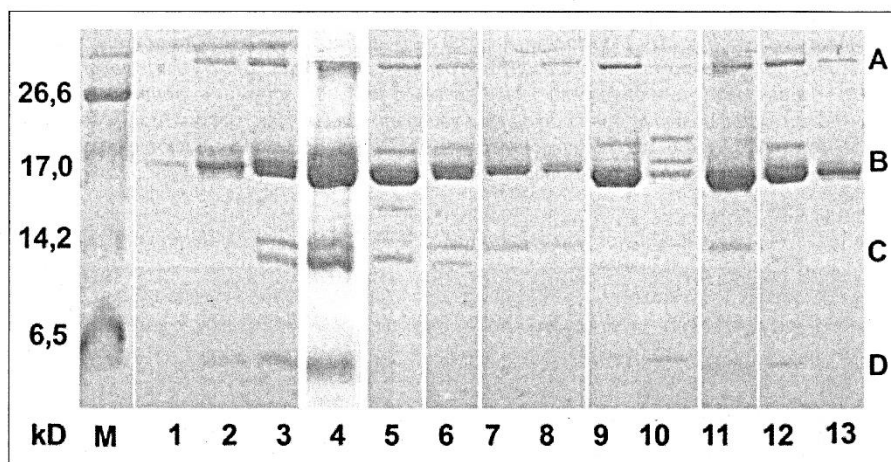
od minoritní frakce inhibitorů proteas pomocí afinitního media s lektinovým ligandem Konkanavalinem A. Obě frakce inhibitorů proteas pak mohou být dále separovány pomocí dalších chromatografických principů, např. „propad“ pod měničem aniontů (frakce s neutrálními a bazickými inhibitory proteas) je poměrně úspěšně separován na koloně s měničem kati-

ontů (viz obr. 18). Druhý námi použitý přístup je uplatnitelný zejména pro separaci „globulinové frakce“ hlízových proteinů z lyofilizované sušiny hlíz, která obsahuje hlavně inhibitory proteas. Z lyofilizované mouky je nejprve pomocí vody odmyta „albuminová frakce“ a ostatní ve vodě rozpustné látky, následně je pak „globulinová frakce“ vyextrahována pomocí slabého roztoku



Obrázek 10: Ukázka separace globulinové frakce (s převahou inhibitorů proteas) pomocí FPLC na koloně Uno S6 (Bio-Rad, USA).

Figure 10: A sample of separation of globulin fraction (with dominance protease inhibitors) using FPLC on the column Uno S6 (Bio-Rad, USA).



Legenda/Legend: M - hmotnostní standard v kilodaltech (kD)/molecular weight standard in kilodaltons (kD); A - patatiny/patatins; B - převaha PAPI a PCPI/preponderance of PAPI and PCPI; C - převaha PSPI-21 a PI-2/preponderance of PSPI-21 and PI-2; převaha PI-1/preponderance of PI-1  
 1 - *S. tuberosum* Desirée, 2 - *S. tuberosum* Kuras, 3 - *S. tuberosum* Westamyl, 4 - *S. tuberosum* Sibü, 5 - *S. andigena* 07S0300235, 6 - *S. goniocalyx*, 7 - *S. phureja*, 8 - *S. stenotomum*, 9 - *S. chacoense*, 10 - *S. bulbocastanum*, 11 - *S. microdontum*, 12 - *S. sparsipilum*, 13 - *S. yungasense*

Obrázek 11: Elektroforetické profily (SDS-PAGE) globulinových proteinů s převahou inhibitorů serinových proteas, které byly izolovány s využitím 5% roztoku síranu draselného u vybrané skupiny druhů brambor.  
 Figure 11: Electrophoretic profiles (SDS-PAGE) of globulin proteins with dominance of serine protease inhibitors that were isolated using 5% potassium sulfate solution.

soli - 5% roztoku síranu draselného. Po odsolení a zakoncentrování byla tato frakce následně podrobena elektroforetické separaci, která dokumentuje převážný výskyt inhibitorů proteas (obrázek 11). Globulinová frakce může být rovněž podrobena detailní chromatografické separaci pomocí FPLC, např. stejně jako výše zmiňovaná B frakce (z izolačního postupu patatinu) na koloně Uno S6 (obrázek 10).

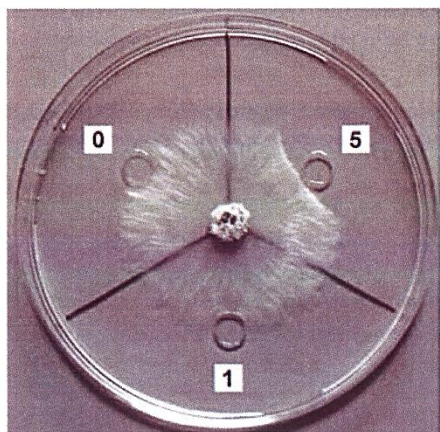
Jak již bylo uvedeno výše, inhibitory proteas z bramborových hlíz vykazují inhibiční aktivity proti řadě významných proteas a tyto aktivity jsou patrně hlavním nositelem jejich antifungální aktivity. V testech provedených na pracovišti JU byla výše popisovaná „globulinová“ frakce testována na schopnost in-

hibovat plošný růst mycelia fytopatogenních hub *Fusarium solani* (kmen 1036) a *Rhizoctonia solani* (kmen F1). Testováno bylo celkem 13 druhových vzorků globulinové frakce (viz seznam u obrázku 11) ve dvou koncentracích 1 a 5 mg/ml. U *F. solani* byla nalezena inhibice plošného růstu frakcemi získanými z genotypů *S. tuberosum* cv. Westamyl, *S. chacoense*, *S. sparsipilum* a *S. yungasense*, růst mycelia *R. solani* byl inhibován frakcemi získanými z hlíz *S. sparsipilum* a *S. yungasense*.

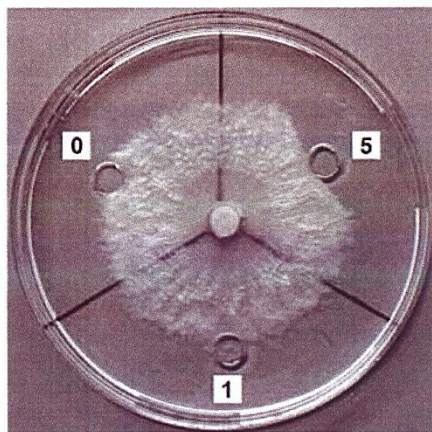
Z dosažených výsledků je zřejmé, že efekt inhibice růstu mycelia u dvou modelových fytopatogenních hub (*F. solani*, *R. solani*) pomocí izolátů globulinových bílkovin hlíz je genotypově specifický. Jak dokumentuje obrázek 12

a shrnují výsledky uvedené v tabulce 19, nejvýraznější efekt měl bílkovinný izolát získaný z hlíz druhu *S. sparsipilum*, který účinkoval přesvědčivě na oba druhy testovaných hub. Podobně účinkoval také izolát získaný z hlíz

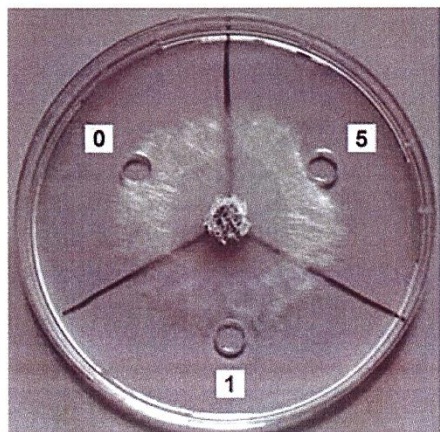
*S. yungasense*, ale s nižší účinností na růst mycelia *R. solani*. U ostatních izolátů s pozitivním působením (*S. tuberosum* cv. Westamyl a *S. chacoense*), byla zaznamenána účinnost již jen na růst mycelia *F. solani*.



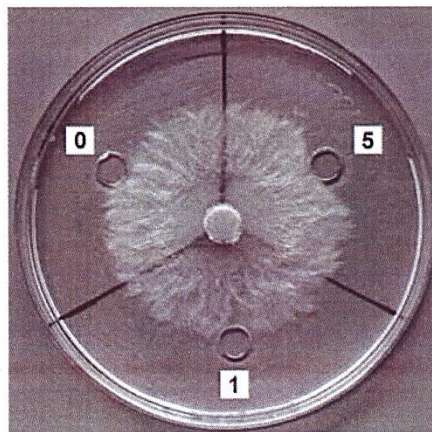
*S. sparsipilum* vs. *F. solani*, kmen<sup>1</sup> 1036



*S. sparsipilum* vs. *R. solani*, kmen<sup>1</sup> F1



*S. yungasense* vs. *F. solani*, kmen<sup>1</sup> 1036  
<sup>1</sup>strain



*S. yungasense* vs. *R. solani*, kmen<sup>1</sup> F1

Obrázek 12: Ukázka inhibice plošného růstu mycelia fytopatogenních hub (*Fusarium solani*, kmen 1036 a *Rhizoctonia solani*, kmen F1) globulinovou frakcí izolovanou z hlíz druhů *S. sparsipilum* a *S. yungasense* při koncentraci 0, 1 a 5 mg ml<sup>-1</sup> (do jamek v mediu nanášeno 30 µl globulinové frakce).  
Figure 12: Demonstration of myceliar growth of phytopathogenic fungi (*Fusarium solani*, strain 1036 a *Rhizoctonia solani*, strain F1) by globulin fraction isolated from tubers of *S. sparsipilum* and *S. yungasense* species in concentration variants 0, 1 and 5 mg ml<sup>-1</sup> (into medium holes applied 30 µl of globulin fraction).

**Tabulka 19: Velikost inhibiční zóny (v mm<sup>2</sup>) u fytopatogenních hub *Fusarium solani* (kmen 1036) a *Rhizoctonia solani* (kmen F1) „globulinovou“ frakcí izolovanou z hlíz vybraných druhů brambor.**  
**Table 19: Area of inhibition zone (mm<sup>2</sup>) in phytopathogenic fungi *Fusarium solani* (strain 1036) a *Rhizoctonia solani* (strain F1) caused by „globulin“ fraction isolated from tubers selected potato species.**

Koncentrace frakce <sup>1</sup> (mg ml <sup>-1</sup> )	F. solani kmen <sup>2</sup> 1036		R. Solani kmen <sup>2</sup> F1	
	1	5	1	5
<i>S. tuberosum</i> cv. Westamyl	9,4 de	45,6 c	0 e	0 e
<i>S. chacoense</i>	0 e	44,6 c	0 e	0 e
<i>S. sparsipilum</i>	0 e	95,7 a	11,3 d	91,7 a
<i>S. yungasense</i>	13,6 d	80,3 b	0 e	52,1 c

<sup>1</sup>fraction concentration, <sup>2</sup>strain

Rozdílná malá písmena indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti  $P < 0,05$  (Fisherův LSD test)

Different small letters indicate significant difference on level  $P < 0.05$  (Fisher LSD test)

Pozn.: Houby byly kultivovány na mediu „Iso-sensi test“ na Petriho miskách. Inokulace houbové kultury byla provedena pomocí aplikace myceliárního terčíku do středu misky. Po dosažení radiálně rostoucího mycelia linie jamek (vytvořených v mediu), byl do jamek aplikován vzorek testované frakce v množství 30 µl příslušné koncentrace. Zaznamenaný stav vytvořených inhibičních zón je po 24 h.

## 4.2. Certifikovaná metodika

### 4.2.1. Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor

Cílem metodiky je shrnutí optimalizovaných nejčastěji používaných postupů a principů izolace a purifikace vybraných skupin hlízových proteinů a jejich hlavních frakcí získaných z hlíz kulturních a planých druhů brambor. Publikace je zaměřena na dvě hlavní skupiny proteinů - patatin a skupiny inhibitorů proteas a jejich šetrnou purifikaci se zachováním všech známých biochemických aktivit. Metodika se kromě detailních postupů izolace a purifikace výše uvedených skupin proteinů zabývá i popisem pracovních postupů měření základní lipidacylhydrolasové aktivity patatinu a měření aktivity inhibitorů proteas. Tato metodika je určena jak pro vzdělávací a výzkumné instituce, tak pro praktické uživatele z oblasti šlechtitelství a potravinářství a zpracovatelského průmyslu.

Kompletní informace jsou uvedeny v publikaci:

Bárta J., Bártová V., Zdráhal Z., Brabcová A., **Kamenová A.**, Diviš J. (2013): Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor. Certifikovaná metodika. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 39.

### **Kapitola 5. Detailní separace frakcí hlízových proteinů pomocí FPLC systému**

Separace proteinů pomocí FPLC systému se považuje za účinnější a rychlejší separaci, která je dána jednak možností monitoringu, regulace a kontinuální kontroly celého procesu separace a také i vyšší kvalitou medií v používaných kolonách. V této kapitole jsou v dílčích kapitolách detailně popsány postupy separace bazických proteinů s využitím měniče kationtů, separace patatinového komplexu a ostatních kyselých proteinů s využitím měniče aniontů a separace subfrakcí bazických proteinů pomocí hydroxyapatitové chromatografie. Tyto postupy jsou doplněny o ukázky záznamů průběhů separací vzorků na jednotlivých kolonách.

### **Kapitola 6. Příprava imitace tepelného koagulátu proteinů z hlízové vody**

Metoda detailně popsaná v této kapitole je založena na principu kombinace efektů tepelného a isoelektrického srážení proteinů pro získání frakce termorezistentních proteinů. Vstupní surovinou může být hlízová voda získaná ze škrobárenského provozu či hlízová šťáva připravená z omytých a osušených hlíz bramboru pomocí kuchyňského odšťavňovače, která simuluje přípravu hlízové vody ve škrobárenském provozu.

### **Kapitola 7.2 Měření aktivit inhibitorů proteas u získaných frakcí**

Inhibitory proteas izolované z hlíz brambor disponují schopností inhibovat většinu hlavních proteasových aktivit. V kapitole 7.2 této monografie jsou uvedeny čtyři nejdůležitější. Uvedené pracovní postupy byly upraveny podle práce Pouvreau (2004). Měření aktivit inhibitoru proteas je založeno na spektrofotometrickém měření zbarvení reakční směsi, které vzniká v souvislosti se štěpením substrátu příslušnou proteasou. Míra zbarvení je ovlivněna aktivitou proteasy, která je závislá na podmínkách reakce a rozsahu inhibice proteasovým inhibitorem (vzorkem).

Vyhodnocení inhibiční aktivity se provádí výpočtem pomocí vzorce, ve kterém jsou zohledněny naměřené absorbance se 100% aktivitou proteasy (bez inhibitoru v reakční směsi), měření blanku (reakční směs pouze s pufrům a substrátem) a měření absorbance reakční směsi se vzorkem (přítomnost pufru, proteasy, inhibitoru a substrátu).

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zemědělská fakulta



Jan Bárta a kol.

**Metody izolace vybraných proteinů  
hlíz brambor**

***CERTIFIKOVANÁ METODIKA***

**2013**

**Autorský kolektiv:** doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.  
Ing. Veronika Bártová, Ph.D.  
doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.  
Ing. Adéla Brabcová  
Ing. Andrea Kamenová  
doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.

**Název:** Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor

**Vydal:** Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,  
Zemědělská fakulta, Studentská 13  
370 05 České Budějovice

**Lektoři:** Ing. Pavel Ryšavý  
Oddělení speciálních analýz rostlin a krmiv  
Národní referenční laboratoř  
Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský v Brně

prof. Ing. Jaromír Lachman, CSc.  
Katedra chemie  
Fakulta Agrobiologie, potravinových  
a přírodních zdrojů  
Česká zemědělská univerzita v Praze

Osvědčení (78-5/KÚ-SŘÚ/UKZUZ/2013) o uznání uplatněné certifikované metodiky vydal Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský dne 30. 04. 2013 v Brně.

Vydáno bez jazykové úpravy

**Kontakty na autory:** barta@zf.jcu.cz

**Autor fotografií:** Jan Bárta

**ISBN 978-80-7394-405-6**

## 5. Detailní separace frakcí hlízových proteinů pomocí FPLC systému

K výhodám separace proteinů pomocí FPLC systému oproti separaci na gravitačních kolonách patří zejména účinnější a rychlejší separace daná použitím lepších kolon (dnes i s rigidními keramickými médii), možnost použití regulovaného průtoku a možnost využití gradientové eluce. K výhodám samozřejmě patří i kontrola separačního systému pomocí účinných detektorů. Proto i v případě dělení dílčích frakcí (frakce B, D, E) z předchozí základní dvoustupňové separace byl použit tento systém.



**Obr. 5:** Komplet středotlaké kapalinové chromatografie FPLC „BioLogic DuoFlow Pathfinder“ (Bio-Rad, USA) pro separaci a analýzu proteinů.



**Obr. 6:** Odsolovací „cartridge“ a kolony s keramickými náplněmi kompatibilní s FPLC systémem.

### 5.1. Separace „basických“ proteinů s využitím měniče kationtů - separace na koloně Uno S6

*Principem chromatografie na měniči kationtů je výměna kladně nabitých iontů vázaných k záporně nabitým funkčním skupinám (ligandům), které jsou pevně zakotvené v matrici (a společně tvoří stacionární fázi), s ionty příslušného pufru (mobilní fáze). Proteiny a peptidy mají amfoterní charakter – jejich náboj a také síla vazby na ligand jsou ovlivňovány pH prostředím (zvoleným pufrem), síla vazby je navíc ovlivňována iontovou silou pufru (vyšší iontová síla vede k eluci). Díky možnosti provést postupné zvyšování iontové síly je možné v rámci FPLC systému provést tzv. gradientovou eluci navázaných složek.*



## Přístroje a vybavení

Kapalinový chromatograf vhodný pro separaci proteinů s možností gradientové eluce a sběrem rozdělených frakcí – FPLC systém (např. DuoFlow BioLogic Pathfinder, Bio-Rad, USA), kolona s náplní měniče kationtů, např. Uno S6 (Bio-Rad, USA). Obecně by měla být použitelná i kolona obdobného typu (samotná zde doporučovaná kolona Uno S je vyráběna ve třech velikostech, s náplní média 1, 6 a 12 ml, proto označení Uno S1, Uno S6 resp. Uno S12). Souprava pro filtraci roztoků, membránové filtry (póry 0,22  $\mu\text{m}$ ), vodní vývěva, injekční stříkačky (objemy 1, 2, 5 ml), nástřiková kapilára, pipety o různém rozsahu a vhodné špičky, váhy, pH-metr, magnetické míchadlo, centrifuga, chladnička, mrazicí box, kádinky o různém objemu, odměrné válce (50, 100, 1000 ml), nálevky, skleněné zkumavky do sběrače frakcí ( $R = 12\text{-}13\text{ mm}$ ,  $V = 10\text{ ml}$ ), plastové dózy, mikrozukavky 1,5 ml, papírové ubrousky, permanentní popisovače atd.

## Chemikálie

MES (2-morfolinethansulfonová kyselina), hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková, chlorid sodný, ethanol, deionizovaná voda.

## Příprava pufrů

Pro separaci proteinů na koloně Uno S6 je zapotřebí připravit startovací a eluční pufr (viz tabulka 4), které jsou odvozeny od základního 1 M MES pufru s pH 6,0. Připravené pufrы by měly být řádně filtrovány (přes membránu s póry 0,22  $\mu\text{m}$ ) a měly by být pro potřeby FPLC systému i odplynovány (degasing) pomocí vodní vývěvy. Nakonec se pufrы převedou do lahví s GL45 uzávěrem.

**Tabulka 4:** Složení pufrů použitých pro separaci proteinů na koloně Uno S6.

komponenta (ml)	UnoS startovací pufr	UnoS eluční Pufr	UnoS uchovávací pufr
	25 mM MES, pH 6,0	25 mM MES, pH 6,0 + 0.5 M NaCl	25 mM MES, pH 6,0 + 20 % ethanol
1 M MES, pH 6,0	25	25	25
5 M NaCl	0	100	0
abs. ethanol	0	0	200
deionizovaná H <sub>2</sub> O	975	875	775

## Příprava vzorku

U vzorku (nezachycené proteiny na měniči aniontů resp. frakce B) je nejprve potřeba upravit reakci na pH 6 pomalým přidáváním 1 M HCl (po kapkách). Poté je potřeba vzorek zakoncentrovat pomocí centrifugačních koncentrátorů, přefiltrovat pomocí stříkačkového filtru (se slabou afinitou filtrační membrány k proteinům a s póry 0,22  $\mu\text{m}$ ), případně místo tohoto kroku je možné také vzorek důkladně z centrifugovat. Zakoncentrování má splnit také odsolení vzorku, v případě většího zasolení vzorku je třeba vzorek před aplikací na kolonu odsolit. Je také potřebné

stanovit koncentraci proteinu ve vzorku a případně množství proteinu v aplikovaném objemu upravit tak, aby bylo kompatibilní s kapacitními možnostmi kolony.

