

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Katedra:

Genetiky a speciální produkce rostlinné

Studijní obor:

Zemědělské biotechnologie

Téma disertační práce:

**STUDIUM METOD IZOLACE A VLASTNOSTÍ INHIBITORŮ
PROTEAS V HLÍZÁCH BRAMBORU**

Autor:

Ing. František Lorenc

Školitel:

doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

2018

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

V Českých Budějovicích dne

Dedikace

Výsledky uvedené v této disertační práci byly získány za finanční podpory grantů:

GAJU 058/2013/Z - Biologicky aktivní látky v potravinách a zemědělských surovinách.

GAJU 151/2014/Z - Detailní izolace inhibitorů serinových proteas a jejich následné charakterizace a hodnocení antimikrobiálních aktivit

GAJU 112/2016/Z - Významné biologicky a senzorycky aktivní látky v potravinách a zemědělských surovinách

GAJU 116/2016/Z - Studium antimikrobiálního potenciálu esterifikovaných bramborových proteinů

Poděkování

V první řadě a zejména bych chtěl poděkovat svému školiteli doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za cenné připomínky, předané zkušenosti a za věnovaný čas spojený tvorbou této disertační práce a celým doktorským, ale také předchozím bakalářským a magisterským studiem. Velký dík patří rovněž kolegyni Ing. Veronice Bártové, Ph.D. za přínosné rady a doporučení zejména v oblasti analytických a mikrobiologických metod.

Dále bych rád poděkoval svojí kolegyni Ing. Markétě Jarošové za milou společnost při práci v laboratoři a podporu při dokončování této disertační práce. Děkuji také svým kolegům doktorandům a akademickým pracovníkům z katedry Genetiky a speciální produkce rostlinné za sounáležitost a vytvoření příjemného pracovního prostředí po celou dobu doktorského studia. Obrovský dík za podporu po všech stránkách patří mojí rodině.

SOUHRN

Inhibitory proteas (PIs, *Protease inhibitors*) představují jednu ze dvou majoritních skupin bramborových hlízových proteinů. Druhou majoritní skupinu zastupují proteiny patatinového komplexu a skupinu ostatních proteinů tvoří především bramborový lektin, annexin a enzymy lipoxygenasa, glyoxalasa, polyubikvitin nebo enolasa. Inhibitory proteas v bramborových hlízách plní tři funkce. Hlavní funkcí PIs spočívá v inhibici, zejména endogenních, proteas, jako je například trypsin, chymotrypsin, katepsin nebo papain. Schopnost PIs inhibovat proteasy úzce souvisí s obranou rostlin proti mikrobiálním a hmyzím patogenům, tím plní PIs druhou funkci. Třetí funkcí PIs je společně s proteiny patatinového komplexu jejich působení jako zásobní bílkoviny a hrají roli také při mobilizaci dusíkatých látek ze zásobních bílkovin, například při klíčení hlíz. Jejich antimikrobiální působení a další specifické vlastnosti a biologické aktivity umožňuje potenciální využití bramborových PIs v lékařství, fytofarmacii, potravinářství a krmivářství, kosmetickém průmyslu či dalších aplikacích.

Pro průmyslovou izolaci hlízových proteinů, včetně PIs, stále převažují metody tepelné koagulace a isoelektrické precipitace. Aby však bylo možno uplatnit veškerý potenciál bramborových PIs, je třeba použít techniky umožňující izolaci v nativním stavu, kdy zůstávají zachovány podstatné funkční vlastnosti a přirozené biologické aktivity. Tato disertační práce pojednává v první řadě o možnostech detailní izolace PIs v nativním stavu pomocí chromatografických technik, druhou částí bylo studium vybraných aktivit bramborových inhibitorů proteas. Před samotnou purifikací a separací bílkovin bylo také provedeno hodnocení výchozího materiálu - bramborové mouky a hlízové vody.