### Příprava FPLC systému

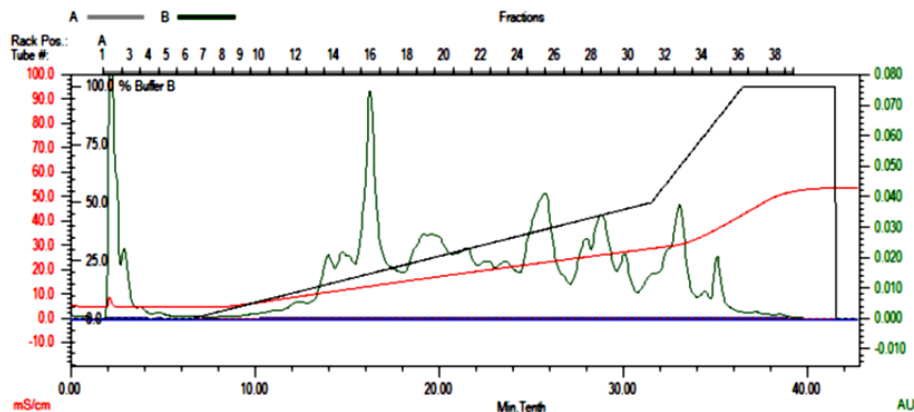
Nejprve se provede instalace kolony. Obsluha FPLC je detailně popsána v manuálu (Anonym 2, 2013), veškeré instrukce výrobce je nutné pro správný chod přístroje respektovat. Přístroj se zapne a po něm i PC řídicí jednotka. Do láhvi s připravenými pufrů (startovací UnoS, eluční UnoS) se zavedou hadičky transportující do pump chromatografu mobilní fázi a u obou pump se přes jejich ventily provede pomocí injekční stříkačky „priming“ – natažení pufrů do pump a odstranění vzduchových bublin. Na dávkovací ventil se nainstaluje dávkovací (nástříková) smyčka o vhodném objemu. Ventil se přepne po polohy „loading“ L, smyčka se propláchne pomocí injekční stříkačky s nástříkovou kapilárou a stejným způsobem se do smyčky provede aplikace příslušného objemu vzorku. Před vlastní separací vzorku je potřebné kolonu propláchnout UnoS startovacím pufrém (alespoň 30 ml) pro dostatečné vymytí uchovávacího pufru a kontrolovat při této operaci úroveň průběhu detektoru – hladinu „baseline“ (při tvorbě nespecifických piků, či nevyrovnaném průběhu je potřeba v promývání pokračovat). Také je zapotřebí zkontrolovat úroveň vodivosti, pro optimální vazbu vzorku je potřeba nízké úrovně vodivosti. Při instalaci nové nepoužité kolony je potřeba postupovat přesně podle instrukcí dodavatele kolony.

### Separace

Vlastní separace s využitím gradientové eluce může probíhat např. podle níže uvedeného protokolu:

<b>krok</b>	<b>ml</b>	<b>operace</b>	<b>pumpa: pufr</b>	<b>podíl pufru</b>	<b>objem/průtok</b>
1	0.00	sběr frakcí od 7 ml do 157 ml, po 4 ml na 1 frakci			
2	0.00	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 4 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
3	4.00	nulování baseliny	QuadTec detektor		
4	4.00	naložení vzorku na kolonu	vzorek		Objem: 2 ml
			statická smyčka	Automatický nástříkový ventil	Průtok: 4 ml/min
5	6.00	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 20 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
6	26.00	lineární gradient	A: startovací	100→50 %	Objem: 100 ml
			B: eluční	0→50 %	Průtok: 4 ml/min
7	126.00	lineární gradient	A: startovací	50→0 %	Objem: 20 ml
			B: eluční	50→100 %	Průtok: 4 ml/min
8	146.00	isokratický tok	A: startovací	0 %	Objem: 20ml
			B: eluční	100 %	Průtok: 4 ml/min
9	166.00	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 30 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
10	196.00	konec separace			

**Obr. 7:** Ukázka záznamu průběhu separace vzorku proteinové „frakce B“ (*Solanum andigenum*) na Uno S6 koloně.



Výsledkem separace frakce B na koloně Uno S6 bylo získání celkem 14 subfrakcí (1 subfrakce nenavázaných proteinů a 13 subfrakcí vázaných proteinů), které byly pomocí sběrače frakcí zachyceny a posléze zakonzentrovány, odsoleny a lyofilizovány. Získané a upravené frakce mohou být následně charakterizovány pomocí elektroforetických technik (SDS-PAGE, 2D-PAGE) nebo pomocí metod hmotnostní spektrometrie (MS). S využitím techniky LC-MS/MS bylo zjištěno přibližně následující složení frakcí:

subfrakce	převažující protein či skupina proteinů podle LC-MS/MS identifikace
<b>2</b>	-
<b>10-12</b>	-
<b>13-15</b>	serinové proteasové inhibitory, bramborový inhibitor 1, bramborový inhibitor 2, bramborový inhibitor proteas Kunitzova typu
<b>16-17</b>	různé serinové proteasové inhibitory, bramborový inhibitor proteas Kunitzova typu
<b>18-20</b>	zejména různé serinové proteasové inhibitory
<b>21</b>	serinové proteasové inhibitory, bramborový inhibitor 1, bramborový inhibitor 2, bramborový inhibitor proteas Kunitzova typu
<b>22-24</b>	bramborové inhibitory proteas Kunitzova typu; cysteinové, aspartátové, a serinové proteasové inhibitory
<b>25-26</b>	cysteinové, aspartátové, a serinové proteasové inhibitory; bramborové inhibitory proteas Kunitzova typu
<b>27-29</b>	bramborové inhibitory cysteinových proteas; inhibitory aspartátových proteas
<b>30</b>	inhibitory cysteinových a serinových proteas
<b>31-32</b>	inhibitory cysteinových, serinových (včetně Kunitzova typu) a aspartátových proteas
<b>33</b>	zejména inhibitory cysteinových proteas
<b>34</b>	směs inhibitorů proteas
<b>35</b>	inhibitory cysteinových proteas, inhibitory proteas Kunitzova typu

## 5.2. Separace patatinového komplexu a ostatních kyselých proteinů s využitím měniče aniontů

Princip separace je stejný jako u metody v kapitole 4.1.

### Přístroje a vybavení

Stejně přístroje a vybavení jako v kapitole 5.1. Jediný rozdíl představuje použití kolony s odlišnou náplní měniče aniontů Uno Q6 (Bio-Rad, USA). Obecně by měla být použitelná i kolona obdobného typu (samotná zde doporučovaná kolona Uno Q je vyráběna ve třech velikostech, s náplní media 1, 6 a 12 ml, proto označení Uno Q1, Uno Q6 resp. Uno Q12).

### Chemikálie

Base Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane), kyselina chlorovodíková, chlorid sodný, ethanol, deionizovaná voda.

### Příprava pufrů

Pro separaci proteinů na koloně Uno Q6 je zapotřebí připravit startovací a eluční pufr (viz tabulka 5), které jsou odvozeny od základního 1 M Tris-HCl pufru s pH 7,4. Jinak je postup přípravy pufrů stejný jako v kap. 5.1.

**Tabulka 5:** Složení pufrů použitých pro separaci proteinu na koloně Uno Q6.

	UnoQ startovací pufr	UnoQ eluční pufr	UnoQ uchovávací pufr
<b>komponenta (ml)</b>	25 mM Tris-HCl, pH 7,4	25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0.5 M NaCl	25 mM Tris-HCl, pH 7,4+ 20 % ethanol
1 M Tris-HCl, pH 7,4	25	25	25
5 M NaCl	0	100	0
abs. ethanol	0	0	200
deionizovaná H <sub>2</sub> O	975	875	775

### Příprava vzorku

U vzorků (a - nezachycené proteiny na mediu s ligandem Concanavalin A resp. frakce D; b – patatiny resp. frakce E; c – celkový protein nebo upravená a filtrovaná hlízová šťáva) je nejprve potřeba upravit reakci na pH 7,4 pomalým přidáváním 1 M Tris nebo 1 M HCl (po kapkách). Poté je potřeba vzorek zakonzentrovat pomocí centrifugačních koncentrátorů, přefiltrovat pomocí stříkačkového filtru (se slabou afinitou filtrační membrány k proteinům a s póry 0,22 μm), případně místo tohoto kroku je možné také vzorek důkladně z centrifugovat. Zakonzentrování má splnit také odsolení vzorku, v případě většího zasolení vzorku je třeba vzorek před aplikací na kolonu odsolit. Je také potřebné stanovit koncentraci proteinu ve vzorku a případně množství proteinu v aplikovaném objemu upravit tak, aby bylo kompatibilní s kapacitními možnostmi kolony.

## Příprava FPLC systému

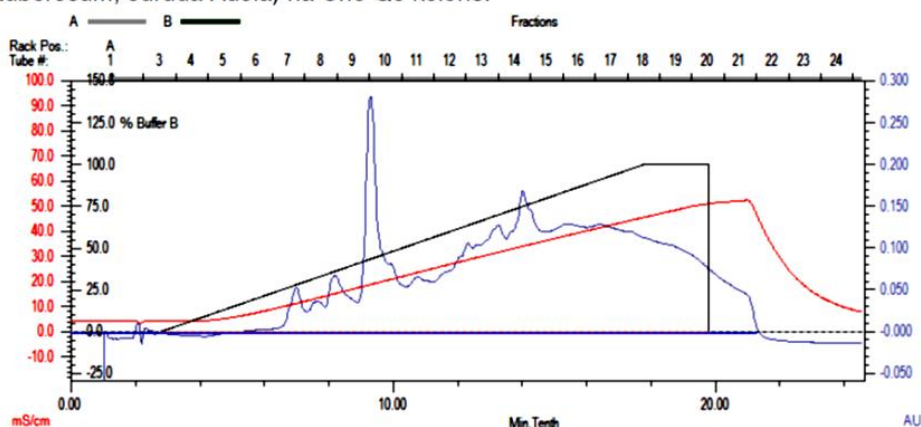
Postup přípravy FPLC systému je stejný jako v kap. 5.1. Odlišností je instalace kolony řady Q a jsou také použity jiné pufr (startovací UnoQ, eluční UnoQ), viz tabulku 5.

## Separace

Vlastní separace s využitím gradientové eluce může probíhat např. podle níže uvedeného protokolu:

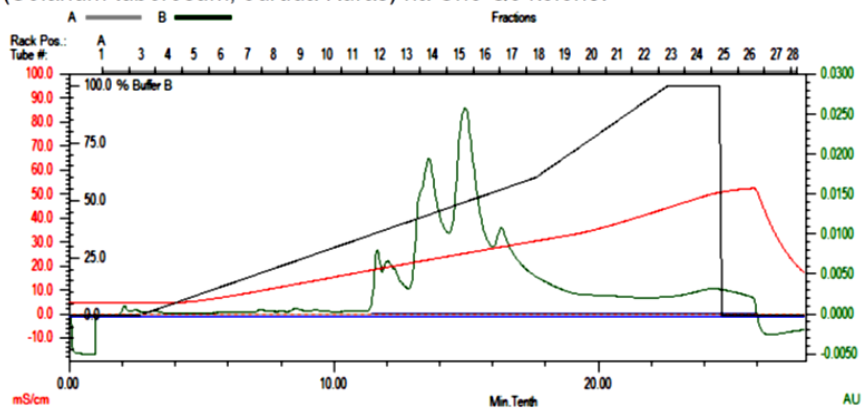
krok	MI	Operace	pumpa: pufr	podíl pufru	objem/průtok
1	0.00	sběr frakcí od 5 ml do 110 ml, po 4 ml na 1 frakci			
2	0.00	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 4 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
3	4.00	nulování baseliny	QuadTec detektor		
4	4.00	naložení vzorku na kolonu	vzorek		Objem: 0.5 ml
			statická smyčka	Automatický nástřikový ventil	Průtok: 4 ml/min
5	4.50	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 6 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
6	10.50	lineární gradient	A: startovací	100→40 %	Objem: 60 ml
			B: eluční	0→60 %	Průtok: 4 ml/min
7	70.50	lineární gradient	A: startovací	40→0 %	Objem: 20 ml
			B: eluční	60→100 %	Průtok: 4 ml/min
8	90.50	isokratický tok	A: startovací	0 %	Objem: 8 ml
			B: eluční	100 %	Průtok: 4 ml/min
9	98.50	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 36 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
10	134.50	konec separace			

**Obr. 8:** Ukázka záznamu průběhu separace vzorku proteinové „frakce D“ (S. tuberosum, odrůda Adéla) na Uno Q6 koloně.

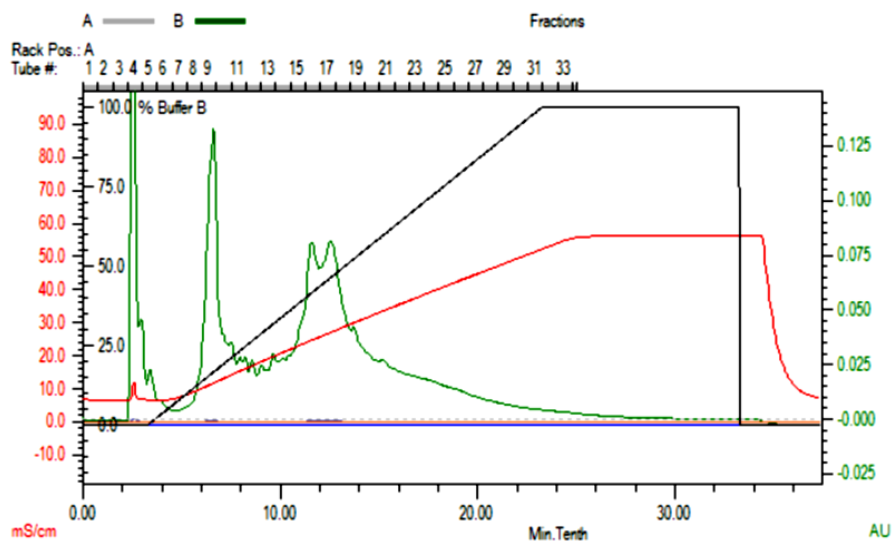


Na obr. 8 je ukázka separace frakce D (nezachycená frakce proteinů na chromatografické náplni s Concanavalinem A) na koloně Uno Q6. Stejnou kolonu je možné použít i pro detailní separaci skupiny patatinových proteinů (frakce E nebo-li frakce zachycená na náplni s Concanavalinem A) na několik subfrakcí (obr. 9). Je všeobecně známo, že patatin vytváří řadu nábojových a hmotnostních isoformů a použití tohoto separačního principu, může být nástrojem pro jejich rozdělení.

**Obr. 9:** Ukázka záznamu průběhu separace vzorku patatinu - proteinové „frakce E“ (*Solanum tuberosum*, odrůda Kuras) na Uno Q6 koloně.



**Obr. 10:** Ukázka záznamu průběhu separace vzorku celkového proteinu hlíz na Uno Q12 koloně.



---

Obr. 10 reprezentuje separaci celkového proteinu na základní frakce pomocí kolony Uno Q12 (obdoba prvního stupně dvoustupňové separace na gravitačních kolonách, viz kap. 4.1.). Nezachycené proteiny (frakce 4-5) představují „basické“ inhibitory proteas, s využitím gradientové eluce je vzorek separován na další frakce obsahující patatin a ostatní proteiny. Pro kolonu Uno Q12 platí stejný sled kroků, který je uveden v separačním protokolu kolony Uno Q6, u kolony Uno Q12 jsou pouze zvýšeny objemy mobilní fáze v úměře nárůstu objemu náplně oproti koloně Uno Q6.

### **5.3. Detailní separace subfrakcí basických proteinů pomocí hydroxyapatitové chromatografie**

*Princip separace proteinů pomocí hydroxyapatitového média je popisován jako směsný způsob výměny iontů. Zahrnuje nescifické interakce mezi pozitivně nabitými vápenatými ionty a negativně nabitými fosfátovými ionty stacionární fáze s negativně nabitými karboxylovými a pozitivně nabitými amino skupinami proteinů.*

U CHT 5 kolony (typ I) od firmy Bio-Rad, která byla použita v této metodice, je efektivita separačního procesu ještě „vylepšena“ sférickým keramickým uspořádáním media, které překračuje fyzikální a chemickou nestabilitu původní krystalické formy hydroxyapatitu. Tento typ chromatografie je doporučován pro pozdní fáze separačního procesu, především v případě basických proteinů.

#### **Přístroje a vybavení**

Stejně přístroje a vybavení jako v kapitole 5.1. akorát se použije kolona s náplní hydroxyapatitu CHT5-I (Bio-Rad, USA). Obecně by měla být použitelná i kolona obdobného typu od jiného dodavatele.

#### **Chemikálie**

Hydrogenfosforečnan disodný ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), dihydrogenfosforečnan sodný ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), ethanol, deionizovaná voda.

#### **Příprava pufrů**

Pro separaci proteinů na koloně CHT5-I je zapotřebí připravit startovací a eluční pufr (viz tabulka 6), které jsou odvozeny od základního 1 M Na-fosfátového pufru s pH 6,8. Jinak je postup přípravy pufrů stejný jako v kap. 5.1.

#### **Příprava vzorku**

U vzorků (subfrakce získané separací vzorků na kolonách s iontovýměnnou náplní) je nejprve potřeba upravit reakci na pH 6,8 pomalým přidáváním 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  nebo 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (po kapkách). Poté je potřeba vzorek zakoncentrovat pomocí centrifugačních koncentrátorů, přefiltrovat pomocí stříkačkového filtru (se slabou afinitou filtrační membrány k proteinům a s póry 0,22  $\mu\text{m}$ ), případně místo tohoto kroku je možné také vzorek důkladně zcentrifugovat. Zakoncentrování má splnit také odsolení vzorku, v případě většího zasolení vzorku je třeba vzorek před

aplikací na kolonu odsolit. Je také potřebné stanovit koncentraci proteinu ve vzorku a případně množství proteinu v aplikovaném objemu upravit tak, aby bylo kompatibilní s kapacitními možnostmi kolony.

**Tabulka 6:** Složení pufrů použitých pro separaci proteinu na koloně CHT5-I

komponenta (ml)	CHT startovací pufr		CHT eluční pufr		CHT uchovávácí pufr	
	10 mM Na-fosfátový pufr, pH 6,8	Na- pH	500 mM Na-fosfátový pufr, pH 6,8	Na- pH	10 mM Na-fosfátový pufr, pH 6,8 + 20 % ethanol	Na- pH
1 M Na-fosfátový pufr, pH 6,8	10		500		10	
abs. ethanol	0		0		200	
deionizovaná H <sub>2</sub> O	990		500		790	

### Příprava FPLC systému

Postup přípravy FPLC systému je stejný jako v kap. 5.1. Odlišností je instalace kolony CHT5-I a jsou také použity jiné pufrы (startovací CHT, eluční CHT), viz tab. 6.

### Separace

Vlastní separace s využitím gradientové eluce může probíhat např. podle níže uvedeného protokolu:

krok	ml	operace	pumpa: pufr	podíl pufru	objem/průtok
1	0.00	sběr frakcí od 5 ml do 80 ml, po 4 ml na 1 frakci			
2	0.00	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 4 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
3	4.00	nulování baseliny	QuadTec detektor		
4	4.00	naložení vzorku na kolonu	vzorek		Objem: 1 ml
			statická smyčka	Automatický nástřikový ventil	Průtok: 4 ml/min
5	5.00	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 16 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
6	21.00	lineární gradient	A: startovací	100→0 %	Objem: 50 ml
			B: eluční	0→100 %	Průtok: 4 ml/min
7	71.00	isokratický tok	A: startovací	0 %	Objem: 25ml
			B: eluční	100 %	Průtok: 4 ml/min
8	96.00	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 25 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
9	121.00	konec separace			

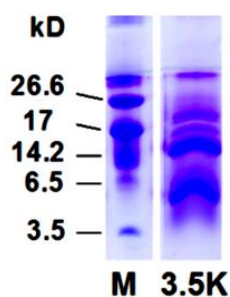
Na obr. 11 je ukázka možnosti separace subfrakce 16-17, která vznikla frakcionací frakce B na koloně Uno S6 (měnič kationtů), na koloně s hydroxyapatitovou náplní. Vzorek je rozdělen na nenavázanou část (dav píky) a na část zachycených proteinů, které se v důsledku gradientové eluce rozdělily na dva píky.