U výchozího materiálu byl zjišťován obsah sušiny v hlízách pěti kulturních odrůd brambor. Jednalo se odrůdy pro přímý konzum - Adéla, Laura a odrůdy pro zpracování - Eurostarch, Ornella a Sibü. Obsah dusíkatých látek a bílkovin, obsah polyfenolů a antioxidační aktivity. Obsah sušiny v hlízách se pohyboval v rozmezí od 16,6 % (Adéla) do 25,2 % (Ornella). Obecně byl vyšší u odrůd pro zpracování (polopozdní-pozdní) oproti konzumním odrůdám (rané). Obsah dusíkatých látek v sušině byl naopak vyšší u konzumních odrůd v rozmezí od 6,0 % (Ornella) do 13,1 (Adéla). Nepřímo úměrný obsahu dusíkatých látek byl ale samotný obsah bílkovin. Nejvyšší hodnota obsahu bílkovin v hlízové vodě (PFJ) byla zjištěna u odrůdy Ornella (15,1 g/l) a nejmenší u odrůdy Adéla (10,0 g/l). Proteiny odrůdy Adéla byly zastoupeny především PIs (53 % celkových proteinů), u odrůdy

Eurostarch převažoval patatin (46,8 %). Největší podíl PIs u obou odrůd tvořily inhibitory aspartátových proteas, značný byl také obsah neidentifikovaných proteinů patřící pravděpodobně také mezi PIs. Obsah polyfenolů byl nejvyšší opět u konzumní odrůdy Adéla (2,53 g TPP/kg sušiny) a nejnižší u odrůdy Eurostarch (1,26 g TPP/kg sušiny). Obsahu polyfenolů je přímo úměrná i antioxidační aktivita vůči radikálům DPPH i ABTS. Nejvyšší zhášecí aktivita byla zjištěna u odrůdy Adéla (v průměru 66,0 %) a nejmenší u odrůdy Sibů (v průměru 34,6 %). V rámci vybraných odrůd lze tedy potvrdit, že nejvyšší antioxidační potenciál vykazuje velmi rozšířená odrůda Adéla.

Pomocí dvoustupňové purifikace (pomocí medií DEAE a Con A) došlo k oddělení inhibitorů proteas a získání jejich dvou frakcí - bazické PIs (frakce „B“) a kyselých PIs (frakce „D“). U odrůdy Adéla a Eurostarch byly obě frakce PIs dále separovány na systému FPLC pomocí monolitických kolon. Bazické PIs byly pomocí kolony UNO S6 rozděleny do 4 frakcí a kyselých PIs na koloně UNO Q6 do 3-4 frakcí. Ověření úspěšnosti purifikace a separací bylo provedeno pomocí SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrie. Proteinové frakce po separaci na koloně UNO S6 byly zastoupeny především skupinami inhibitorů aspartátových proteas, neidentifikovanými proteiny a inhibitory cysteinových proteas. Přítomny byly také některé inhibitory serinových proteas. Po separaci na koloně UNO Q6 byly separované frakce rovněž zastoupeny nejvíce bramborovými inhibitory aspartátových proteas, ostatními inhibitory serinových proteas a bramborovým inhibitorem proteas II. V součtu všech inhibitorů serinových proteas překračoval jejich obsah skupinu PAPI. Přibližně 10 % tvořily po separaci na UNO Q6 neidentifikované proteiny. Nezachycená frakce byla tvořena zejména proteiny patatinového komplexu. Po separaci na iontově výměnných kolonách byla provedena separace bazických i kyselých frakcí na afinitní koloně CHT5-I. Pomocí této kolony se pouze podařilo oddělit zachycenou (obsahující celé spektrum bramborových PIs) a nezachycenou frakci. Doplňková separace byla provedena na gelové permeační koloně EnRich SEC 650 pomocí které bylo ještě možno nerozdělené zachycené frakce po separaci na CHT5-I rozdělit do 2-4 frakcí. Na základě těchto výsledků lze konstatovat účinnou purifikaci PIs a jejich rozdělení pomocí iontově výměnných kolon. Pomocí kolon Phenyl FF a Butyl HP, využívajících hydrofobní, nedošlo k separaci použitých frakcí bramborových PIs. V dalším kroku by vhodný způsob separace dílčích frakcí mohly zprostředkovat optimalizované postupy gelové permeační chromatografie a chromatografie hydrofobních interakcí.

Třetí část práce byla zaměřena na studium antioxidačních a antimikrobiálních aktivit separovaných frakcí PIs. Byla potvrzena antioxidační aktivita bramborových inhibitorů