U centrifugované a filtrované PFJ se opatrně provede úprava reakce na pH 5 (pomocí 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Takto upravená PFJ se převede do potřebného počtu 50 ml centrifugačních tub (doporučujeme plnit jen 40 ml). Víčky uzavřené tuby s PFJ se vloží do stojánku a i se stojánkem se poté umístí do vodní lázně předem vytemperované na teplotu 80 °C. Vlastní tepelná koagulace probíhá 10 minut. Čas potřebný pro vlastní koagulaci proteinů se počítá až po vyhřátí PFJ v tubách na uvedenou teplotu 80 °C. Po této proceduře se stojánek s tubami vyjme z vodní lázně a tuby jsou ochlazeny na pokojovou teplotu pomocí studené vody. Tepelný koagulát bramborových proteinů se oddělí od tekutého podílu pomocí centrifugace (4500 ot./min, 10 minut, 20 °C). Po centrifugaci se supernatant zachytí (uplatní se pro izolaci teplotně rezistentních proteinů resp. peptidů) a k peletu se kvůli proprání přidá 20 ml deionizované vody. Pelet se s přidanou vodou důkladně promísí (nejlépe pomocí skl. tyčinky roztrháním peletu po vnitřní stěně tuby) a opět se provede centrifugace za stejných podmínek. Celý promývací krok se opakuje minimálně ještě jednou (lépe dvakrát). Finálně promyté pelety koagulovaných proteinů v tubách se dají zamrazit a poté jsou podrobeny lyofilizaci (420 mbar, -50 °C, 48 hod.) do neměnné hmotnosti. Lyofilizovaný proteinový koagulát se poté zhomogenizuje či pomele. Takto získaný tepelný koagulát hlízových proteinů si zachovává většinu majoritních komponent profilu proteinů hlíz bramboru avšak jejich rozpustnost je velmi omezená.

Supernatant po tepelné koagulaci proteinů obsahuje balastní látky (neproteinové dusíkaté látky, cukry, minerální látky aj.), ale také proteiny, které jsou v různém rozsahu odolné proti tepelné koagulaci při zvolené teplotě 80 °C. Jedná se zejména o bramborové inhibitory proteas I a II. Tyto inhibitory si i přes vysokou teplotu částečně zachovávají svou inhibiční aktivitu, zejména proti aktivitě trypsinu. Jejich izolace proto může být zajímavá, přinejmenším pro další oblast studia. Izolace těchto proteinů je poměrně snadná, detailně byl celý postup popsán v užitém vzoru autorů metodiky (Bárta et al., 2012). Zjednodušeně postup spočívá v předchozím odstranění majoritní frakce proteinů pomocí tepelné koagulace a v následném oddělení nízkomolekulárních složek pomocí dialýzy či pomocí gelové filtrace. Membrána dialyzačního potrubí resp. dialyzační kazety by měla mít póry s MWCO 3 - 3,5 kDa. Před vlastní dialýzou je výhodné vzorek zakoncentrovat pomocí lyofilizace nebo s využitím centrifugačních koncentrátorů. Dialýza by měla probíhat proti vodě resp. slabému pufru v objemovém poměru min. 1:10 (vzorek : voda), po celkovou dobu minimálně 12 hod. s výměnou vody při dialýze nejméně třikrát (vždy po 2 hodinách). Dialyzovaný vzorek je lyofilizován a uchováván v mrazícím boxu (-20 °C). Vhodným doplněním je možnost vzorek před finální lyofilizací zakoncentrovat pomocí centrifugačních koncentrátorů a finálně odsolit pomocí odsolovací kolony na FPLC.



**Obr. 12:** SDS-PAGE analýza termorezistentních proteinů z hlízové vody (získaných výše popsaným způsobem) na 16% gelu v systému Tris-tricinového pufru. M – hmotnostní standard, 3.5K – frakce termorezistentních proteinů s odsolením na dialyzační kazetě s MWCO 3,5 kDa.

## 7. Hodnocení biologických aktivit získaných frakcí proteinů

Aktivita lipidacylhydrolasy patatinů a aktivity inhibitorů hlavních typů proteas (serinové, aspartátové, cysteinové proteasy) patří k nejvýznamnějším aktivitám hlízových proteinů.

### 7.1. Měření specifické aktivity lipidacylhydrolasy patatinu

Uvedený pracovní postup pro stanovení specifické lipidacylhydrolasy byl upraven podle metodiky uvedené v práci Pots (1999).

*Princip měření lipidacylhydrolasové aktivity je založen na měření absorbance žlutě zbarveného nitrofenolu, který vzniká v reakční směsi aktivitou enzymu (vzorku) – štěpením bezbarvého substrátu tzn. nitrofenylového esteru příslušné karboxylové kyseliny (např. nitrofenylbutyrátu). Vyhodnocení pak probíhá pomocí kalibrační křivky či výpočtem na základě rovnice odvozené z této kalibrační křivky. Kalibrační křivka je sestavena změřením absorbance koncentrační řady žlutě zbarveného standardu nitrofenolu.*

### Přístroje a vybavení

Mikrozkumavky, pipety a špičky, váhy, laboratorní sklo, pH metr, kyvety spektrofotometr.

### Chemikálie a materiál

Base Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane), kyselina chlorovodíková, *p*-nitrofenol (standard), *p*-nitrofenylbutyrát (resp. substrát s jiným zbytkem – dle požadavku na specifitu substrátu), deionizovaná voda, vzorky purifikovaného patatinu o jednotné koncentraci.



**Obr. 13:** Dvoupaprskový spektrofotometr BioMate 5 (Thermo, UK) vhodný pro měření enzymové aktivity.

## Pracovní postup

Nejprve se provede příprava všech potřebných roztoků:

### Substrát *p*-nitrofenylbutyrát , 20 mM

41,84 mg *p*-nitrofenylbutyrátu (MW=209,20) se naváží do kádinky a toto množství se rozpustí přidáním 10 ml acetonu.

### Pufr Tris-HCl pH 7.4, 50 mM

1 litr 1 M Tris-HCl se připraví navážením 121.1 g base Tris (MW=121,14) do kádinky o objemu 1 litr, přidá se asi 700 ml deioniz. vody a po dokonalém rozpuštění se upraví reakce pomocí kyseliny chlorovodíkové na pH 7,4. Poté doplníme objem deioniz. vody do 1 L. 100 ml 50 mM Tris-HCl pufru se připraví ředěním 1 M pufru tj. 5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,4 + 95 ml deioniz. vody.

### Standard *p*-nitrofenol, 50 mM

69,56 mg *p*-nitrofenol (MW=139,11) se naváží do kádinky, přidá se acetonu do objemu 10 ml a vše se dokonale rozpustí.

Poté se provede příprava a měření vzorků standardů, potřebných pro konstrukci kalibrační křivky a odvození rovnice této závislosti. Postupuje se stejným způsobem dle níže uvedeného postupu jakoby se měřily neznámé vzorky. Ředění vzorků standardu se provede podle tabulky 7.

Na základě naměřených hodnot absorbance pro jednotlivá ředění standardu je sestavena kalibrační křivka a z ní je odvozena i rovnice pro výpočet aktivity neznámého vzorku (obr. 14).

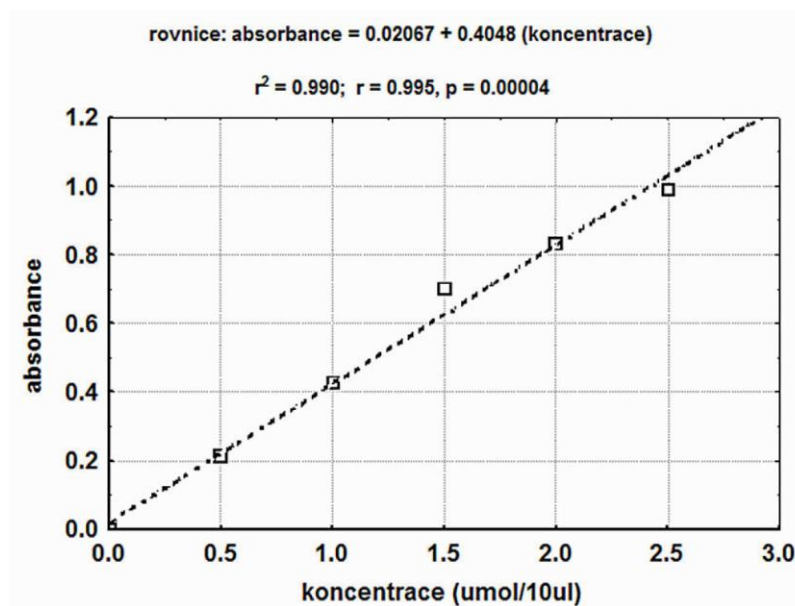
### Stanovení specifické aktivity

- Reakce se provede do celkového objemu 200  $\mu$ l:  
180  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl pufru (pH 7.4) + 10  $\mu$ l enzymu (patatinu) + 10  $\mu$ l substrátu
- Celý objem připravené reakce se řádně promíchá, kyveta je vložena do přístroje a měří se absorbance při 37°C po dobu 10 minut (přímo ve spektrofotometru)
- Hodnotu absorbance dosadíme do rovnice odvozené od konstrukce kalibrační křivky a vypočteme koncentraci ( $\mu$ mol/10  $\mu$ l)
- Z hodnot koncentrace stanovíme specifickou aktivitu v  $\mu$ mol/[min mg]

**Tabulka 7:** Ředění standardu *p*-nitrofenol pro měření se substrátem *p*-nitrofenylbutyrátem

	50 mM <i>p</i> -nitrofenol ( $\mu$ l)	50 mM Tris-HCl (7.4) ( $\mu$ l)	Výsledná koncentrace ( $\mu$ mol/10 $\mu$ l)
Blank	0	1000	0
1	10	990	0,5
2	20	980	1
3	30	970	1,5
4	40	960	2
5	50	950	2,5
6	60	940	3
7	70	930	3,5
8	80	920	4
9	90	910	4,5
10	100	900	5

**Obr. 14:** Kalibrační křivka a podle ní odvozená rovnice pro výpočet koncentrace *p*-nitrofenolu (graf byl vytvořen v programu Statistica)



### 4.3. Užiténý vzor


#### 4.3.1. Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností

Užitečný vzor se zabývá technickým řešením přípravy bílkovinného izolátu z brambor s antimikrobiální účinností, který se připravuje z hlízové vody (sekundární produkt vznikající při průmyslovém zpracování směsi odrůd hlíz brambor na škrob) nebo hlízové šťávy (šťáva připravená odšťávením hlíz jedné odrůdy brambor v laboratorních podmínkách jako simulace průmyslového struháku). Následuje odstranění termolabilních bílkovin pomocí tepelné koagulace při 80°C a odstranění balastních látek, které jsou tvořeny minerálními látkami, cukry, volnými aminokyselinami a dalšími organickými látkami (maximálně 15 % hm.) pomocí dialýzy se současným zachováním rozpustnosti účinné frakce skupiny bílkovin (alespoň 70 % hm.) s antimikrobiální aktivitou o molekulové hmotnosti 3,5 – 20 kDa a subfrakcemi o molekulové hmotnosti 14-18 kDa (35-50 % hmotnosti bílkovinného izolátu; PI-2 a PI-1), 6 - 11 kDa (40 – 55 % hmotnosti bílkovinného izolátu; PI-2, PI-1, inhibitory proteas indukované poraněním a serinové inhibitory proteas).

Kompletní informace vztahující se k této problematice jsou shrnuty v publikaci:

Bárta, J., Bártová V., **Kamenová A.**, Zdráhal Z., Brabcová A., Čurn V. (2012) Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností. Česká republika. Užiténý vzor, CZ23983U1. Zapsáno 18. 6. 2012.

# UŽITNÝ VZOR

<p>(19) ČESKÁ REPUBLIKA</p>  <p>ÚŘAD PRŮMYSLŮVÉHO VLASTNICTVÍ</p>	<p>(21) Číslo přihlášky: <b>2012 - 25742</b> (22) Přihlášeno: <b>12.03.2012</b> (47) Zapsáno: <b>18.06.2012</b></p>	<p>(11) Číslo dokumentu: <b>23983</b></p> <p>(13) Druh dokumentu: <b>U1</b></p> <p>(51) Int. Cl.: <b>A23J 1/16</b> (2006.01)</p>
--	---	--

(73) Majitel:  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta, České Budějovice, CZ

(72) Původce:  
Bárta Jan doc. Ing. Ph.D., Dubné, CZ  
Bártová Veronika Ing., Rudolfovo, CZ  
Kamenová Andrea, Velešín, CZ  
Zdráhal Zbyněk doc. RNDr. Dr., Kuřim, CZ  
Brabcová Adéla, České Budějovice, CZ  
Čurn Vladislav doc. Ing. Ph.D., Dobrá Voda u Českých Budějovic, CZ

(74) Zástupce:  
PatentCentrum Sedlák a Partners s.r.o., Ing. Jiří Sedlák, Husova 5, České Budějovice, 37001

(54) Název užitného vzoru:  
**Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností**

**CZ 23983 U1**

Úřad průmyslového vlastnictví v zápisném řízení nezjišťuje, zda předmět užitného vzoru splňuje podmínky způsobilosti k ochraně podle § 1 zák. č. 478/1992 Sb.

CZ 23983 U1

## Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností

### Oblast techniky

5 Technické řešení se týká izolátu proteinů z brambor s antimikrobiální účinností, který se připravuje z hlízové vody či šťávy odstraněním termolabilních proteinů pomocí tepelné koagulace a odstraněním balastních látek pomocí dialýzy, a ve kterém je zachována rozpustnost účinné frakce proteinů s antimikrobiální aktivitou.

### Dosavadní stav techniky

10 Hlízy bramboru obsahují přibližně 1,5 až 2,5 % hmotn. dusíkatých látek a přibližně 1,0 až 1,5 % hmotn. proteinů. Z proteinů jsou v hlízách zastoupeny především dvě významné skupiny - proteiny patatinového komplexu a skupina inhibitorů proteas. Obě skupiny proteinů plní zejména roli zásobních proteinů a jsou zastoupeny významnými podíly - proteiny patatinového komplexu v rozpětí 20 až 40 % hmotn. a skupina inhibitorů proteas v rozpětí 30 až 50 % hmotn..

15 Proteiny patatinového komplexu jsou glykoproteiny plnící jako hlavní úlohu roli zásobních proteinů hlíz. Považují se za dimery s molekulovou hmotností monomeru v rozpětí 40 až 43 kDa. Rozdíly v hmotnosti se mění podle stupně glykosylace polypeptidového řetězce. Kromě funkce zásobních proteinů disponují patatinové proteiny lipidacylhydrolasovou aktivitou a uvádí se, že disponují i dalšími enzymovými aktivitami (fosfolipasa A2,  $\beta$ -1,3-glukanasa aj.). Předpokládá se, že se kromě role zásobních proteinů hlíz účastní také na systému jejich obrany. Inhibitory proteas představují vysoce heterogenní skupinu proteinů s molekulovými hmotnostmi podjednotek v

20 intervalu 4 až 25 kDa. Jejich klasifikace není zcela jasná. Často jsou tříděny do několika tříd či skupin, většinou na základě svých vlastností, jakými jsou molekulová hmotnost, isoelektrický bod, počet podjednotek, inhibiční aktivita vůči hlavním proteasám (trypsin, papain, cathepsin D, karboxypeptidasa) apod. Jejich fyziologická role opět souvisí s úlohou obrany hlíz a s úlohou zásobních proteinů.

25 Drtivá většina proteinů bramborových hlíz patří mezi vodorozpustné frakce, takže při zpracování brambor na škrob přecházejí proteiny do hlízové vody (potato fruit juice), která je vedlejším produktem zpracovatelského procesu. Hlízová voda obsahuje 4 až 6 % hmotn. sušiny, v sušině pak 37 až 44 % hmotn. dusíkatých látek, z nichž 40 až 70 % hmotn. představují proteiny. V proteinovém spektru hlízové vody jsou zastoupeny obě výše uvedené skupiny proteinů, a sice v podobném relativním zastoupení. V některých zahraničních škrobárnách je hlízová voda zpracovávána a je z ní získáván celoproteinový koncentrát, zejména technologií založenou na tepelné koagula-

30 ci. Koncentrát tohoto typu se sušinou 95 % hmotn. obsahuje nejméně 70 % hmotn. proteinů. V proteinovém spektru koncentrátu jsou zastoupeny obě výše uvedené skupiny proteinů v přibližně uvedeném rozsahu.

35 Úkolem technického řešení je vytvořit izolát proteinů z brambor, který by obsahoval termostabilní proteiny s přirozenou antimikrobiální účinností pro využití v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

### Podstata technického řešení

40 Tento úkol je vyřešen vytvořením izolátu proteinů z brambor s antimikrobiální účinností podle tohoto technického řešení. Podstata technického řešení spočívá v tom, že izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností obsahuje alespoň 70 % hmotn. termostabilních proteinů, tvořených alespoň jednou proteinovou frakcí o molekulové hmotnosti od 3,5 až 20 kDa, odolných vůči teplotě 80 °C a opětovně vodorozpustných, přičemž izolát obsahuje maximálně 15 % hmotn. balastních nízkomolekulárních látek. Za balastní nízkomolekulární látky jsou v tomto případě

45 považovány minerální látky, cukry, volné aminokyseliny a jiné organické látky.

Ve výhodném provedení sestává proteinová frakce ze dvou subfrakcí, přičemž molekulová hmotnost podjednotek první subfrakce je od 14 do 18 kDa a tvoří 35 až 50 % hmotnosti proteinů izo-



látu, a molekulová hmotnost podjednotek druhé subfrakce je 6 až 11 kDa a druhá subfrakce tvoří 40 až 55 % hmotnosti proteinů izolátu.

Je výhodné, že první proteinová subfrakce obsahuje bramborový inhibitor proteas typu II a bramborový inhibitor proteas typu I.

5 Dále je výhodné, že druhá proteinová subfrakce obsahuje bramborový inhibitor proteas typu II, bramborový inhibitor proteas typu I, inhibitor proteas indukovaný poraněním a serinový inhibitor proteas brambor. Zastoupení obou subfrakcí v izolátu je podmíněno dodržением jeho technologického postupu výroby, zejména dodržением „koagulační“ teploty na úrovni 78 až 82 °C. Při vyšších teplotách (nad 85 °C) postupně dochází ke snižování zastoupení druhé hmotnostní subfrakce  
10 v izolátu a tím i k poklesu celkové inhibiční aktivity vůči trypsinu.

Základem účinnosti izolátu termostabilních proteinů je jeho inhibiční aktivita proti proteasám serinového typu, zejména proti trypsinu, která je v dostatečné míře zachována i po aplikaci koagulační teploty 80 °C. Při 50% inhibici představuje aktivita inhibující trypsin (TIA) nejméně 100 mg trypsinu na 1 g izolátu.

15 Popsané proteinové složení izolátu je účinnou složkou jeho antimikrobiální aktivity vyznačující se zejména proti mikroskopickým houbám. S výhodou se jedná především o fytopathogenní a saprofytické houby, způsobující vážná onemocnění významných polních plodin či poškození a znehodnocení komodit, surovin anebo potravin rostlinného původu. Izolát účinně potlačuje již od koncentrace 1 mg/ml myceliární růst hub z rodu *Fusarium*, např. *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, které způsobují onemocnění bramboru, lnu, luskovin a obilnin. Dále  
20 potlačují myceliární růst fytopathogenních hub z rodu *Rhizoctonia*, *Drechslera*, *Fusarium* a *Phoma* a hub z rodu *Aspergillus* a *Rhizopus*.

Ze stejného důvodu může být izolát využit svým zakomponováním do povrchových vrstev obalů a obalových materiálů, především obalů potravin, pro zvýšení jejich odolnosti vůči působení  
25 mikroorganismů, zejména mikroskopických hub. Zde může být s výhodou využita schopnost účinných složek izolátu odolávat vyšším teplotám (do 80 °C), při jeho přidávání na povrch výrobků či obalů za vyšších teplot v průběhu realizačního procesu.

Izolát může být rovněž využit jako prostředek na ochranu rostlin vůči houbovým patogenům se schopností potlačit jejich růstové schopnosti, zejména v pěstitelských systémech, kde není využití  
30 konvenčních chemických přípravků na ochranu rostlin možné (ekologické systémy pěstování rostlin) či vhodné (uzavřené místnosti obývané lidmi a zvířaty, např. u pokojových rostlin).

Izolát lze dále s výhodou využít jako vstupní surovinu pro další aplikace v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

Majoritní termolabilní proteinové frakce (patatin, část inhibitorů proteas) jsou obsaženy pouze ve stopových množstvích v důsledku jejich tepelného vysrážení prostřednictvím aplikované teploty  
35 80 °C. Ze složité skupiny inhibitorů proteas jsou tak odstraněny labilní formy bramborového cysteinového inhibitoru proteas či proteinas (potato cysteine protease inhibitor; potato cysteine proteinase inhibitor), bramborového aspartátového inhibitoru proteas (potato aspartic protease inhibitor), bramborového inhibitoru Kunitzova typu (potato Kunitz-type protease inhibitor) a část  
40 inhibitorů serinových proteas (serine protease inhibitor).