proteas. Zhášecí aktivita byla zaznamenána při vysoké koncentraci proteinu (60 mg/ml), nejvyšší zhášecí aktivita byla zaznamenána u frakcí „B“ obou odrůd, kdy byla změřena téměř absolutní (přes 96 %) zhášecí aktivita vůči radikálu ABTS. Zvýšená zhášecí aktivita (> 50 %) byly zaznamenána také u frakcí AS 12-15, ES 1-3 a EQ 8-9. Antioxidační aktivita vyjádřená zhášením radikálu DPPH byla podstatně nižší, nejvyšší zhášecí aktivita (15-16 %) byla zaznamenána u frakcí AS 12-15, ES 1-3 a AQ 9-10 při koncentraci proteinů 10 mg/ml. Antimikrobiální aktivita byla potvrzena pomocí biotestů provedených vůči patogenům *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani*. Antifungální aktivita byla prokázána vůči *F. solani* opět v případě frakcí „B“ u obou odrůd a při vyšší koncentraci (> 40 mg/ml). Antifungální aktivita byla potvrzena v menší míře také v případě frakce AS 12-15. V rámci tohoto cíle byla zjištěna potenciální možnost využití bramborových PIs jako antioxidantů a antimikrobiálních látek i u jednotlivých frakcí, avšak pouze při šetrném způsobu jejich izolace kdy zůstávají, co možná největší míře, v nativním stavu a jsou tím pádem maximálně zachovány výše uvedené biologické aktivity.

SUMMARY

Protease inhibitors (PIs) are one of two major groups of potato tuber proteins. The second major group represents the patatin complex proteins. The third group of other proteins is created mainly of potato lectin, annexin and lipoxygenase enzymes, glyoxalase, polyubiquitin or enolase. Protease inhibitors in potato tubers perform three functions. The primary function of PIs is the inhibition, mostly endogenous proteases such as trypsin, chymotrypsin, cathepsin or papain. The second function is an ability of PIs to inhibit proteases and it is closely related to plant defense against microbial and insect pathogens. The third function of PIs, together with patatin complex proteins, is their function as supply proteins and they also play a role in the mobilization of nitrogenous substances from storage proteins, for example, by the germination of tubers. Their antimicrobial activity and other specific properties and biological activities enable the potential use of potato PIs in medicine, phytopharmaceuticals, food and feed, cosmetics and other applications.

For the industry isolation of tuber proteins, including PIs, are still mostly used methods of thermal coagulation and isoelectric precipitation. For utilization of the full potential of potato PIs, it is necessary to use isolation techniques for obtain them in the native state in which are preserved the essential functional properties and natural biological activities. This thesis deals primarily with possibilities of detailed isolation of PIs in native state by chromatographic techniques, the second part was the study of selected activities of potato protease inhibitors. Before the purification and protein separation were evaluated properties of the source material - potato flour and potato fruit juice (PFJ).

In the tubers of selected varieties were observed: the dry matter content, nitrogen and protein content, polyphenols content and antioxidant activity. The dry matter content of tubers was in the range from 16.6% (Adéla) to 25.2% (Ornella). Generally, it was higher in varieties for processing in comparison to varieties for direct consumption. By contrast, the content of crude protein was higher in varieties for direct consumption. The content of crude protein was in the range from 6.0% (Ornella) to 13.1 (Adéla). It was observed the negative correlation between crude proteins and true proteins. The highest protein content in potato fruit juice was found out in the variety Ornella (15,1%) and the lowest in the variety Adéla (10%). Proteins of the variety Adéla were represented mainly by PIs (53% of total proteins), while patatin (46.8%) was dominant in the variety Eurostarch. The largest proportion of PIs in both varieties consisted of aspartate protease inhibitors, and the amount of unidentified proteins

was also significant, and they are probably consists of protease inhibitors. The content of total polyphenols was highest again in variety Adéla (2.53 g of TPP / kg of dry matter) and the lowest in the variety Eurostarch (1.26 g of TPP / kg of dry matter). The amount of polyphenols is directly proportional to the antioxidant activity against both DPPH and ABTS radicals. The highest scavenging activity was found by the Adéla variety samples (on average 66.0%) and the lowest in the Sibiu's variety samples (on average 34.6%). Within the selected varieties can be confirmed the highest antioxidant potential of the widely grown variety Adéla.