Výhody izolátu proteinů z brambor podle tohoto technického řešení spočívají v jeho odolnosti proti teplotě 80 °C, v jeho opakované vodorozpustnosti a jeho antimikrobiální účinnosti.

#### Příklady provedení technického řešení

45 Předpokládá se, že dále popsané příklady uskutečnění technického řešení jsou představovány pro ilustraci nikoli jako omezení možných provedení technického řešení na uvedené příklady. Odborníci znalí stavu techniky najdou nebo budou schopni zajistit za použití rutinního experimentování větší či menší počet ekvivalentů ke specifickým uskutečněním technického řešení, která jsou zde speciálně popsána. I tyto ekvivalenty budou zahrnuty do rozsahu nároků na ochranu.

Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností podle tohoto technického řešení obsahuje min. 70 % hmotn. termostabilních proteinů a max. 15 % hmotn. balastních nízkomolekulárních látek jako jsou např. minerální látky, cukry, volné aminokyseliny a další organické látky.

Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností se připraví následujícím způsobem:

- 5 Hlízová šťáva uvolněná z hlíz bramboru po jejich desintegraci se odstředí (4000 rpm, 10 min., 4 °C) pro odstranění zbytkového škrobu, vlákniny a jiných případných nerozpustných částí. Dále je nutné získaný supernatant přefiltrovat přes běžný laboratorní filtrační papír.

10 S výhodou je možné pro produkci izolátu termostabilních proteinů použít jako vstupní surovinu i tzv. hlízovou vodu (označovanou jako „potato fruit juice“), která je vedlejším produktem škrobářských provozů při zpracování brambor na škrob. Taktéž tento materiál je nutné upravit výše uvedeným způsobem.

15 Ze získaného supernatantu upraveného filtrací je potřebné odstranit pomocí tepelné koagulace majoritní termolabilní proteiny (patatinové proteiny; frakce inhibitorů proteas zejména s cysteinovou a aspartátovou aktivitou). Pokud je při výrobě výše uvedeného celoproteinového koncentráту aplikována technologická teplota koagulace v rozmezí 78 až 82 °C, pak je s výhodou možné „odpadní tekutý podíl“ po tepelné koagulaci proteinů z hlízové vody použít pro výrobu izolátu termostabilních proteinů, neboť termostabilní proteiny v tomto podílu zůstávají.

20 U čirého filtrátu se provede úprava reakce přidáním 0,5 M kyseliny sírové do hodnoty pH 5,0. Poté se filtrát s upraveným pH přenesou do centrifugačních tub. Tuby se uzavřou, vloží se do stojánku a dále do vodní lázně vytemperované na 80 °C. Je potřebné počkat, až teplota filtrátu v tubách dosáhne 80 °C a od tohoto momentu se provede tepelná koagulace ponecháním tub ve vytemperované lázni 10 až 15 minut. Poté se tuby i s obsahem ochladí na pokojovou (20 °C) teplotu a následně se provede centrifugace (9000 rpm, 10 min., 20 °C) pro oddělení vysrážených termolabilních bílkovin (pelet) od zbylého tekutého podílu (supernatant). Supernatant (obsahující termostabilní proteiny) se opatrně převede do dóz, ve kterých je dále zamrazen při -20 °C a následně zakoncentrován pomocí lyofilizace do konstantní hmotnosti (0,470 mbar, -50 °C).

25 Takto připravená sušina se rozpustí v deionizované vodě v koncentraci 30 % (w/v) a naplní se buď do dialyzačních kolon nebo do dialyzačního potrubí (s póry membrány na úrovni MWCO 3,5 kDa) a provede se dialýza proti chlazené deionizované vodě v objemovém poměru 1:20 po dobu nejméně 5 hod. Po této době se provede výměna stávající deionizované vody za novou a opět se nechá probíhat dialýza 5 hodin. Dialýza se provede celkem 4×. Po proběhnutí dialýzy se obsah dialyzační kazety nebo potrubí opět převede do dózy, zmrazí při -20 °C a vysuší do konstantní hmotnosti (0,470 mbar, -50 °C).

35 Izolát termostabilních proteinů je suchý, vodorozpustný, elektrostatický, světle hnědý až zlatý prášek.

#### Průmyslová využitelnost

Izolát termostabilních proteinů může být využit nepřímo jako zdroj významné skupiny inhibitorů proteas, které si svou inhibiční aktivitu zachovávají i po aplikaci vyšších teplot (80 °C), pro detailní purifikační postupy s cílem získat „čisté“ izoláty konkrétního inhibitoru.

- 40 Přímé praktické využití tohoto proteinového izolátu souvisí s jeho antimikrobiální aktivitou. Izolát může být využit jako krátkodobý přírodní ochranný prostředek na povrchové vrstvy surovin rostlinného a živočišného původu, potravinářských surovin či přímo potravin, zpomalující jejich znehodnocení způsobené jejich povrchovou kontaminací mikroorganismy, zejména mikroskopickými houbami. Přípravek může být s výhodou využit i jako přírodní ochranný prostředek na povrchových vrstvách obalových materiálů používaných pro potravinářské suroviny a výrobky.
- 45 Přípravek může být s výhodou využit také jako výchozí materiál pro přípravu léčivých a kosmetických prostředků na léčbu opruzenin a slabších forem dermatid.

CZ 23983 U1

### NÁROKY NA OCHRANU

1. Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň 70 % hmotn. termostabilních proteinů, tvořených alespoň jednou proteinovou frakcí o molekulové hmotnosti od 3,5 až 20 kDa, odolných vůči teplotě 80 °C a opětovně vodorozpustných, přičemž izolát obsahuje maximálně 15 % hmotn. balastních nízkomolekulárních látek.  
5
2. Izolát termostabilních proteinů podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že proteinová frakce sestává ze dvou subfrakcí, přičemž molekulová hmotnost podjednotek první subfrakce je od 14 do 18 kDa a tvoří 35 až 50 % hmotnosti proteinů izolátu, a molekulová hmotnost podjednotek druhé subfrakce je 6 až 11 kDa a druhá subfrakce tvoří 40 až 55 % hmotnosti proteinů izolátu.  
10
3. Izolát termostabilních proteinů podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že první proteinová subfrakce obsahuje bramborový inhibitor proteas typu II a bramborový inhibitor proteas typu I.
- 15 4. Izolát termostabilních proteinů podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že druhá proteinová subfrakce obsahuje bramborový inhibitor proteas typu II, bramborový inhibitor proteas typu I, inhibitor proteas indukovaný poraněním a serinový inhibitor proteas brambor.
- 20 5. Izolát termostabilních proteinů podle alespoň jednoho z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že balastní nízkomolekulární látky jsou minerální látky, cukry, volné aminokyseliny a jiné organické látky.

Konec dokumentu

## 4.4. Rukopis publikace připravené do tisku

### 4.4.1. Recovery of thermo resistant potato proteins and their antifungal inhibition influence on *Fusarium* spp. mycelium growth

Inhibitory proteas jsou hlavní skupinou termorezistentních bílkovin vyskytující se v hlízách bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) a díky svým bohatým biologickým vlastnostem pravděpodobně hrají několik důležitých rolí v ochraně rostlin proti patogenům a hmyzu. Tento příspěvek se zabývá hodnocením antifungálního potenciálu termorezistentních bílkovin získaných ze šesti odrůd bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.) David, Fabia, Marabel, Laura, Sibü, Westamyl, které se navzájem liší užitkovým směrem a raností. Z každé z těchto odrůd zvláště byla připravena hlízová šťáva za použití kombinace úpravy pH a tepelného zpracování při 80°C (V80) a varianty pouze s úpravou pH (kontrolní varianta). Izolované bílkoviny varianty V80 byly identifikovány pomocí LC-MS/MS jako inhibitory proteas a následně byla zjišťována jejich antifungální aktivita při aplikaci ke třem fytopatogenním druhům hub *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* a *Fusarium solani*. Měření inhibičních aktivit u uvedených druhů fytopatogenních hub bylo zároveň pro úplnost výsledků doplněno o biochemický rozbor obou variant všech odrůd a to měřením obsah dusíku, glykoalkaloidů, draslíku, sacharidů a měřením ECD spektra a inhibiční aktivity trypsinu.

Při porovnání výsledků antifungálních testů byl prokázán výrazně největší inhibiční účinek v rámci testovaných odrůd u odrůdy Sibü V80. Antifungální účinek (velikost inhibiční plochy) odrůdy Sibü byl nejsilnější při použití koncentrace 10 mg/ml izolátu a to hned u dvou druhů fytopatogenních hub *Fusarium graminearum* (206,8 mm<sup>2</sup>) a *Fusarium solani* (181,93 mm<sup>2</sup>). Tyto druhy hub byly zároveň nejcitlivějšími testovanými kmeny fytopatogenních hub použitých v testu, naopak nejméně citlivým druhem byla houba *Fusarium oxysporum*.

LC-MS/MS analýzou vybraných spotů každé z šesti zkoumaných odrůd bylo zjištěno, že, v testovaných vzorcích se převážně vyskytovaly inhibitory proteas I (PI-1), inhibitory proteas II (PI-2) a karboxypeptidázový inhibitor (PCI). Při analýze detekovaných jedinečných spotů na 2D SDS-PAGE byla u odrůdy Sibü V80, která prokázala ze všech testovaných odrůd největší antifungální účinek, zjištěna největší intenzita spotů identifikovaných jako PI-1, což by mohlo předznamenat jistou spojitost s jejím největším antifungálním účinkem, zároveň byl u této odrůdy identifikován unikátní protein s molekulovou hmotností 11,97 kDa a pI 4,96, který nebyl nalezen u žádné z ostatních zkoumaných odrůd.

U testovaných izolátů byl dodatečnými analýzami zjišťován mimo jiné i obsah glykoalkaloidů a draslíku, aby byla komplexně ověřena jejich potenciální role v antifungálních testech, ta se však zdá být na základě dosažených výsledků zanedbatelnou.

## Recovery of thermo resistant potato proteins and their antifungal inhibition influence on *Fusarium* spp. mycelium growth

Andrea Vlačihová, Jan Bárta, Veronika Bártová, Gabriela Lochmanová, Pavlína Novotná, Hana Konečná, Zbyněk Zdráhal, Adéla Stupková

### **Abstract**

The contribution deals with the assessments of antifungal potential of thermo resistant proteins from six potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) David, Fabia, Marabel, Laura, Sibú and Westamyl. Chosen cultivars differ in market and maturity. Potato fruit juice Variant 80 was prepared with combination of pH adjustment and 80°C treatment (V80) and variant with pH adjustment only was prepared for control. Isolated proteins V80 were identified by LC-MS/MS as protease inhibitors. Protein isolates were applied to three phytopathogenic fungi strains *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*. The inhibition of mycelial growth was evaluated after 24 hours of growth at 26°C on digital photos by special software using the method of measuring the inhibition area. The greatest inhibition area (206.8 mm<sup>2</sup>) was achieved on *F. graminearum* cultivar Sibú V80 at concentration 10 mg/mL. The phytopathogenic fungi *F. graminearum* and *F. solani* were more sensitive to thermo resistant proteins in general.

Keywords: potato protease inhibitors, *Solanum tuberosum* L., antifungal activity, thermo resistant proteins, cultivar variability

### **Introduction**

Potato protease inhibitors (PI's) are major thermo resistant protein group which is very heterogeneous. PI's are well known for their rich biological properties and presumable important role in plant defense against pathogens and insects in various plant species [1; 2]. PI's are stored in vacuoles of potato tubers [3]. PI's are present not only in green parts of potato plant (leaves, stem) but also in generative and vegetative organs of potato plants and play important regulatory roles during plant development and tuber maturing [4]. The molecular weight of PI's is in range from 3 to 25 kDa and they are important part of tuber proteins which constitute about 50 % of the total soluble proteins in potato fruit juice (PFJ) [5]. The most important protease inhibitors are serine families of PI-1 (4.5 % of total protein) and PI-2 (22 % of total protein) [5] differing mainly in molecular weight which feature is used in the separation. PI-1 is a pentameric protein with molecular weight of each subunit 8 kDa and PI-2 is a dimeric protein with molecular weight of each subunit 22 kDa and is composed of dimers of four distinctly different protomers. PI-1 and PI-2 are characterized by trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin inhibition activity [6; 7].

There are various types of protease inhibitors isolation methods which are developed for industry protein capture. One of the most interesting biological attribute is the thermo resistance of protease inhibitors, but it is not discussed very often. The PI's maintained their stability even after heating at 120°C [8].

Antimicrobial activity of potato tuber proteins was studied on one potato cultivar in each study - Gogu [9] and Golden Valley [10]; cultivar Istrinskii [11] and cultivar Gogu Valley [12; 13]. Antimicrobial properties were described at some phytopathogenic fungi

strains: studied antimicrobial activity of potato inhibitor I (PI-1) against phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* [9] and positive antifungal effect of potato tuber proteins against *Fusarium solani* was described [14; 15].

The protein mixture from industrial PFJ is recovered by thermal coagulation and used as an animal protein feed supplement and thermo resistant protein will be retrieved from the liquid waste generated after thermo coagulation as a by-product.

The aim of this contribution was the reciprocal comparison of thermo stable proteins gained from PFJ of six potato tuber cultivars David, Fabia, Laura, Marabel, Sibü and Westamyl (*Solanum tuberosum* L.), the assessment of their influence on growth inhibition of selected *Fusarium* spp. phytopathogenic fungi strains and complemented by composition and properties characteristics.

## Materials and Methods

### Plant Material

Potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers of six cultivars (David, Fabia, Laura, Marabel, Sibü and Westamyl) were cultivated under defined conditions in 2012 in the small plot experiment at the experimental station in České Budějovice, Czech Republic (altitude 380 m). Cultivars David (early maturity), Fabia (early maturity), Sibü (late maturity) and Westamyl (medium-late maturity) are cultivated as starch production utility type and cultivars Laura (medium-early maturity) and Marabel (very early to early maturity) are processed potatoes.

**Preparation of Protein Concentrates.** From each cultivar potato tubers were performed on juice exactor (JE 4010, Catler, Kilkenny, Australia) and preserving agent (1% w/v Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>+Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) was added to prevent enzymatic reactions. PFJ's were centrifuged (4500 rpm, 4°C, 30 minutes) and filtrated (Filter paper for qualitative analysis, KA 1, Papírna Pernštejn, Czech Republic) to remove starch, fiber and other water insoluble components. The pH of PFJ's was adjusted by 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to 5 and PFJ's were divided into two variants. Control with pH adjustment only, and Variant 80 (V80) with pH adjustment and heat treatment at 80°C for 10 minutes in the water bath (SW 22, Julabo Labortechnik, Seelbade, Germany). Coagulated thermo labile proteins were removed by centrifugation (4500 rpm, 30 minutes) and filtration (Filter paper for qualitative analysis, KA 1, Papírna Pernštejn, Czech Republic) and the supernatant was dialyzed (3.5 K MWCO, Pierce Snake Skin Dialysis Tubing, Thermo Fisher Scientific, USA) for two times overnight and concentrated by freeze drying to constant dry matter (Alpha 1-4 LSC, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode am Harz, Germany).

### Material Identification

**Gel Electrophoresis.** Gained protein samples were analyzed on 1-D SDS polyacrylamide gel electrophoresis according to the optimized method [16] and they were stained by Coomassie Brilliant Blue (Thermo Scientific, USA). Tris-Tricine 2-D gels were prepared according to [17], strips BioRad (USA), staining by SyproRuby (Invitrogen, USA).

**LC-MS/MS.** Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis was performed with a reversed phase Easy-nano-LC (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) coupled online to an HCT Ultra PTM Discovery System ion-trap mass spectrometer (Bruker Daltonik, USA). Prior to LC separation, samples were desalted

and concentrated using a trapping column (100mm x 40 mm) filled with 3.5 mm X-Bridge sorbent C18 sorbent (Waters, Milford, USA). The sample volume was 10 mL.

**ECD Measurement.** The ECD spectra were measured in a quartz cuvette with an optical path length of 1 mm (Starna, USA) using a J-810 spectrometer (Jasco, Tokyo, Japan). The conditions of the measurements were: a spectral region of 185–200 nm, a scanning speed of 10 nm/min, a response time of 8 s, a resolution of 1 nm, a bandwidth of 1 nm and a sensitivity of 100 mdeg. The final spectrum was obtained as an average of 10 accumulations. The spectra were corrected for a baseline by subtracting the spectra of the corresponding peptide-free solution. The ECD measurements were conducted at 25°C. The concentration of peptide sample was 0.5 g/L in Mili-Q water. The final spectra are presented as the dependence of measured ECD signal in mdeg on the wavelength in nanometers.

**Nitrogen Content.** Total nitrogen compounds were determined on analyzer Flash EA 1112 (ThermoQuest, Rodano, Italy) and a factor 6.25 was used for the conversion of nitrogen to the total nitrogen content. Three 50 mg samples of dry protein sample were analyzed. Content of protein was determined according to the enclosed modified instructions of BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific, USA). Colorimetric detection of this reaction was measured using a spectrophotometer BioMate 5 (Thermo Electron Corporation, USA) at 562 nm within 10 minutes.

**Glycoalkaloid Content.** Contents of  $\alpha$ -solanin,  $\alpha$ -chaconin and total glycoalkaloids were determined on the UHPLC using an Acquity UltraPerformance LC system (Waters, USA) equipped with an HILIC Atlantis Silica column (100 x 3 mm I. D., 3  $\mu$ m particle size, Waters, USA) maintained at 30°C. The UHPLC system was connected to a 5500 QTRAP tandem mass spectrometer (AB Sciex, USA) equipped with a Turbo VTM ion source operated in positive mode [18].

**Saccharides Content.** The analysis of saccharides content was based on the principle of reducing saccharides reduced cuprous salt to cupric oxide in alkaline medium when boiling and unreacted excess of copper salt was determined by iodometric titration [19].

**Potassium Content** was determined according to the optimized method [20] by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (Intrepid II XSP Duo, Thermo Elemental, USA) after acid digestion of the sample mixture in HCl (ratio 6:1).

**Trypsin Inhibitor Assays.** Proteinase activities of isolated protein samples were measured by the hydrolysis of DL-BAPA for trypsin according to the optimized method as described in Pouvreau [5] in the presence or absence of inhibitor using a spectrophotometer BioMate 5 (Thermo Electron Corporation, USA) and materials were purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland).

#### **Antifungal Activities**

**Fungal strains.** Antifungal tests were performed on fungi strains *Fusarium graminearum* (CCM F-683), *Fusarium oxysporum* (CCM 17), *Fusarium solani* (CCM 1036) all purchased from Czech Collection of Microorganisms (Brno, Czech Republic). Fungal strains were grown at 25°C in incubator (Binder, Tuttlingen, Germany) on IsoSensitest Agar (Oxoid, USA). After mycelia colony have developed, holes in agar were cut 1 mm from the edge of the mycelium and 30  $\mu$ L of protein solution was added in holes in agar at concentrations 1, 5 or 10 mg/mL and sterile distilled water was used as a control solution (C) and the plates were incubated for 24 hours at 25°C and digital photos were taken.

**Data processing.** Statistical analyses were evaluated in software Statistica 12 (StatSoft, USA) using analysis of variance and the Fisher LSD test and differences among samples were considered as significant at  $P < 0.05$ . Image analysis was

performed in PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad, USA). Antifungal activity was reflected by mycelium growth inhibition, digital photos of plates were taken, inhibition areas were processed in software AutoCAD 2013 (Autodesk, USA).

## Results and Discussion

**SDS-PAGE Protein Identification.** Isolated proteins were analyzed on 1-D polyacrylamide gels (Figure 2), the control contained proteins identified as protease inhibitors (PI's) in areas near 3.5 kDa, 6.5 kDa, 14 kDa, 17 kDa and 26 kDa and patatin in area near 40 kDa that corresponds well with results in Bártová, Bárta [22]. Proteins detected on 1-D polyacrylamide gels V80 were identified as PI's in areas near 6.5 kDa and 14 kDa that corresponds well with Pouvreau [5]. Patatin bands were not detected because of removing the thermo labile proteins after 80°C thermo coagulation and patatin shows stability of the complex only up to the temperature 28°C [21, 22].

**Quantitative Analysis.** Quantitative analysis of the proteins V80 on 2-D Tris-Tricine Gels (Figure 2) showed that PI-2 were in the majority of the PI-1, average spot intensity (density) ratio sums PI-2/PI-1 from 1.2 at cultivars Sibü and Marabel to 2.1 cultivar Laura, (Table 3). Proteins of higher density are represented at higher levels and they may cause a stronger effect (relative to their specific function). It is also important representation of specific proteins, and their combinations.