By the two-step purification were separated protease inhibitors into two fractions - basic PIs (fraction "B") and acidic PIs (fraction "D"). In the varieties Adéla and Eurostarch were both PI fractions further separated on the FPLC system by using monolithic columns. Basic PIs were divided on the column UNO S6 into 4 fractions and acidic PIs on the column UNO Q6 to 3-4 fractions. Verification of the successful purification and separation was performed by SDS-PAGE and mass spectrometry. The protein fractions after separation on the UNO S6 column were mainly represented by aspartate protease inhibitor groups, unidentified proteins, and cysteine protease inhibitors. Some serine protease inhibitors have also been present. After separation on the UNO Q6 column, the separated fractions were also represented mostly by the aspartate protease inhibitors and by other serine protease inhibitors and potato protease inhibitor 2. The sum of all serine protease inhibitors exceeded the content of PAPI. Approximately 10% of total protein were classified as unidentified proteins after separation on the UNO Q6 column. After the separation on the ion exchange columns, the basic and acidic fractions were separated on the affinity column CHT5-I. This column separates only the certain fraction into the bound (containing the whole spectrum of the potato PIs) and the non-bound fractions. Additional separations were performed on the EnRich SEC 650 gel permeation column. On this column were separated non-bound fractions after separation to CHT5-I, they were separated into 2-4 fractions. These results show the efficient of the PIs purification and distribution by monolithic ion exchange columns. The hydrophobic interaction columns Phenyl FF a Butyl HP weren't effective for the separations of applied potato PIs fractions. In the next steps of separation it could be suitable to use optimized method of gel permeation or hydrophobic interaction chromatography.

The third part of the thesis was focused on the study of antioxidant and antimicrobial activities of the separated PIs fraction. The antioxidant activity of potato protease inhibitors has been confirmed. Scavenging activity was relevant particularly at high protein concentration (60 mg / ml), the highest activity was observed in „B“ fractions of both

varieties, where the scavenging activity against ABTS radical was almost complete (over 96%). Increased scavenging activity (> 50%) was also observed for the fractions AS 12-15, ES 1-3 and EQ 8-9. The antioxidant activity, expressed by scavenging activity of radical DPPH, was significantly lower, the highest scavenging activity (15-16%) was observed for the fractions AS 12-15, ES 1-3 and AQ 9-10 at a protein concentration of 10 mg/ml. (Add anti-oxidative activity to DPPH). The antimicrobial activity was confirmed by the bioassays performed against the pathogens of *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani*. Antifungal activity was demonstrated against the *F. solani* again in case of the „B“ fractions of both varieties and at a higher concentration (> 40 mg / ml). The weaker antifungal activity was also confirmed in the AS 12-15 fraction. Within this aim was find out the possibility of potential use to the potato PIs and their individual fractions as antioxidants and antimicrobial agents, however it's important to isolate and keep PIs in their native state to preserve mentioned biological activities.

SEZNAM IMPAKTOVANÝCH A RECENZOVANÝCH PUBLIKACÍ

Impaktované publikace

Lorenc F., Bárta J. (2017): Využití monolitických kolon při vysokorychlostní chromatografické separaci bramborových inhibitorů proteas. *Chemické listy* 111: 591-596.

Recenzované publikace

Lorenc F., Bárta J., Brabcová A., Zdráhal Z.: Chromatografická separace vybraných frakcí inhibitorů proteas z hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). *Úroda - vědecká příloha časopisu*, 12/2014: 485-488.

Lorenc F., Bárta J., Brabcová A., Bártová V.: Studium vybraných bílkovinných izolátů z brambor. *Úroda – vědecká příloha časopisu*, 12/2015: 363-366.

Lorenc F., Bárta J., Kulík J.: Hodnocení rozdílů hlízových bílkovin brambor před a po esterifikaci. *Úroda – vědecká příloha časopisu*, 12/2016: 489-492.

Bárta, J., Diviš, J., Bártová, V., **Lorenc, F.**, Kulík, J., Brabcová A.: Hodnocení projevů obecné strupovitosti na hlízách konzumních brambor v průběhu vegetace. *Úroda – vědecká příloha časopisu*, 12/2016: 201-204.

Kulík, J., Bárta, J., Bártová, V., **Lorenc F.**: Vliv hnojení dusíkem na výnos škrobu a bílkovin. *Úroda – vědecká příloha časopisu*, 12/2016: 365-368.