**LC-MS/MS.** SDS-PAGE protein identification results were confirmed by LC-MS/MS and isolated proteins were identified as PI-1, PI-2 and PCI of various pH and pI (Figure 2 and Table 3).

**ECD spectra** measured for David, Fabia, Laura, Marabel, Sibü and Westamyl samples isolated at 0 and 80°C are shown in Figure 3. All samples isolated at the same temperature showed similar spectral shapes. The spectra for samples isolated at 0°C had two negative maxima localized at 207 and 221 nm and one positive maximum localized at 190 nm. The spectra for samples isolated at 80°C had one negative maximum localized at 199 nm. This spectra were similar to that described in Sun et al. [23] but differ slightly from that described in van Koningsveld [24].

The spectral pattern observed for samples isolated at 0°C (control) is typical for polypeptides with considerably high content of the  $\alpha$ -helical conformation while the spectra measured for samples isolated at 80°C showed spectral pattern typical for disordered random coil structure. This observation suggests that the secondary structure of the polypeptides was irreversibly denatured by increased temperatures.

**Chemical Composition of Potato Protein Isolates.** Protein isolate main chemical composition was analyzed (Table 1). Average content of total **nitrogen** compounds in V80 (56.4 %) was significantly lower than in control (77.4 %) and these data are higher than figures in van Koningsveld [24] which could be caused by the fact that we used for the experiment freshly prepared PFJ on kitchen juicer and the potential of protein denaturation was minimal when compared to industrial PFJ [24]. Content of **protein** show statistically significant difference of 19 % in V80 than in control (average V80 489  $\mu\text{g/mL}$  versus control 396  $\mu\text{g/mL}$ ), this result may be the reason of stronger inhibition effect caused by V80 than control and also the highest protein content observed at cultivar Sibü had the greatest inhibition effect on all tree tested fungi strains from all cultivars.

Content of **saccharides** was very variable among each cultivar in control and the value decreased after heat treatment in V80 only at cultivars David, Sibü and Westamyl, which are cultivars for starch production. These figures are in average higher in control than those in Sun et al. [23] that they use industrial PFJ.



Average **total glycoalkaloids** content in both variants do not show any statistically significant difference. Average content of  $\alpha$ -solanin and  $\alpha$ -chaconin show significantly higher values in V80 than in control. Glycoalkaloids content in V80 may play an important role in the inhibition effect in antifungal tests, but cultivar Sibü, which show the best inhibition effect at two fungi strains, does not content the highest amount of total glycoalkaloids (Sibü 501.4 mg/kg versus maximum at Westamyl 507.7 mg/kg) nor the  **$\alpha$ -solanin** (Sibü 286 mg/kg versus maximum at Marabel 460 mg/kg) and  **$\alpha$ -chaconin** (Sibü 242 mg/kg versus Laura 424 mg/kg). Similar data of glycoalkaloid concentrations are shown in Driedger and Sporns [25] where dialysis of the materials was not performed but in comparison with the results in Bártová, Bárta [26] glycoalkaloid concentrations in control and V80 are significantly lower. Glycoalkaloids are present in range from 30 to 120 mg/kg in potatoes [18] and limit of total glycoalkaloids content in potato protein isolates for food is 150 mg/kg [27] which is more than three times lower content than observed in Sibü V80 sample.

Content of **potassium** was significantly different when comparing both variants means (control 0.415 % versus V80 1.54 %). The highest content of potassium in control was 0.65 % in cultivar Sibü and 2.79 % in V80 cultivar David. Control data are lower when comparing to Bártová, Bárta, [24] and also lower than van Koningsveld [24] which could be caused by removing the potassium by proper dialyzing of the samples. But V80 contained more potassium with the lowest increase at cultivar Sibü (0.9 %) which should be caused by concentration and binding of potassium ions to some of the components during heat treatment.

The results of **antifungal inhibition tests** (Figure 1, Table 2) were focused on cultivar Sibü, V80, concentration 10 mg/mL because it showed the greatest inhibition area at two fungi strains *Fusarium graminearum* (206.8 mm<sup>2</sup>) and *Fusarium solani* (181.93 mm<sup>2</sup>). Cultivar Sibü showed the biggest intensity of PI-1 (OD 266379) spots on 2-D gels (Table 3) and also contained the highest amount of protein (703  $\mu$ g/mL) and the lowest amount of saccharides from all six cultivars, variants (<0.1 %) In general content of total alkaloids was very similar in both control and V80. The most sensitive fungi strain to tested protein mixture was *Fusarium graminearum*, second was *Fusarium solani* and control cultivar David did not show any inhibition effect at all three fungi strains.

The **intensity of PI spots** was higher at PI-2 in all cultivars; in cultivar David were the spots of PI-2 the most intensive. Unique protein identified according to the databases as PI-1 (molecular weight 11.97 kDa and pI 4.96) was detected at cultivar Sibü only on LC/MS-MS and it was not found in other cultivars at all (Figure 2).

Isolated proteins in V0 showed lower data (Table 2) at all cultivars for half maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) that could be explained by presence of high amounts of not destructed serine protease inhibitors before the thermo coagulation with serine inhibition activity.

## Correlation

Correlation analysis of total nitrogen and inhibition area values of *F. graminearum* and *F. oxysporum* show close functional dependence (0.78 and 0.88, P<0.05) between these characteristics and content of protein and inhibition area values of *F. graminearum*, *F. oxysporum* and *F. solani* show close functional dependence (0.87; 0.94 and 0.82, P<0.05) also. Correlation of total nitrogen content with inhibition areas of *F. solani* show the independence between these figures (0.38, P<0.05). However

close functional dependence of total glycoalkaloids content and *F. graminearum*, *F. oxysporum* and *F. solani* was shown (0.73; 0.89 and 0.59,  $P < 0.05$ ) results of antifungal tests and content of total glycoalkaloids at cultivar Sibuh V80 tends to opposite trend. Correlation of PI-1 and total nitrogen content show close functional dependence (0.78,  $P < 0.05$ ). Functional dependence between PI-2 and total nitrogen content was not proved (0.2,  $P < 0.05$ ) and correlation of PI-1 and PI-2 with protein was not proved (0.55 and 0.39,  $P < 0.05$ ).

Considering that there are remarkable differences between the six examined cultivars it would be very interesting to compare more cultivars reciprocally to research which cultivars have the biggest potential for protease inhibitors production with great inhibition effect against more fungi strains.

## References

- 1 Tuzun S., Somanchi A. (2006): The possible role of PR proteins in multigenic and induced systemic resistance. From: Tuzun S., Bent E. (Eds.), Multigenic and induced systemic resistance in plants, Springer, New York, 112–142.
- 2 van Loon L. C., van Strien E. A. (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins *Physiol Mol Plant Pathol*, 55: 85–97.
- 3 Jørgensen M., Stensballe A., Welinder K. G. (2011): Extensive post-translational processing of potato tuber storage proteins and vacuolar targeting. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 21: 4070-4087.
- 4 de Leo F., Volpicella M., Licciulli F., Liuni S., Gallerani R., Ceci L. R. (2002): Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*, 30: 347–348
- 5 Pouvreau L. (2004): Occurrence and physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tuber (*Solanum tuberosum* L.). Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 157.
- 6 Birk Y. (2003): Plant protease inhibitors: significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering. Springer, Berlin, Germany, 170.
- 7 Mellville J. C., Ryan C. A. (1972): Chymotrypsin inhibitor I from potatoes: Large scale preparation and characterization of its subunit components. *Journal of Biological Chemistry*, 247: 3443-3453.
- 8 Knorr D., Kohler G. O., Betschart A. A. (1977): Potato protein concentrates: The influence of various methods of recovery upon yield, compositional and functional characteristics. *Journal of Food Technology*, 12: 263-580.
- 9 Kim J.-Y., Park S.-C., Kim M.-H., Lim H.-T., Park Y., Hahm K.-S. (2005): Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330: 921-927.
- 10 Kim M.-H., Park S.-C., Kim J.-Y., Lee S. Y., Lim H.-T., Cheong H., Hahm K.-S., Park Y. (2006): Purification and characterization of a heat-stable serine protease

- inhibitor from the tubers of new potato cultivar "Golden Valley". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346: 681-686.
- 11 Speranskaya A. S., Krinitsina A. A., Revina T. A., Gerasimova N. G., Keruchenko Y. A. S., Shevelev A. B., Valueva T. A. (2006): Heterologous expression, purification, and properties of a potato protein inhibitor of serine proteinases. *Biochemistry, Moscow*, 11: 1176-1182.
  - 12 Jin Z., Shinde P. L., Yang Y. X., Choi J. Y., Yoon S. Y., Hahn T.-W., Lim H. T., Park Y. K., Hahm K. S., Joo J. W., Chae P. J. (2009): Use Of Refined Potato (*Solanum Tuberosum* L. Cv. Gogu Valley) Protein As An Alternative To Antibiotics In Weanling Pigs. *Livestock Science*, 124: 26-32.
  - 13 Ohh S. H., Shinde P. L., Jin Z., Choi J. Y., Hahn T.-W., Lim H. T., Kim G. Y., Park Y., Hahm K.-S., Chae B. J. (2009): Potato (*Solanum Tuberosum* L. Cv. Gogu Valley) Protein as an antimicrobial agent in the diets of broilers. *Poultry Science*, 88: 1227-1234.
  - 14 Mendieta J. R., Pagano M. R., Muñoz F. F., Daleo G. R., Guevara M. G. (2006): Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology*, 1052: 2039-2047.
  - 15 Selitrennikoff C. P (2001): Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 288-2894.
  - 16 Judd R. C. (2002): SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of peptides. From: Walker J. M. (Ed.) *The protein protocols handbook*, 2<sup>nd</sup> edition. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 1146.
  - 17 Konečná H., Fridrichová D., Lochmanová G., Bárta J., Zdráhal Z. (2013): Preventing the mixed-detergent-micelle effect in two-dimensional electrophoresis on tris-tricine gels. *Electrophoresis*, 13: 1969–1971.
  - 18 Krtková V., Schulzová V., Novotná H., Dvořák P., Hajšlová J. (2011): Quality of potatoes from different farming systems. 3<sup>rd</sup> Scientific Conference, New findings in organic farming research and their possible use for Central and Eastern Europe, Prague, Czech Republic, 85-89.
  - 19 Davídek J. (1977): *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Státní nakladatelství technické literatury, Praha, Czech Republic, 240.
  - 20 Zbiral J., (2005): *Jednotné pracovní postupy – Analýza rostlinného materiálu*. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2<sup>nd</sup> edition. Brno, Czech Republic, 192.
  - 21 Pots A. M., Jongh H. H. J., Gruppen H., Hamer R. J., Voragen A. G. J. (1998): Heat-induced conformational changes of patatin, the major potato tuber protein. *European Journal of Biochemistry*, 1: 66-72.

- 22** BártoVá V., Bárta J. (2008) Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice. *Research in Agricultural Engineering*, 4: 170-175.
- 23** Sun Y., Liu L., Jiang L.-Z., Zhang G.-F., Li G.-M., Wu N. (2013): Preparation , identification, structure, and in vitro anti-obesity effects of protease inhibitors isolated from potato fruit juice. *European Food Research Technology*, 237: 149-157.
- 24** van Koningsveld G. (2001): Physico-chemical and functional properties of potato proteins. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 150.
- 25** Driedger D. R., Sporns P. (1999): Glycoalkaloid concentration in by-products of potato starch extraction as measured by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of Food Processing Preservation*, 23: 377-390.
- 26** BártoVá V., Bárta J. (2009): Chemical Composition and Nutritional Value of Protein Concentrates Isolated from Potato (*Solanum tuberosum* L.) Fruit Juice by Precipitation with Ethanol or Ferric Chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 9028-9034.
- 27** Byrne D. (2002): Commission decision of 15 February 2002 authorizing the placing on the market of coagulated potato proteins and hydrolysates thereof as novel food ingredients under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Communities*, L 50/ 92.

Table 1 Protein isolate identification

Cultivar	Variant	Content of				
		Total Nitrogen Compounds [%]	Protein [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Saccharides [%]	Glycoalkaloids [mg/kg]	Potassium [%]
David	Control	78.5	382	5.93	517.6	0.52
Fabia	Control	75.5	379	0.99	520.6	0.53
Laura	Control	74.8	382	1.68	515.3	0.24
Marabel	Control	77.0	414	5.99	509.8	0.26
Sibu	Control	81.3	411	2.38	511.4	0.65
Westamyl	Control	77.3	407	4.09	509.1	0.29
<i>Mean</i>	Control	<i>77.4</i>	<i>396</i>	<i>3.51</i>	<i>514</i>	<i>0.415</i>
David	V80	55.5	489	1.02	505.7	2.79
Fabia	V80	56.6	504	2.39	504.7	2.24
Laura	V80	51.3	475	6.57	501.6	2.6
Marabel	V80	49.7	471	10.0	501.7	1.45
Sibu	V80	61.6	508	<0.1	501.4	0.9
Westamyl	V80	63.9	489	1.46	507.7	1.26
<i>Mean</i>	V80	<i>56.4</i>	<i>489</i>	<i>3.59</i>	<i>504</i>	<i>1.54</i>

Table 2 Inhibition areas of ATF tests (Figure 2) and Trypsin protease inhibition.

Cultivar	Variant	Area [mm <sup>2</sup> ]			Serine protease inhibitors EC <sub>50</sub>
		<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	Concentration [mg/mL]
David	Control				0.25
Fabia	Control	81.62 <sup>def</sup>			0.25
Laura	Control	69.23 <sup>de</sup>			0.25
Marabel	Control	100.7 <sup>fghi</sup>	40.80 <sup>abc</sup>	69.62 <sup>de</sup>	0.251
Sibu	Control	66.60 <sup>cd</sup>	21.49 <sup>a</sup>		0.251
Westamyl	Control	63.98 <sup>bcd</sup>			0.251
David	V80	191.10 <sup>pq</sup>	101.80 <sup>fghi</sup>	126.2 <sup>ijkl</sup>	0.258
Fabia	V80	116.46 <sup>hij</sup>	95.82 <sup>efgh</sup>	38.61 <sup>ab</sup>	0.252
Laura	V80	153.03 <sup>lmn</sup>	119.82 <sup>hijk</sup>	147.61 <sup>klmn</sup>	0.257
Marabel	V80	158.49 <sup>mno</sup>	84.53 <sup>defg</sup>	164.60 <sup>mnop</sup>	0.251
Sibu	V80	206.8 <sup>q</sup>	110.87 <sup>ghii</sup>	181.93 <sup>opq</sup>	0.252
Westamyl	V80	170.96 <sup>nop</sup>	78.45 <sup>def</sup>	141.37 <sup>jklm</sup>	1.276
		1378,97	653,58	869,94	

Statistics ANOVA (Within column values by the same letter are not significantly different at  $P < 0.05$  (Fisher LSD test), the letters are given in alphabetical order with the increasing level of a parameter. Empty columns show that no inhibition effect was observed. EC<sub>50</sub> is the half maximal effective concentration; it represents the concentration of tested protein isolate where 50% of its maximal effect is observed.

Table 3 Quantitative analysis differentially expressed proteins by 2D ELFO (Figure 2) and identification confirmation according to MS and PDQest.

\*Significant change was more than double spot intensity difference, Student's t-test,  $P < 0.05$

Cultivar	Intensity of PI-1	Intensity of PI-2	Average Ratio Sum PI-2 / PI-1 (Variability) *
David	215531	377888	1.8 (0.2)
Fabia	200060	345353	1.7 (0.1)
Laura	168231	346134	2.1 (0.3)
Marabel	214124	257216	1.2 (0.2)
Sibu	266379	323016	1.2 (0.2)
Westamyl	247754	316197	1.3 (0.1)

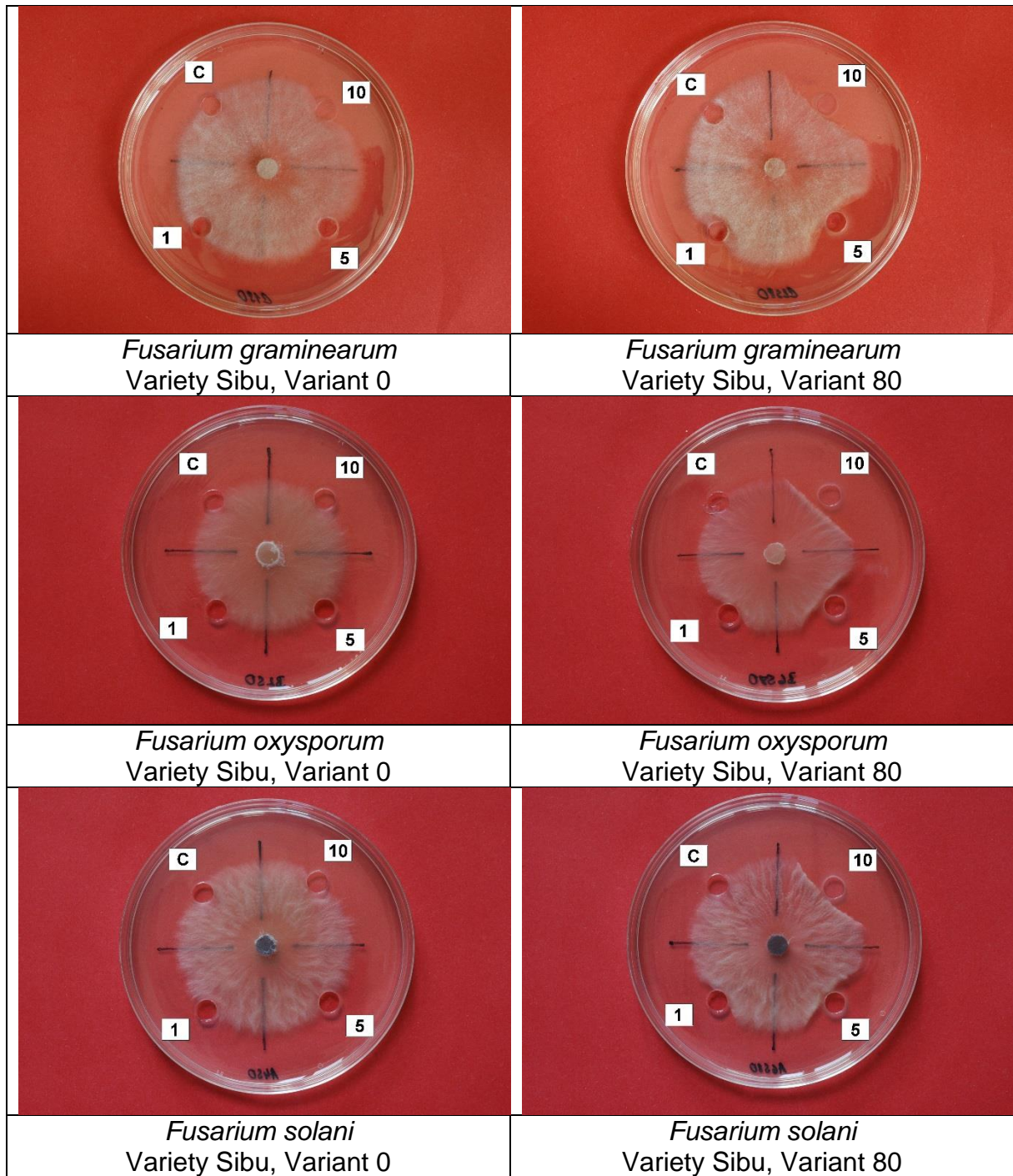
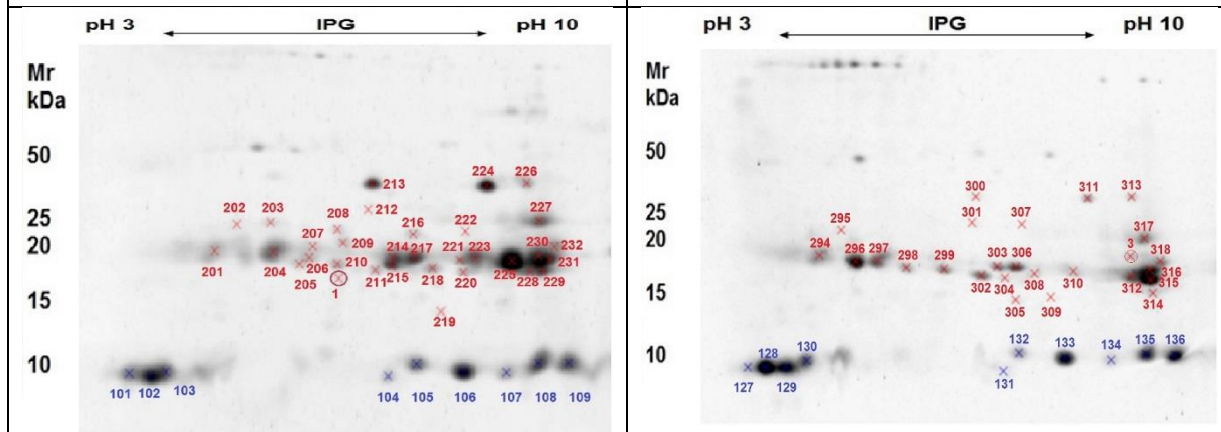