OBSAH

1. ÚVOD.....	13
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	15
2.1 Biologické a nutriční vlastnosti brambor	15
2.2 Hlízové bílkoviny.....	16
2.2.1 Patatin	17
2.2.2 Ostatní proteiny.....	18
2.3 Inhibitory proteas	19
2.3.1 Působení inhibitorů proteas	20
2.3.2 Klasifikace inhibitorů proteas	21
2.3.2.1 Bramborový inhibitor I.....	22
2.3.2.2 Bramborový inhibitor II.....	22
2.3.2.3 Bramborové inhibitory cysteinových proteas	23
2.3.2.4 Bramborové inhibitory aspartátových proteas	24
2.3.2.5 Bramborové inhibitory proteas Kunitzova typu	25
2.3.2.6 Ostatní inhibitory serinových proteas.....	25
2.3.2.7 Bramborové inhibitory karboxypeptidasy	26
2.4 Proteinové izoláty.....	26
2.5 Možnosti separace bílkovin hlíz bramboru	28
2.5.1 Průmyslová izolace a separace	29
2.5.2 Experimentální izolace a separace.....	31
2.5.2.1 Ultrafiltrace a reverzní osmóza.....	31
2.5.2.2 Kombinované techniky purifikace a separace.....	31
2.5.2.3 Separace pomocí chromatografického systému FPLC	33
2.6. Možnosti využití inhibitorů proteas.....	37
2.6.1 Potravinářství a krmivářství	37
2.6.2 Medicína.....	38
2.6.3 Rostlinolékařství	39
3. CÍLE PRÁCE	41
4. MATERIÁL A METODY.....	42

4.1 Příprava materiálu a stanovení sušiny	42
4.2 Obsah dusíku a dusíkatých látek.....	43
4.3 Obsah polyfenolů v hlízách.....	43
4.4 Chromatografická purifikace a separace PIs.....	44
4.4.1 Purifikace pomocí kolony DEAE	44
4.4.2 Purifikace pomocí kolony Con A Sepharose 4B.....	45
4.4.3 Koncentrace bílkovin	45
4.4.4 Chromatografická separace na systému FPLC	46
4.4.4.1 Odsolení proteinových frakcí.....	46
4.4.4.2 Separace pomocí kolony UNO S6	46
4.4.4.3 Separace pomocí kolony UNO Q6.....	47
4.4.4.4 Separace pomocí kolony CHT-5I	47
4.4.4.5 Separace pomocí kolony ENrich SEC 650.....	48
4.4.4.6 Separace pomocí kolony HiTrap	48
4.5 SDS-PAGE.....	49
4.6 Hmotnostní spektrometrie	50
4.6.1 Příprava vzorku.....	50
4.6.2 LC-MS/MS analýza peptidů.....	50
4.7 Antimikrobiální aktivity	52
4.8 Antioxidační aktivity	52
4.9 Statistické hodnocení	53
5. VÝSLEDKY	55
5.1 Obsah sušiny a dusíkatých látek	55
5.2 Obsah polyfenolů a antioxidační aktivity vybraných odrůd	56
5.3 Hodnocení obsahu bílkovin	58
5.3.1 Koncentrace a obsah bílkovin v hlízové vodě	58
5.3.2 Ověření výsledků purifikace a obsahu bílkovin v dílčích frakcích.....	59
5.4 Chromatografie na systému FPLC.....	61
5.4.1 Odsolení proteinových frakcí.....	61
5.4.2 Separace PIs pomocí UNO S6.....	61
5.4.3 Separace PIs pomocí UNO Q6.....	62

5.4.4	Separace PIs pomocí CHT5-I	63
5.4.5	Separace PIs pomocí SEC 650	63
5.4.6	Separace PIs pomocí Butyl HP a Phenyl FF	64
5.5	Hmotnostní spektrometrie	64
5.5.1	Obsah proteinů v bramborové hlízové vodě.....	64
5.5.2	Bazické PIs	66
5.5.3	Kyselé PIs	67
5.6	Antimikrobiální aktivity	68
5.7	Antioxidační aktivity proteinových frakcí	69
6.	DISKUZE	71
6.1	Obsah sušiny a dusíkatých látek	71
6.2	Obsah polyfenolů u odrůd a jejich antioxidační aktivity	71
6.3	Koncentrace, obsah a relativní abundance bílkovin	72
6.4	Hodnocení úspěšnosti dvoustupňové purifikace PIs	74
6.5	FPLC separace a hodnocení získaných frakcí	76
6.5.1	Separace bazických PIs na koloně UNO S6	76
6.5.2	Separace kyselých PIs na koloně UNO Q6.....	77
6.5.3	Separace pomocí CHT5-I, Enrich SEC 650 a HIC kolon	77
6.7	Antimikrobiální aktivity	79
6.8	Antioxidační aktivity proteinových frakcí	80
7.	ZÁVĚR	81
7.1	Vlastností výchozího materiálu.....	81
7.2	Hodnocení chromatografické separace a identifikace proteinů	82
7.3	Studium vybraných vlastností bramborových PIs	83
8.	SEZNAM LITERATURY	84
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	95
10.	PŘÍLOHY.....	98