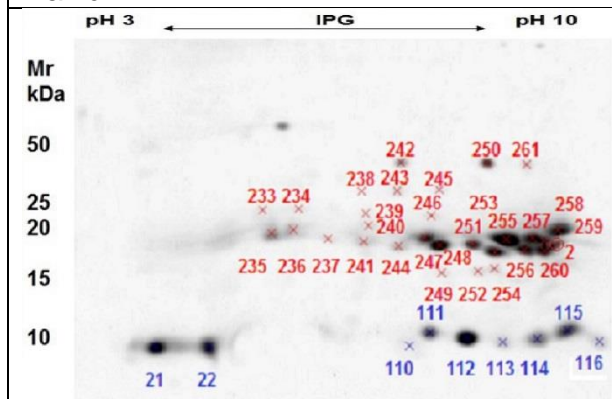
Figure 1 Antifungal tests.

kDa													Dat	Mas	pl	Prot	Score	Dat
													aba	s		ein		aba
												se	[Da]		Na		se	
												No.			me		No.	
												†					†	
												1	no					
												2	resu					
												3	lt					
												4	391	1649	6.7	PCI-1	209	
												5*	559	4				
												6	0					
												7**	707	1189	4.91	PI-1	172	
													795	0			8	
													35					
													707	1197	5.0	PI-1	92	
													795	0				
													27					
													225	1213	5.4	PI-1	255	
													840	8				
													391	1649	6.7	PCI-1	185	
													559	4				
													0					

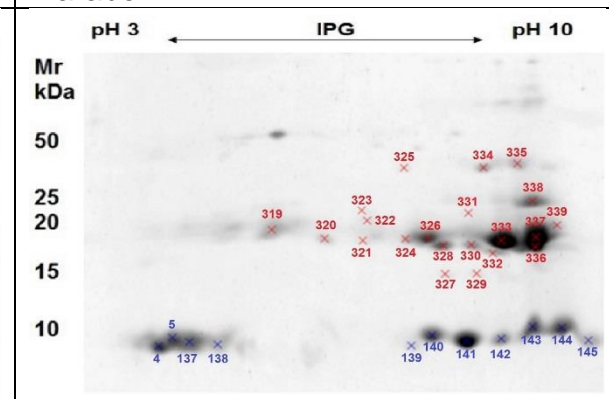
### 1 D ELFO



### David



### Marabel



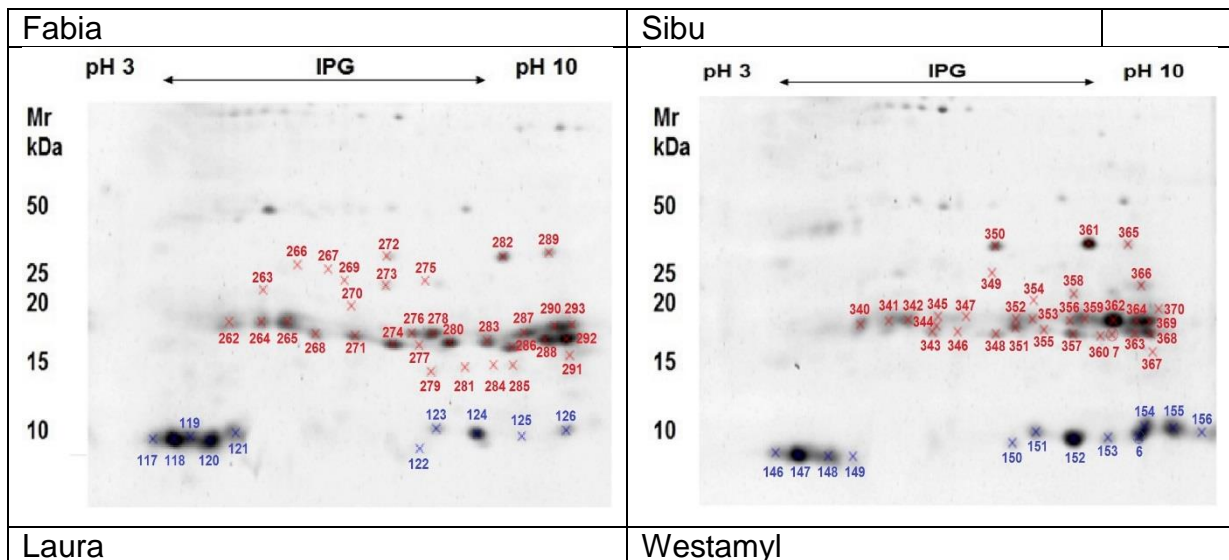


Figure 2 Protein identification on 1D and 2D SDS-PAGE, Unique protein LC-MS/MS analysis. (\* only one significant peptide identification; \*\*not significant identification, 4 peptides with score  $\geq 55$ ) † green plants database.

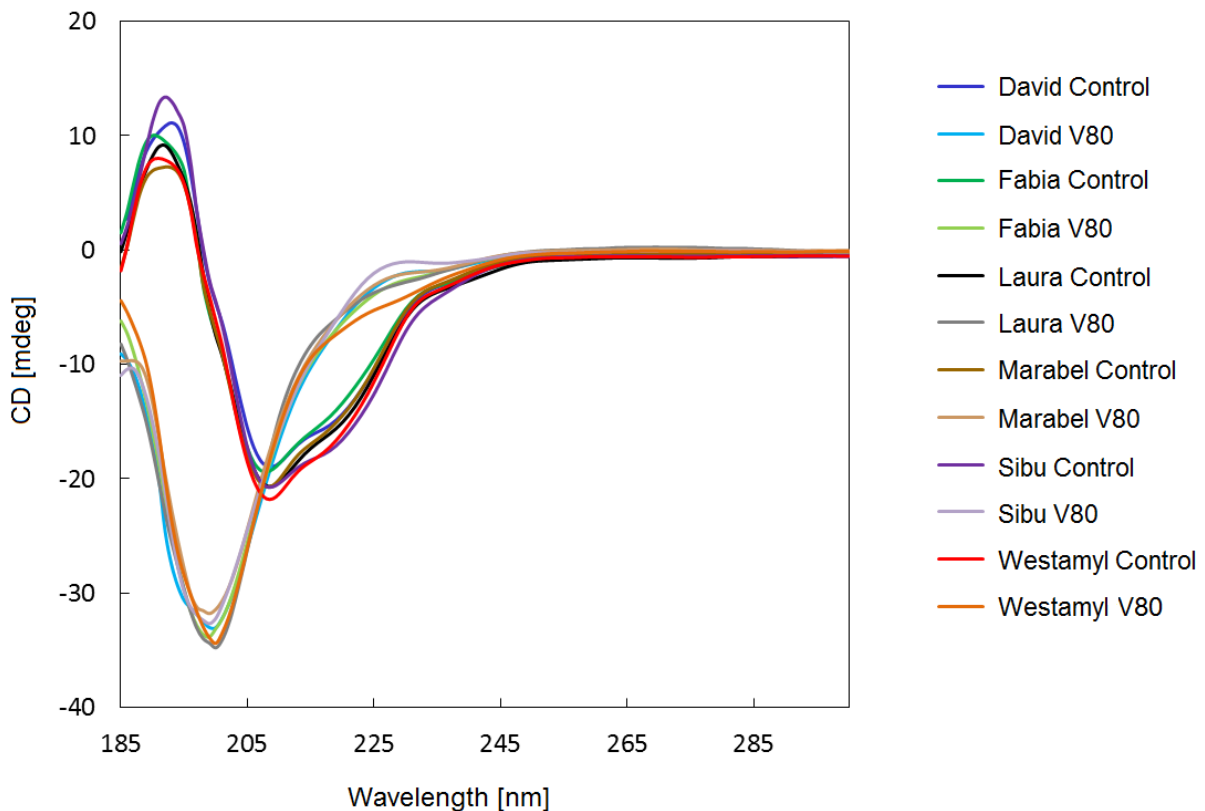


Figure 3 The ECD spectra obtained for the David, Fabia, Laura, Marabel, Sibu and Westamyl samples isolated at 0°C (control) and 80°C (V80).



Table 4 MS identification of the proteins in cultivars Fabia and Sibü.

<b>Fabia</b>	PI-1	Protein access No.	Name of the protein	Protein mass	Protein pl
5101	110	gi 70779535	proteinase inhibitor 1 PPI3A4 [Solanum tuberosum]	11890	33329
3201	111	<b>gi 169491</b>	<b>proteinase inhibitor I [Solanum tuberosum]</b>	<b>12170</b>	<b>15097</b>
4201	112	gi 21528	proteinase inhibitor I [Solanum tuberosum]	12140	15097
6101	113	gi 73920933	proteinase inhibitor I precursor [Solanum tuberosum]	11810	23132
9201	114	<b>gi 169542</b>	<b>proteinase inhibitor I, partial [Solanum tuberosum]</b>	<b>12067</b>	<b>42125</b>
9201	114	gi 225840	proteinase inhibitor I	12138	15462
9201	114	gi 169491	proteinase inhibitor I [Solanum tuberosum]	12170	15097
9203	115	<b>gi 225840</b>	<b>proteinase inhibitor I</b>	<b>12138</b>	<b>15462</b>
9101	116	<b>gi 225840</b>	<b>proteinase inhibitor I</b>	<b>12138</b>	<b>15462</b>
	PI-2				
1801	233				
2806	234				
1701	235	<b>gi 29650887</b>	<b>proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]</b>	<b>16630</b>	<b>41553</b>
1701	235	<b>gi 334898813</b>	<b>proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]</b>	<b>16690</b>	<b>25324</b>
2801	236	<b>gi 350539721</b>	<b>constitutive plastid-lipid associated protein [Solanum lycopersicum]</b>	<b>19771</b>	<b>29799</b>
2801	236	<b>gi 29650887</b>	<b>proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]</b>	<b>16630</b>	<b>41553</b>
2801	236	<b>gi 334898813</b>	<b>proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]</b>	<b>16690</b>	<b>25324</b>
2602	237	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
2602	237	gi 334898813	proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]	16690	25324
2805	238				
2804	239				
2803	240				
2601	241	<b>gi 29650887</b>	<b>proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]</b>	<b>16630</b>	<b>41553</b>
3901	242				
2802	243				
3501	244	<b>gi 29650887</b>	<b>proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]</b>	<b>16630</b>	<b>41553</b>
3501	244	<b>gi 334898813</b>	<b>proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]</b>	<b>16690</b>	<b>25324</b>
4801	245				
6702	246				
3701	247	<b>gi 29650887</b>	<b>proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]</b>	<b>16630</b>	<b>41553</b>
3701	247	<b>gi 334898813</b>	<b>proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]</b>	<b>16690</b>	<b>25324</b>

4501	248	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
4501	248	gi 334898813	proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]	16690	25324
4301	249				
5901	250				
4502	251	gi 334898811	proteinase inhibitor II precursor type A-b [Solanum tuberosum]	16620	46905
4502	251	gi 829292	unnamed protein product [Solanum tuberosum]	13486	17715
4502	251	gi 3915590	RecName: Full=Proteinase inhibitor type-2 K		
4203	252				
6302	253	gi 21522	proteinase inhibitor II [Solanum tuberosum]	16649	28277
6302	253	gi 829292	unnamed protein product [Solanum tuberosum]	13486	17715
6302	253	gi 3913934	RecName: Full=Proteinase inhibitor type-2 P303.51		
6302	253	gi 3915590	RecName: Full=Proteinase inhibitor type-2 K		
6302	253	gi 73920931	proteinase inhibitor II precursor [Solanum tuberosum]	13951	46539
6302	253	gi 73920935	proteinase inhibitor II precursor [Solanum tuberosum]	16630	14763
6302	253	gi 334898811	proteinase inhibitor II precursor type A-b [Solanum tuberosum]	16620	46905
6302	253	gi 334898815	proteinase inhibitor II precursor type C-b [Solanum tuberosum]	16086	14366
6302	253	gi 125053	RecName: Full=Wound-induced proteinase inhibitor 2		
6302	253	gi 3913936	RecName: Full=Proteinase inhibitor type-2 CM7		
6302	253	gi 387604159	proteinase inhibitor II [Solanum lycopersicum]	16586	34516
6302	253	gi 387604161	proteinase inhibitor II [Solanum lycopersicum]	16296	12236
6301	254				
7601	255	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
7601	255	gi 334898813	proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]	16690	25324
7401	256	gi 334898811	proteinase inhibitor II precursor type A-b [Solanum tuberosum]	16620	46905
7401	256	gi 829292	unnamed protein product [Solanum tuberosum]	13486	17715
8701	257	gi 3915590	RecName: Full=Proteinase inhibitor type-2 K		
8701	257	gi 829292	unnamed protein product [Solanum tuberosum]	13486	17715
8701	257	gi 334898811	proteinase inhibitor II precursor type A-b [Solanum tuberosum]	16620	46905
6501	258				
9801	259	gi 125053	RecName: Full=Wound-induced proteinase inhibitor 2		
9801	259	gi 3913936	RecName: Full=Proteinase inhibitor type-2 CM7		
9801	259	gi 3915590	RecName: Full=Proteinase inhibitor type-2 K		
9801	259	gi 334898815	proteinase inhibitor II precursor type C-b [Solanum tuberosum]	16086	14366
9801	259	gi 387604159	proteinase inhibitor II [Solanum lycopersicum]	16586	34516
9801	259	gi 387604161	proteinase inhibitor II [Solanum lycopersicum]	16296	12236

9301	260	gi 350538353	pathogenesis-related protein P2 precursor [Solanum lycopersicum]	16016	19572
8801	261				
	Unique				
9501	2	gi 3915590	RecName: Full=Proteinase inhibitor type-2 K	16494	24624
0001	21	gi 70779535	proteinase inhibitor 1 PPI3A4 [Solanum tuberosum]	11890	33329
1001	22	gi 70779535	proteinase inhibitor 1 PPI3A4 [Solanum tuberosum]	11890	33329
<b>Sibu</b>	PI-1				
0001	137				
0002	138	gi 70779535	proteinase inhibitor 1 PPI3A4 [Solanum tuberosum]	11890	33329
5101	139	gi 70779535	proteinase inhibitor 1 PPI3A4 [Solanum tuberosum]	11890	33329
3201	140	gi 169491	proteinase inhibitor I [Solanum tuberosum]	12170	15097
4201	141	gi 73920933	proteinase inhibitor I precursor [Solanum tuberosum]	11810	23132
6101	142	gi 73920933	proteinase inhibitor I precursor [Solanum tuberosum]	11810	23132
9201	143	gi 169542	proteinase inhibitor I, partial [Solanum tuberosum]	12067	42125
9201	143	gi 169491	proteinase inhibitor I [Solanum tuberosum]	12170	15097
9203	144	gi 225840	proteinase inhibitor I	12138	15462
9101	145	gi 124130	RecName: Full=Wound-induced proteinase inhibitor 1		
9101	145	gi 169493	proteinase inhibitor I [Solanum tuberosum]	12121	30072
9101	145	gi 225840	proteinase inhibitor I	12138	15462
	PI-2				
3801	319				
2602	320	gi 460386864	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101262518 [Solanum lycopersicum]	18213	34851
2602	320	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
2602	320	gi 334898813	proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]	16690	25324
2602	320	gi 21522	proteinase inhibitor II [Solanum tuberosum]	16649	28277
2601	321	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
2601	321	gi 334898813	proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]	16690	25324
2803	322				
2864	323				
3702	324	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
3702	324	gi 334898813	proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]	16690	25324
3901	325				

3701	326	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
4301	327				
4501	328	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
4501	328	gi 334898813	proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]	16690	25324
4203	329				
4502	330	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
4502	330	gi 334898813	proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]	16690	25324
5601	331				
6302	332	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
6302	332	gi 334898813	proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]	16690	25324
7601	333	gi 29650887	proteinase inhibitor II protein [Solanum phureja]	16630	41553
7601	333	gi 334898813	proteinase inhibitor II precursor type B [Solanum tuberosum]	16690	25324
5901	334				
8801	335				
9301	336	gi 413968466	pathogenesis-related protein P2 [Solanum tuberosum]	15893	19572
9301	336	gi 21522	proteinase inhibitor II [Solanum tuberosum]	16649	28277
8501	337	gi 334898811	proteinase inhibitor II precursor type A-b [Solanum tuberosum]	16620	46905
8501	337	gi 829292	unnamed protein product [Solanum tuberosum]	13486	17715
9802	338	gi 73920907	proteinase inhibitor II precursor [Solanum tuberosum]	16717	30498
9801	339	gi 3913934	RecName: Full=Proteinase inhibitor type-2 P303.51	16649	14062
9801	339	gi 73920907	proteinase inhibitor II precursor [Solanum tuberosum]	16717	30498
9801	339	gi 21522	proteinase inhibitor II [Solanum tuberosum]	16649	28277
9801	339	gi 40036964	proteinase inhibitor 2b precursor [Solanum nigrum]	16421	41613
9801	339	gi 58373382	proteinase inhibitor IIb [Solanum americanum]	8674	28642
9801	339	gi 110006247	proteinase inhibitor IIb [Solanum americanum]	16402	35886
	Unique				
0004	4	gi 70779535	proteinase inhibitor 1 PPI3A4 [Solanum tuberosum]	11890	33329
0005	5	gi 70779527	proteinase inhibitor 1 PPI3B2 [Solanum tuberosum]	11970	35156

## Abbreviations

D0	Cultivar David Control
D80	Cultivar David Treated at 80°C
DL-BAPA	Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide
ECD	Electronic Circular Dichroism
F0	Cultivar Fabia Control
F80	Cultivar Fabia Treated at 80°C
L0	Cultivar Laura Control
L80	Cultivar Laura Treated at 80°C
M0	Cultivar Marabel Control
M80	Cultivar Marabel Treated at 80°C
MM	Molecular Mass
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
PM	Protein Marker
PI(s)	Protease Inhibitor(s)
PI-1	Potato Inhibitor I
PI-2	Potato Inhibitor II
PCI-1	Potato Carboxypeptidase A Inhibitor
PFJ	Potato Fruit Juice
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
S0	Cultivar Sibü Control
S80	Cultivar Sibü Treated at 80°C
V80	Variant 80, thermally treated potato fruit juice
W0	Cultivar Westamyl Control
W80	Cultivar Westamyl Treated at 80°C

## 5. Závěr

Stěžejními publikovanými pracemi této předkládané disertační práce jsou práce zabývající metodami získávání skupiny termostabilních bílkovin z hlízové šťávy z průmyslových a konzumních odrůd bramboru hlíznatého s různou délkou vegetační doby a hodnocením antifungálních aktivit těchto skupin bílkovin, u kterých byl zjištěn rozdíl v působení antimikrobiálních bílkovin na vybrané fytopatogenní kmeny hub. Inhibiční účinky (velikost inhibiční plochy) byly sledovány u všech šesti testovaných tepelně zpracovaných odrůd (David, Fabia, Laura, Marabel, Sibů a Westamyl; koncentrace testované bílkovinné frakce 10 mg/ml), z nichž největší inhibiční účinek vykazovala odrůda Sibů, polopozdní až pozdní odrůda používaná pro výrobu škrobu, (206,80 mm<sup>2</sup>, *Fusarium graminearum*; 181,93 mm<sup>2</sup> *Fusarium solani*; 110,87 mm<sup>2</sup> *Fusarium oxysporum*). Druhou nejúčinnější odrůdou byla poloraná odrůda David taktéž používaná pro produkci škrobu, která ovlivnila růst všech tří zkoušených fytopatogenních hub (191,10 mm<sup>2</sup> *F. graminearum*; 126,20 mm<sup>2</sup> *F. solani*; 101,80 mm<sup>2</sup> *F. oxysporum*). Tento účinek testované z odrůdy Sibů je s největší pravděpodobností spojen s vysokým obsahem celkových dusíkatých látek a specifickým zastoupením antifungálních forem inhibitorů PI-1 a PI-2 obsažených v testovaném vzorku. LC-MS/MS analýzou vybraných spotů každé z šesti odrůd (David, Fabia, Laura, Marabel, Sibů a Westamyl, varianta 80) bylo zjištěno, že v testovaných vzorcích se převážně vyskytovaly inhibitory proteas I (PI-1), inhibitory proteas II (PI-2) a karboxypeptidázový inhibitor (PCI). Při analýze detekovaných jedinečných spotů na 2D SDS-PAGE byla u odrůdy Sibů, která prokázala ze všech testovaných odrůd největší antifungální účinek, zjištěna největší intenzita spotů identifikovaných jako PI-1, což by mohlo předznamenat jistou spojitost s jejím největším antifungálním účinkem.

Na základě těchto výsledků je proto možné potvrdit hypotézu o vzájemných rozdílech mezi antimikrobiálními aktivitami skupin bílkovin a peptidů získaných z různých odrůd brambor.

Další hypotézou, která byla potvrzena v publikacích přiložených k této disertační práci, byla různá míra působení testovaných látek (koncentrace testované frakce 10 mg/ml) na vybrané druhy mikrobiálních patogenů, kdy byly jako nejcitlivější testované patogeny vyhodnoceny mikrobiální houby *F. graminearum* (největší inhibiční zóna při působení tepelně zpracované bílkovinné frakce odrůdy Sibů 206,80 mm<sup>2</sup>) a *F. solani* (největší inhibiční zóna při působení tepelně zpracované bílkovinné frakce odrůdy Sibů 181,93 mm<sup>2</sup>), kdežto nejmenší vliv na inhibici mycelia (velikost inhibiční zóny) byl v publikovaných pracích shledán u patogenu *Alternaria solani* (největší inhibiční zóna při působení tepelně zpracované bílkovinné frakce odrůdy Westamyl 8,50 mm<sup>2</sup>).

V antifungálních testech se ukázaly jako nejméně účinné testované tepelně nezpracované frakce bílkovin (koncentrace testované bílkovinné frakce 10 mg/ml) izolované z odrůd David (nulová účinnost na růst *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. solani*), raných odrůd Fabia (výroba škrobu) a Marabel (konzumní odrůda) a Westamyl, všechny tři s nulovou účinností na růst mycelia u *F. solani* a *F. oxysporum*. Při rozšíření testů na větší množství odrůd s různou vegetační dobou a užitkovým směrem se neprokázalo, že by byla přítomnost skupiny antimikrobiálních bílkovin – inhibitorů proteas – vázána na vegetační dobu či na užitkový směr odrůdy. Nicméně tuto domněnku by bylo potřeba podložit dalšími údaji z testů na větším množství různých odrůd.

Při vzájemném porovnání skupiny bílkovin a peptidů v podobě tepelně zpracované a tepelně nezpracované frakce bílkovin byla potvrzena hypotéza zabývající se antimikrobiální aktivitou izolovaných skupin bílkovin a peptidů, které se liší v závislosti na použité metodě izolace a následném způsobu modifikace izolovaných bílkovin a peptidů.

U testovaných izolátů byl dodatečnými analýzami zjišťován mimo jiné i obsah glykoalkaloidů a draslíku, aby byla ověřena jejich potenciální role v antifungálních testech. Celkový obsah glykoalkaloidů byl v průměru o 10 mg/kg nižší u tepelně zpracovaných variant než u varianty tepelně nezpracované, která měla v antifungálních testech minimální nebo nulový vliv na růst mycelia. Na základě tohoto zjištění a porovnání výsledků u jednotlivých variant může být významný vliv glykoalkaloidů při testování frakcí termostabilních vyloučen, i když množství zjištěná ve vzorcích se dle dostupných informací pohybují nad hladinou maximálního limitu produktů určených ke konzumaci více než v trojnásobně vyšších dávkách, např. u odrůdy Siby, u které byl naměřeno nejmenší množství těchto glykoalkaloidů. Pro použití takto izolovaných skupin bílkovin v potravinářském, farmaceutickém či krmivářském průmyslu by bylo potřeba zapracovat na snížení, nejlépe však úplném odstranění těchto antinutričních látek, nicméně tyto skupiny bílkovin by s největší pravděpodobností netvořily přímou komponentu produktových směsí určených ke konzumaci, ale jsou spíše zamýšleny jako součást obalových materiálů za účelem prodloužení jejich trvanlivosti.

Certifikovaná metodika, publikace kolektivu autorů, je komplexním souborem optimalizovaných postupů pro izolaci vybraných hlízových bílkovin a separaci jejich hlavních frakcí a hodnocení biologických aktivit u takto získaných frakcí bílkovin. Postupy uvedené v metodice mají základ v již známých metodách separace hlízových bílkovin, na které je navázáno aktuálními poznatky s využitím moderních materiálů určených pro následnou separaci bílkovinných frakcí, které se nenavázaly na média použitá v prvních dvou stupních. Zároveň jsou popsány metody optimalizované pro separaci hlízových bílkovin rozdílných genotypů brambor a i rozdílné formy vstupního materiálu a jsou použitelné pro separaci dalších subfrakcí případně jednotlivých skupin bílkovin a to bez destruktivních změn bílkovinných molekul při použití chromatografických separačních metod. Kromě chromatografických technik je v metodice detailně popsán i další separační postup, kterým je izolace termorezistentních skupin bílkovin obsahující převážně frakce inhibitorů proteas serinového typu (supernatant) prostřednictvím tepelné koagulace termolabilních bílkovin (zahřání materiálu na teplotu 80°C) a následným odstraněním těchto termolabilních bílkovin a balastních látek. Díky tomuto postupu jsou termostabilní bílkoviny rozpuštěny v získaném supernatantu a je možná jejich aplikace v různých průmyslových odvětvích.

K optimalizaci postupů bylo taktéž přistoupeno v užitém vzoru, který se zabývá postupem zpracování hlízové vody a optimalizace izolace a purifikace skupiny účinných termostabilních antimikrobiálních bílkovin. Prostřednictvím tohoto postupu byla získána rozpustná účinná frakce skupiny bílkovin (alespoň 70 % hm.) s antimikrobiální aktivitou o molekulové hmotnosti 3,5 – 20 kDa a subfrakce o molekulové hmotnosti 14–18 kDa (35–50 % hmotnosti bílkovinného izolátu; PI-2 a PI-1), 6–11 kDa (40 – 55 % hmotnosti bílkovinného izolátu; PI-2, PI-1, inhibitory proteas indukované poraněním a serinové inhibitory proteas). Takto získané bílkovinné izoláty je možné využít v ochraně rostlin jako jedna z účinných komponent prostředků na ochranu před houbovými patogeny polních plodin či okrasných i pokojových rostlin, v potravinářském průmyslu jsou součástí povrchových vrstev obalových materiálů a jako vstupní surovinu v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Podstatnými výhodami tohoto izolátu je jeho antifungální účinek, který zůstane zachován i při expozici hlízové vody teplotě 80°C a zároveň i zpracování dosud ne příliš hodnotně využívané druhotné suroviny na materiál s celkem velkým potenciálem využití v několika zásadních oblastech průmyslu.

Studiu a hodnocení základních biochemických vlastností a aktivit bílkovin a peptidů se věnovaly postupy použité v kapitole věnující se spektrofotometrickému měření aktivit inhibitorů proteas (serinových, cysteinových a aspartátových) izolovaných z hlíz brambor. Tyto postupy byly taktéž použity pro získání dat v dosud nepublikované práci, jejímž výsledkem

byly nižší naměřené hodnoty (při koncentraci 0,250-0,251 mg/ml) u inhibice trypsinu prostřednictvím poloviční maximální efektivní koncentrace u tepelně nezpracované varianty všech šesti testovaných odrůd při porovnání s tepelně zpracovanou variantou (0,251 - 1,276 mg/ml). Tento rozdíl může být vysvětlen přítomností vysokých množství nedestruovaných inhibitorů serinových proteas ve vzorcích před termokoagulací, které disponují právě měřenou serinovou inhibiční aktivitou.

Poslední práce publikovaná během studia se zabývala optimalizací metod izolace skupiny frakcí extracelulárních bílkovin z hlíz bramboru, které jsou rozpustné ve vodě a jsou alokované v apoplastech jako součást hlízové šťávy. Izolace byla prováděna za pomoci silných precipitačních činidel a purifikací na FPLC a izolované frakce bílkovin byly detekovány jako dvě frakce o molekulové hmotnosti 14-17 kDa a 26 kDa. Vzhledem k tomu, že jsou extracelulárním proteinům často připisovány antimikrobiální vlastnosti, byla důležitá optimalizace izolačního a purifikačního postupu ve smyslu plné rozpustnosti získané bílkovinné frakce ve vodě, protože použití jiných chemických činidel pro zvýšení rozpustnosti proteinů při následném antimikrobiálním testování může narušit průběh pokusu například inhibicí růstu mycelia mikroskopických hub či množení bakterií.

Na základě výše uvedených dosažených výsledků a optimalizovaných metod byly splněny všechny cíle disertační práce a byly potvrzeny všechny hypotézy, které si kladly za cíl zhodnocení izolovaných skupin bílkovin a peptidů hlíz bramboru z hlediska jejich antimikrobiálního potenciálu, použité odrůdy bramboru, metod a optimalizace izolace a modifikace izolovaných skupin bílkovin a peptidů. Výsledky prezentované v této disertační práci naznačují potenciál využití metod a souborů dat v publikacích jak k nasměrování k dalšímu podrobnějšímu studiu, výzkumu a hodnocení výše zmíněných biochemických vlastností u širšího spektra odrůd brambor a houbových patogenů, tak v praxi k přípravě a použití termostabilního antifungálního koncentráту z hlízové vody či hlízové šťávy v oblasti ochrany polních i okrasných rostlin před houbovými patogeny, v potravinářském průmyslu či různých oblastech humánní a veterinární medicíny.



## 6. Seznam použité literatury a ostatních zdrojů

1. Allen A. K., Desai N. N., Neuberger A., Creeth M. (1978): Properties of Potato Lectin and the Nature of its Glycoprotein Linkages. *Biochemical Journal*, 171: 665-674.
2. Anonym 1 (2016): Webové stránky Potatopro.com: <http://www.potatopro.com/product-types/potato-protein>. [Dostupné online: 26. 4. 2016]
3. Anonym 2 (2016): Webové stránky společnosti Avebe: <http://www.avebe.com/products/solanic/>. [Dostupné online: 25. 4. 2016].
4. Anonym 3 (2016): Webové stránky společnosti Avebe: <http://www.avebe.com/products/perfectasol/>. [Dostupné online: 25. 4. 2016].
5. Anonym 4 (2016): Webové stránky společnosti AKV Langoholt: <http://www.akv-langholt.dk/protein/>. [Dostupné online: 25. 4. 2016].
6. Anonym 5 (2016): Webové stránky společnosti Roquette: <http://www.roquette-animalnutrition.com/tubermine-potato-protein-animal-feed-potato-juice-amino-acids-lysine-745/#>. [Dostupné online: 25. 4. 2016].
7. Anonym 6 (2016): Webové stránky společnosti KMC: <http://www.kmc.dk/kmc-ingredients/kmc-ingredients/kmc-potato-protein>. [Dostupné online: 25. 4. 2016]
8. Anonym 7 (2016): Webové stránky společnosti Agrana Stärke GmbH: <http://www.agrana.com/en/products/productfinder/?branche=143&prodgrp=25&prod=82&detail=1&tab=1>. [Dostupné online: 29. 4. 2016]
9. Anonym 8 (2007): Interview: Avebe's Solanic Innovates with Unique Food Ingredients, Potato Proteins. Flexnews: <http://www.upfront-dk.com/images/sampled/Articles/12.pdf> [Dostupné online: 12. 8. 2016]
10. Barret A. J. (1987): The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends in Biochemical Sciences*, 12: 193-196.
11. Bárta J., Bártová V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 116 s.
12. Bárta J., Bártová V. (2008): Patatin, the Major Protein of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tubers, and its Occurrence as Genotype Effect: Processing Versus Table Potatoes. *Czech Journal of Food Sciences*, 5: 347-359.
13. Bártová V., Bárta J. (2009): Chemical composition and nutritional value of protein concentrate isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol or ferric chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19: 9028-9034.
14. Bárta J. (2009): Okopaniny. In: Prugar J. (Ed). *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. VÚPS a KJRP Praha, 241-251.

15. Bárta J., Bártová V., Zdráhal Z., Brabcová A., Kamenová A., Diviš J. (2013): Metody izolace vybraných protein hlíz brambor. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 38 s.
16. Bayer Aktiengesellschaft. Method of controlling perspiration odor with a biological protease inhibitor. Spojené státy americké: <https://www.google.ch/patents/US3950509> [Dospulé online: 12. 8. 2016]
17. Berger S., Rufener J., Klimek P., Zachariou Z., Boillat C. (2012): Effects of potato-derived protease inhibitors on perianal dermatitis after colon resection for long-segment Hirschsprung's disease. *World Journal of Pediatrics*, 2: 173-176.
18. Blanco-Aparicio C., Molina M. A., Fernández-Salas E., Frazier M. L., Mas J. M., Querol E., Avilés F. X., de Llorens R. (1998): Potato Carboxypeptidase Inhibitor, a T-knot Protein, Is an Epidermal Growth Factor Antagonist That Inhibits Tumor Cell Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 20: 12370-12377.
19. Bradshaw J. E., Ramsay G. (2009): Potato Origin and Production. In: Singh J., Kaur J. (Eds.). *Advances in Potato Chemistry and Technology*. Academic Press, 1-26.
20. Coöperatie Avebe U. A. Native potato protein isolates. Nizozemsko. WO 2008069650 A1. 12. 6. 2008: <https://www.google.com/patents/WO2008069650A1?cl=en>. [Dostupné online: 11.8.2016]
21. Coöperatie Avebe U. A. Potato protein isolates. Nizozemsko. WO2014011042 A1. 16. 1. 2014: <https://www.google.com/patents/WO2014011042A1?cl=en>. [Dostupné online: 11.8.2016]
22. Čermák V. (2015): Seznam doporučených odrůd bramboru 2015. ÚKZÚZ Brno, 101 s.
23. De Leo F., Bonade-Bottino M. A., Ceci L. R., Gellerani R., Jouanin L. (1995): Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. *Plant Physiology*, 3: 997-1004.
24. Dias G. B., Gomes V. M., Pereira U. Z., Ribeiro S. F. F., Carvalho A. O., Rodrigues R., Machado O. L. T., Fernandes K. V. S., Ferreira A. T. S., Perales J., Da Cunha M. (2013): Isolation, Characterization and Antifungal Activity of Proteinase Inhibitors from *Capsicum chinense* Jacq. Seeds. *Protein Journal*, 1: 15-26.
25. Domkářová J., Horáčková V. (2013): Uplatnění české genové banky bramboru ve výzkumu a šlechtění. Šlechtitelské listy, 1: [http://www.druvod.cz/files/aktuality/sl\\_01\\_2013\\_el.pdf](http://www.druvod.cz/files/aktuality/sl_01_2013_el.pdf) [Dostupné online: 4. 2. 2014]
26. Downing W. L., Mauxion F., Fauvarque M.-O., Reviron M.-P., de Vienne D., Vartanian N., Giraudat J., (1992): A *Brassica napus* transcript encoding a protein related to the Kunitz protease inhibitor family accumulates upon water stress in leaves, not in seeds. *The Plant Journal*, 2: 685-693.

27. Duan W. H., Jiang R., Wen Y. J., Bin J. H. (2013): Some 2S albumin from peanut seeds exhibits inhibitory activity against *Aspergillus flavus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66: 84-90.
28. Dunse K. M., Stevens, J. A., Lay F. T., Gaspar Y. M., Heath R. L., Anderson M. A. (2010): Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 34: 15011-15015.
29. Dunse K., Anderson M. (2011): Towards the Next Generation of Pest Resistant Plants. In: Irwin R. (Ed.) *Information Systems for Biotechnology*, 1-5.
30. EUR-LEX (2015): Společný katalog odrůd druhů zemědělských rostlin. 34. úplné vydání. Úřední věstník Evropské unie, C2015/404/01, 587-629. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:C2015/404/01&qid=1462304234173&from=CS> [Dostupné online: 29. 4. 2016]
31. Fang Ch., Boe K., Angelidaki I. (2011): Biogas production from potato-juice, a by-product from potato-starch processing, in upflow anaerobic sludge blankets (UASB) and expanded granular sludge bed (EGSB) reactors. *Bioresource Technology*: 102: 5734-5741.
32. FAOSTAT (2015a): Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division: Compare Data, Food Balance - Food Supply. <http://faostat3.fao.org/compare/E> [Dostupné online: 25. 4. 2016]
33. FAOSTAT (2015b) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division: Population. <http://faostat3.fao.org/browse/O/OA/E> [Dostupné online: 25. 4. 2016]
34. FAOSTAT (2016a): Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division: Production - Crops: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> [Dostupné online: 23. 4. 2016]
35. FAOSTAT (2016b): Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division: Food and Agricultural commodities production [http://faostat3.fao.org/browse/rankings/countries\\_by\\_commodity/E](http://faostat3.fao.org/browse/rankings/countries_by_commodity/E). [Dostupné online: 25. 4. 2016]
36. FAOSTAT (2016c): Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division: Production – Crops: <http://faostat3.fao.org/compare/E>. [Dostupné online: 26. 4. 2016]
37. Galliard T. (1971): The enzymatic deacylation of phospholipids and galactolipids in plants: purification and properties of a lipolytic acylhydrolase from potato tubers. *Biochemical Journal*, 121: 379-390.
38. Gambuti A., Rinaldi A., Moio L. (2012): Use of patatin, a protein extracted from potato, as alternative to animal proteins in fining of red wine. *European Food Research and Technology*, 235: 753-765.

39. Garcia-Olmedo F., Salcedo G., Sanchez-Monge R., Gomez L., Royo J., Carbonero P. (1987): Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and  $\alpha$ -amylases. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, 4: 275-334.
40. Giudici A. M., Regente M. C., de la Canal L., (2000): A potent antifungal protein from *Helianthus annuus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 11: 881-888.
41. Gonzalez J. M., Lindamood J. B., Desai N. (1991): Recovery of protein from potato plant waste effluents by complexation with carboxymethylcellulose. *Food Hydrocolloids*, 4: 355–363.
42. Graham J. S., Pearce G., Merryweather J., Titani K, Erricsson L. H., Ryan C. A. (1985): Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves. II. The cDNA-deduced primary structure of the pre-inhibitor II. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 6561-6564.
43. Green, D. E., Stumpf P. K. (1942): Starch phosphorylase of potato. *Journal of Biological Chemistry*, 142: 355-366.
44. Guevara M. G., Veríssimo P., Pires E., Faro C., Daleo G. R. (2004): Potato Aspartic Protease: Inducing, Antimicrobial Activity and Substrate Specificity. *Journal of Plant Pathology*, 3: 233-238.
45. Guevara M. G., Muñoz, Fernández M. B., Mendieta J. R., Gustavo R. D. (2011): Isolation of a New Antimicrobial/Antitumor Plant Peptide: Biotechnology Prospects for its Use in Cancer and Infectious Disease Therapies. In. Méndez-Vilas A. (Ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. 968-976.
46. Haas G. M., Nan H., Biemann K., Grahn D. T., Ericsson L. H., Neurath H. (1975): The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *Biochemistry*, 14: 1334-1342.
47. Habib H., Fazili K. M. (2007): Plant protease inhibitors: a defence strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2: 68-85.
48. Hawkes J. G. (1990): *The Potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*. Belhaven Press, London, 259 s.
49. Hermosa M. R., Turrà D., Fogliano V., Monte E., Lorito M. (2006): Identification and characterization of potato protease inhibitors able to inhibit pathogenicity and growth of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68: 138-148.
50. Höfgen R., Willmitzer L. (1990): Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Science*, 2: 221-230.
51. Horáčková V., Domkářová J. (2005): Využití *in vitro* kultur pro účely konzervace genofondu bramboru. In: Ed. Faberová I.: *Konzervace a regenerace genetických zdrojů vegetativně množených druhů rostlin a Dostupnost a využívání genetických zdrojů rostlin a podpora biodiversity*. VÚRV Praha – Ruzyně, 131 s.

52. Huang D. Y., Swanson B. G., Ryan C. A. (1981): Stability of proteinase inhibitors in potato tubers during cooking. *Journal of Food Science*, 46: 287-290.
53. Huang C. S., Ma W. Y., Ryan C. A., Dong Z. G. (1997): Proteinase inhibitors I and II from potatoes specifically block UV-induced activator protein-1 activation through a pathway that is independent of extracellular signal-regulated kinases, c-Jun N-terminal kinases and P38 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 22: 11957-11962.
54. Hyunth Q. K., Borgmeyer J. R., Smith C. E., Bell L. D., Shah D. M. (1996): Isolation and characterization of 30 kDa protein with antifungal activity from leaves of *Engelmannia pinnatifida*. *Biochemical Journal*, 316: 723-727.
55. Chandrashekharaiah, K. S. (2013): Antimicrobial Activity of Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor from the Seeds of *Mucuna pruriens*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 3: 2405-2410.
56. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (2016): GM Approval Database, Crops List: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/crop/default.asp?CropID=16&Crop=Potato>. [Dostupné online: 25. 4. 2016]
57. Jin Z., Yang Y. X., Choi J. Y., Shinde P. L., Yoon S. Y., Hahn T.-W., Lim H. T., Park Y., Hahn K.-S., Joo J. W., Chae B. J. (2008): Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as a novel antimicrobial agent in weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 7: 1562-1572.
58. Jongsma M. A. (1995): The resistance of insects to plant proteinase inhibitors. Centre for Plant Breeding and Reproduction Research. Wageningen university, 93 s.
59. Katalog odrůd brambor registrovaných v ČR (2009): Vyhledávací databáze charakterizující odrůdy brambor podle vybraných morfometrických znaků, bílkovinných profilů a markerů na úrovni DNA. ZF JČU: <http://www.katalogbrambor.cz/katalog/detail/33> [Dostupné online: 9.5.2016].
60. Kärenlampi S. O., White P. J. (2009): Potato Proteins, Lipids, and Minerals. In: Singh J., Kaur J. (Eds.). *Advances in Potato Chemistry and Technology*. Academic Press, 99-125.
61. Karup Kartoffelmelfabrik, Denmark: Novel Potato Protein, New innovative protein process, 16 s. [http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.showFile&rep=file&fil=NewPotatopro\\_%20Brochure.pdf](http://ec.europa.eu/environment/life/project/Projects/index.cfm?fuseaction=home.showFile&rep=file&fil=NewPotatopro_%20Brochure.pdf) [Dostupné online: 1. 2. 2014]
62. Kempf W. (1980) Beitrag zur mechanischen Entwässerung von Kartoffelpülpe. *Starch/Stärke* 32: 14-20.
63. Kim J.-Y., Park S.-C., Kim M.-H., Lim H.-T., Park Y., Hahn K.-S. (2005): Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330: 921-927.

64. Kim M.-H., Park S.-C., Kim J.-Y., Lee S. Y., Lim H.-T., Cheong H., Hahm K.-S., Park Y. (2006): Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden Valley". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346: 681-686.
65. Kim S. K., Kang H.-J., Kim J.-J., Kim W.-Y. (2011): Characterization of Potato Polyphenol Oxidase Purified by p-aminobenzoic Acid-sepharose Affinity Column. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 3: 255-259.
66. Kim J. Y., Gopal R., Kim S. Y., Seo C. H., Lee, H. B., Cheong H., Park Y. (2013): PG-2 a Potent AMP against Pathogenic Microbial Strains from Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu Valley) Tubers Not Cytotoxic against Human Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2: 4349-4360.
67. Knorr D., Kohler G., Betschart A. (1977): Potato protein concentrates: the influence of various methods of recovery upon yield, compositional functional characteristics. *Journal of Food Processing and Preservation*, 5: 235-247.
68. Komarnytsky S., Cook A., Raskin I. (2011): Potato protease inhibitors inhibit food intake and increase circulating cholecystokinin levels by a trypsin-dependent mechanism. *International Journal of Obesity*, 2: 236-243.
69. Kong X., Kong L., Ying Y., Hua Y., Wang L. (2015): Recovering proteins from potato juice by complexation with natural polyelectrolytes. *International Journal of Food Science and Technology*, 50: 2160-2167.
70. Koppelman S. J., van Koningsveld G. A., Knulst A. C., Gruppen H., Pigman I. G. A. J., de Jongh H. H. J. (2002): Effect of heat-induced aggregation on the IgE binding of patatin (Sol t 1) is dominated by other potato proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1562-1568.
71. Krizaj I., Drobnic-Kosorok M., Brzin J., Jerala R., Turk V. (1993): The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato. *FEBS Letters*, 333: 15-20.
72. Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. 227: 680-685
73. Laing W., Christeller J. (2004): *Current Protocols in Protein Science*, Unit 4.7. Extraction of Proteins from Plant Tissues, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 38: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=54db62b5d11b8b746c8b46cb&assetKey=AS%3A273699796652033%401442266524063> [Dostupné online: 11. 5. 2016]
74. Lawrence P. K., Koundal K. R. (2002): Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronical Journal of Biotechnology*, 1: 93-109.
75. Lehesranta S. J., Davies H. V., Shepherd L. V., Koistinen K. M., Massat N., Nunan N., McNicol J. W., Kärenlampi S. O. (2006): Proteomic analysis of the potato tuber life cycle. *Proteomics*, 6: 6042-6052.

76. Lisinska G., Leszczynski W. (1989): Potato tubers as a raw material for processing and nutrition. In *Potato Science and Technology*: Elsevier Applied Science, London.
77. Løkra S., Helland M. H., Claussen I. C., Strætkvern K. O., Egelanddal B. (2008): Chemical characterization and functional properties of a potato protein concentrate prepared by large-scale expanded bed adsorption chromatography. *LWT - Food Science and Technology*, 6: 1089-1099.
78. Løkra S., Schüller R. B., Egelanddal B., Engebretsen B., Strætkvern K. O. (2009). Comparison of composition, enzyme activity and selected functional properties of potato proteins isolated from potato juice with two different expanded bed resins. *LWT - Food Science and Technology*, 42: 906–913.
79. Lopez-Garcia, B., Hernandez M., Segundo B. S. (2012): Bromelain, a cysteine protease from pineapple (*Ananas comosus*) stem, is an inhibitor of fungal plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 62-67.
80. Lufrano D., Cotabarren J., Garcia-Pardo J., Fernandez-Alvarez R., Tort O., Tanco S., Avilés F. X., Lorenzo J., Obregón W. D. (2015): Biochemical characterization of a novel carboxypeptidase inhibitor from a variety of Andean potatoes. *Phytochemistry*, 120: 36-45.
81. Majamaa, H., Sepälä T., Palosuo T., Turjanmaa K., Kalkkinen N., Reunala T. (2001): Positive skin and oral challenge responses to potato occurrence of immunoglobulin e antibodies to patatin (Sol t 1) in infants with atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 12: 283-288.
82. Mareš M., Meloun B., Pavlík M., Kostka V., Baudyš M. (1989): Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Letters*, 251: 94-98.
83. Markwick N. P., Laing W. A., Christeller J. T., McHenry J. Z., Newton M. R. (1998): Overproduction of digestive enzymes compensates for inhibitory effects of protease and amylase inhibitors fed to three species of Leafrollers (*Lepidoptera: Tortricidae*). *Journal of Economic Entomology*, 6: 1265-1276.
84. Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V. Novel uses of potato tuber proteinaceous inhibitors. Německo. EP 2918281 A1. 16. 9. 2015: <https://www.google.com/patents/EP2918281A1?cl=en> [Dostupné online: 12.8.2016]
85. Mayer F., Hillebrandt J. – O. (1997): Potato pulp: microbiological characterization, physical modification, and application of this agricultural waste product. *Applied Microbiological Biotechnology*, 48: 435-440.
86. McManus, M. T., Ryan S., Laing W. A. (1999): The functions of proteinase inhibitors in seeds. *Seed Symposium*, 3-13.
87. Melville J. C., Ryan C. A. (1972): Chymotrypsin inhibitor I from potatoes: Large scale preparation and characterization of its subunit components. *The Journal of Biological Chemistry*, 247: 3443-3453.

88. Mendieta J. R., Pagano M. R., Muñoz F. F., Daleo G. R., Guevara M. G. (2006): Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology*, 152: 2039-2047.
89. Molina M. G., Marino C., Oliva B., Aviles F. X., Querol E. (1994): C-tail valine is a key residue for stabilization of complex between potato inhibitor and carboxypeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 21467-21472.
90. National Nutrient Database for Standard Reference, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture (2016): <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3127?fg=&man=&facet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Full&new=&measureby=> [Dostupné online: 9. 5. 2016]
91. Nařízení vlády ze dne 16. března 2015, č. 50/2015 Sb., o stanovení některých podmínek poskytování přímých plateb zemědělcům a o změně některých souvisejících nařízení vlády, § 20. 643- 675 s.: [http://eagri.cz/public/web/file/369570/sb0025\\_2015.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/369570/sb0025_2015.pdf) [Dostupné online: 28. 4. 2016]
92. Ohh S. H., Shinde P. L., Jin Z., Choi J. Y., Hahn T.-W., Lim H. T., Kim G. Y., Park Y., Hahn K.-S., Chae B. J. (2009): Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu valley) protein as an antimicrobial agent in the diets of broilers. *Poultry Science* 88: 1227-1234.
93. Osborne T. B. (1909): The vegetable proteins. In Ed.: Plimmer R. H., Hopkins F. G., *Monographs on Biochemistry*, Aberdeen: The University Press, 152 s.
94. Osborne T. B., Campbell G. F. (1896): The proteides of the potato. *Journal of the American Chemical Society*. 18: 575 – 582.
95. Pastorek Z., Kára J. (2003): Výroba bioplynu z odpadních organických materiálů. Webové stránky Výzkumného ústavu zemědělské techniky, v.v.i.: <http://svt.pi.gin.cz/vuzt/vyzkum/2003/kara.htm>. [Dostupné online: 27. 4. 2016]
96. Peters H. P. F., Kovacs E. M. R., Mela D. J., Schuring E. A. H., Wiseman S. A. (2011): The effect of protease inhibitors derived from potato formulated in minidrink on appetite, food intake and plasma cholecystokinin levels in humans. *International Journal of Obesity*, 2: 244-250.
97. Plieger P. (1986): The composition of potato juice. A literature review. *Dutch Institute for Carbohydrate Research Reportnr. Groningen*, 3: 86.
98. Popovic M. M., Bulajic A., Ristic D., Krstic B., Jankova R. M., Gavrovic-Jankulovic M., (2012): *In vitro* and *in vivo* antifungal properties of cysteine proteinase inhibitor from green kiwifruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15: 3072-3078.
99. Pots A. M. (1999): Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein. Ph.D. thesis, Wageningen University, The Netherlands, 123 s.



100. Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S. R., van den Broek L. A. M., van Koningsveld G. A., Voragen A. G. J. (2001): Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6: 2864-2874.
101. Pouvreau L. (2004): Occurrence and physic-chemical properties of protease inhibitors from potato tuber (*Solanum tuberosum*). Ph.D. thesis, Wageningen University, The Netherlands, 157 s.
102. Pusztaí J. J. (1972): Metabolism of trypsin-inhibitory proteins in the germination seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Planta*, 107: 121-129.
103. Racusen D., Foote M. (1980): A major soluble glycoprotein of potato tubers. *Journal of Food Biochemistry*, 4: 43 – 52.
104. Racusen D. (1984): Lipid acyl hydrolase of patatin. *Canadian Journal of Botany*, 62: 1640-1644.
105. Racusen D. (1986): Esterase specificity of patatin from two potato cultivars. *Canadian Journal of Botany*, 64: 2104-2106.
106. Rakashanda S., Ishaq M., Masood A., Amin S. (2012): Antibacterial activity of a trypsin-chymotrypsin-elastase inhibitor isolated from *Lavatera cashmeriana* Camb. seeds. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 4: 983-986.
107. Ralet M. – Ch., Guéguen, J. (2001): Fractionation of Potato Proteins: Solubility, Thermal Coagulation and Emulsifying Properties. *LWT – Food Science and Technology*, 5: 380-387.
108. Rehman S., Khanum A. (2011): Isolation and Characterization of Peptide(s) from *Pisum sativum* having antimicrobial activity against various bacteria. *Pakistan Journal of Botany*, 6: 2971-2978.
109. Reinshagen P. (2013): Rozhovor: Cold recovery of potato proteins, a wonderful innovation. Bobased Press: <http://www.biobased-society.eu/2013/03/cold-recovery-of-potato-proteins-a-wonderful-innovation/> [Dostupné online: 3. 2. 2014]
110. Ribeiro, S. F. F., Carvalhoa A. O., Da Cunha M., Rodrigues R., Cruz L. P., Melo V. M. M., Vasconcelos I. M., Melo E. J. T., Gomes V. M. (2007): Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon*, 5: 600-611.
111. Richardson M. (1991): Seed Storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*, 5: 259-305.
112. Ruseler-van Embden J. G., van Lieshout L. M., Smits S. A., van Kessel I., Laman J. D. (2004): Potato tuber proteins efficiently inhibit human faecal proteolytic activity: implications for treatment of peri-anal dermatitis. *European Journal of Clinical Investigation*, 4: 303-311.

113. Ryan C. A., Kuo T., Pearce G., Kunkel R. (1976): Variability in the concentration of three heat stable proteinase inhibitor proteins in potato tubers. *American Potato Journal*, 12: 443-455.
114. Ryan C. A. (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28, 425–449.
115. Ryan C. A., Balls A. K. (1962): An inhibitor of chymotrypsin from *Solanum tuberosum* and its behaviour toward trypsin. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 48: 1839-1844.
116. Sawano Y., Miyakawa T., Yamazaki H., Tenokura M., Hatano K. (2007): Purification, characterization, and molecular gene cloning of an antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds. *Biological Chemistry*, 3: 273-280.
117. Scarpitta F., Canavesi A., Jegorov A. (2011): Syntéza proteinkinasových inhibitorů. *Chemické Listy*, 105: 278-281.
118. Schoenbeck I., Graf A. M., Leuthold M., Pastor A., Beutel S., Scheper T. (2013): Purification of high value proteins from particle containing potato fruit juice via direct capture membrane adsorption chromatography. *Journal of Biotechnology*, 4: 693-700.
119. Selitrennikoff C. P. (2001): Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2883-2894.
120. Seppälä U., Alenius H., Turjanmaa K., Reunala T., Palòsuo 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 Clinical Immunology*, 103: 165-171.
121. Shah K. R., Patel D. K., Pappachan A., Prabha C. R., Singh D. D. (2016): Characterization of a Kunitz-type serine protease inhibitor from *Solanum tuberosum* having lectin activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 83: 259-269.
122. Shain Y., Mayer A. M. (1965): Proteolytic enzymes and endogenous trypsin inhibitor in germinating lettuce seeds. *Physiologia Plantarum*, 18: 853-859.
123. Shewry P. R., Lucas J. A. (1997): Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. In: Callow J. (Ed.). *Advances in Botanical Research*, 26: 135-192.
124. 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, Asthma & Immunology*, 6: 613-618.
125. Simmonds N. W. (1995): Potatoes. In: Smart J., Simmonds N. W. (Eds.). *Evolution of Crop Plants*, (Second Edition). Longman Scientific & Technical, 466-471.
126. Sitja-Arnau M., Molina M. A., Blanco-Aparicio C. Ferrer-Soler L, Lorenzo J., Aviles F. X., Querol E., de Llorens R. (2005): Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker. *Cancer Letters*, 2: 169-184.

127. Spooner D. M., Hijmans R. J. (2001): Potato Systematics and Germplasm Collecting, 1989-2000. *American Journal of Potato Research*, 78: 237-268.
128. Stevens J., Dunse K. M., Guarino R. F., Barbeta B. L., Evans S. C., Westa J. A., Andreson M. A. (2013): The impact of ingested potato type II inhibitors on the production of the major serine proteases in the gut of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2: 197-208.
129. Strætkvern K. O., Schwarz J. G., Wiesenborn D. P., Zafirakos E., Lihme A. (1999): Expanded bed adsorption for recovery of patatin from crude potato juice. *Bioseparation*, 6: 333-345.
130. Strætkvern K. O., Schwarz J. G. (2012): Recovery of Native Potato Protein Comparing Expanded Bed Adsorption and Ultrafiltration. *Food Bioprocess Technology*, 5: 1939-1949.
131. Sun Y., Liu L., Jiang L.-Z., Zhang G.-F., Li G.-M., Wu L.-N. (2013): Preparation, identification, structure, and in vitro anti-obesity effects of protease inhibitors isolated from potato fruit juice. *European Food Research and Technology*, 2: 149-157.
132. Supuran C. T., Scozzafava A., Clare B. W. (2002): Bacterial protease inhibitors. *Medical Research Review*, 4: 329-372.
133. Sweet R. M., Wright H. T., Janin J. (1974): Crystal structure of the complex of porcine trypsin with soybean trypsin inhibitor (Kunitz) at 2.6-Å resolution. *Biochemistry*, 13: 4212-4228.
134. Taylor B. H., Young R. J., Scheuring C. F. (1993): Induction of a proteinase II-class gene by auxin in tomato roots. *Plant Molecular Biology*, 23: 1005-1014.
135. The Royal Institution For the Advancement Of Learning/McGill University. Process for obtaining protein-enriched preparations from potato. Kanada. WO 2015184545 A1. 10. 12. 2015: <https://www.google.com/patents/WO2015184545A1?cl=en> [Dosputné online: 11. 8. 2016]
136. Turk B., Turk D., Turk V. (2012): Protease signalling: the cutting edge. *The ENBO Journal*, 31: 1630-1643.
137. Valueva T. A., Revina T. A., Kladnitskaya G. V., Molosov V. V. (1998): Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora* infected potato tuber. *FEBS Letters*, 426: 131-134.
138. Valueva T. A., Revina T. A., Gvozdeva E. L., Gerasimova N. G., Ozeretskovskaya O. L. (2003): Role of proteinase inhibitors in potato protection. *Bioorganic Chemistry (Moscow)*, 29: 499-504.
139. Valueva T. A., Mosolov V. V. (2004): Role of Inhibitors of Proteolytic Enzymes in Plant Defense against Phytopathogenic Microorganisms. *Biochemistry (Moscow)*, 11: 1305-1309.
140. van Koningsveld G. A. (2001): Physico-chemical and functional properties of potato proteins. PhD. thesis. Wageningen Agricultural University, 147.

141. van Koningsveld G. A., Gruppen H., de Jongh H. H. J., van Boekel M. A. J. S., Walstra P., Voragen A. G. J. (2001a): The solubility of potato proteins from industrial potato fruit juice as influenced by pH and various additives. *Journal of Food Agriculture*, 82: 134-142.
142. van Koningsveld G. A., Gruppen H., de Jongh H. H. J., Wijngaards G., van Boekel M. A. J. S., Walstra P., Voragen A. G. J. (2001b): Effects of pH and Heat Treatments on the Structure and Solubility of Potato Proteins in Different Preparations. *Journal of Food Agriculture*, 10: 4889-1897.
143. van Koningsveld G. A., Walstra, P., Gruppen, H., Wijngaards G., van Boekel, M. A. J. S., Voragen A. G. J. (2002): Formation and stability of foam made with various potato protein preparations. *Journal of Food Agriculture*, 50: 7651-7659.
144. Vikelouda M., Kiosseoglou V. (2004): The use of carboxymethylcellulose to recover potato protein and control their functional properties. *Food Hydrocolloids*, 18: 21-27.
145. Vokál B., Bárta J., Bártová V., Čepl J., Čížek M., Doležal P., Domkářová J., Dohyanyos M., Faltus M., Greplová M., Hamouz K., Hausvater E., Homolka P., Horáčková V., Hůla J., Kasal P., Kopačka V., Koukalová V., Mayer V., Melzoch K., Opatrný Z., Patáková P., Paulová L., Polzerová H., Rajchl A., Rychtera M., Šantrůček L., Šárka E., Ševčík R., Tajovský M., Vejchar D., Zámečník J. (2013): *Brambory; šlechtění; pěstování; užití; ekonomika*. Profi Press, 168 s.
146. Waglay A., Karboune S., Inteaz A. (2014): Potato protein isolates: recovery and characterization of their properties. *Food Chemistry*, 1: 373-382.
147. Waglay A., Karboune S., Khodadadi M. (2016): Investigation and optimization of a novel enzymatic approach for the isolation of proteins from potato pulp. *LWT – Food Science and Technology*, 65: 197-205.
148. Walsh T. A., Stickland, J. A. (1993): Proteolysis of the 85-kilodanton crystalline cysteine proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domains. *Plant Physiology*, 103: 1227-1234.
149. Wang S. Y., Rao P. F. (2010): A leguminous trypsin-chymotrypsin inhibitor Limenin with antifungal activity from *Phaseolus vulgaris*. *European Food Research and Technology*, 2: 331-338.
150. Woloshuk C. P., Meulenhoff J. S., Sela-Buurlage M., van den Elzen P. J. Cornelissen B. J. (1991): Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*, 3: 619-628.
151. Yang X., Li J., Wang X., Fang W., Bidochka M. J., She R., Xiao Y., Pei Y. (2006): Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. *Peptides*, 7: 1726-1731.
152. Zwijnenberg H. J., Kemperman A. J. B., Boerrigter M. E., Lotz M., Dijksterhuis J. F., Poulsen P. E., Koops G.-H. (2002): Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination*, 1-3: 331-334.

153. Žižka J. (2015): Situační a výhledová zpráva Brambory, listopad 2015. Ministerstvo zemědělství: [http://eagri.cz/public/web/file/437279/SVZ\\_Brambory\\_11\\_2015.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/437279/SVZ_Brambory_11_2015.pdf)  
[Dostupné online: 28. 4. 2016]