1. ÚVOD

Brambor hlíznatý, či lilek brambor (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) patří celosvětově mezi nejvýznamnější zemědělské plodiny. Za rok 2013 byla podle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) odhadnuta produkce brambor na 368 096 000 tun, což z ní po pšenici, rýži a kukuřici činí čtvrtou nejvýznamnější plodinou z hlediska lidské výživy. V roce 2016 bylo v České republice, na bramborami osázené ploše 23tis ha podle odhadu ČSÚ, sklizeno 689 tis. tun brambor, což bylo o 36,5 % více v porovnání s rokem 2015. Výnos činil v 29,43 tun na hektar, čili o 7,17 tun více než v roce 2015. Nižší výnos v roce 2015 byl ovlivněn především výrazným suchem, tudíž nelze potvrdit rostoucí produkci brambor v ČR. Ve státní odrůdové knize bylo v roce 2016 (15. 6. 2016) zapsáno celkem 134 odrůd brambor. V rámci databáze Společného katalogu odrůd bylo ke dni 4. 6. 2017 vyhledáno 1704 registrovaných odrůd na území Evropské unie. Pro konzum a zpracování jsou využívány výhradně bramborové hlízy. Ty vznikají přeměnou podzemních modifikovaných stonků (stolonů) a slouží k akumulaci rostlinou vytvořených asimilátů, zejména škrobů. Hlízy jsou využívány po tepelné úpravě pro přímý konzum, pro výrobu potravinářských a potravinových produktů a pro průmyslové zpracování, především pro výrobu bramborového škrobu a v menší míře lihu.

Bramborové hlízy obsahují řadu nutričně, a zdraví, prospěšných látek. Poměrně vysoký je obsah minerálních látek, zejména draslíku (300-450 mg/100 g). Mezi látky významné pro zdraví konzumenta lze zařadit také antioxidanty. Jedná se zejména o polyfenoly (1,2-4,4 g/kg čerstvé hmoty) a vitamín C, jehož obsah činí v průměru 170–990 mg/kg čerstvé hmoty. Z ostatních antioxidantů jsou zastoupeny karotenoidy (4–4,5 mg/kg u tetraploidních odrůd), vitamín E (0,5–2,8 mg/kg) a v menším množství selen (0,01 mg/kg). Bílkoviny jsou v bramborových hlízách zastoupeny v poměrně malém množství (do 2 % v čerstvých hlízách), přesto je však jejich význam v hlízách nezanedbatelný z hlediska biologických vlastností, nutriční kvality a obecně velké konzumace brambor člověkem. Hlízové bílkoviny jsou v lidské výživě kvalitní zejména z hlediska zastoupení esenciálních aminokyselin. Hodnotou indexu esenciálních aminokyselin (EAAI) předčí o jednu třetinu bílkoviny sóji (Vokál et al., 2013).

Hlízové bílkoviny jsou děleny do tří skupin, patatiny a inhibitory proteas představují dvě majoritní skupiny, třetí skupinu tvoří ostatními proteiny. Patatiny slouží především jako zásobní proteiny, ale vykazují rovněž některé enzymatické aktivity. Inhibitory proteas plní

in vivo tři základní funkce: Regulují aktivitu endogenních proteas, plní obrannou funkci proti mikrobiálním patogenům a hmyzím škůdcům a slouží jako zásobní proteiny. Výzkum bramborových bílkovin je díky jejich potenciálu celosvětově rozsáhlý, nejen díky jejich zmíněné nutriční hodnotě. Bramborové inhibitory proteas vykazují specifické antimikrobiální, kancerostatické a další významné vlastnosti a aktivity, které předurčují jejich využití v oblasti rostlinolékařství, medicíny, farmaceutickém a potravinářském průmyslu, případně jiných oblastech lidské činnosti.

Metody izolace a separace hlízových bílkovin lze rozdělit do několika skupin, zejména podle využití purifikovaných bílkovin. V oblasti průmyslové izolace bílkovin se nejčastěji uplatňují metody tepelné koagulace nebo isoelektrické precipitace či jejich kombinace, které jsou následně nejčastěji využívány v krmivářství či částečně potravinářství. Nevýhodou této metody je získání bílkovin v denaturovaném stavu, v tomto stavu ztrácí svoje biologické aktivity, což znemožňuje jejich využití mimo potravinářskou/krmivářskou oblast. V současné době přechází metody izolace z experimentálního měřítka do průmyslových aplikací, ultrafiltrační a chromatografické techniky, či jejich kombinace jsou již dnes využívány pro výrobu bramborových bílkovinných izolátů pro lidskou výživu potravinářské využití. Vzhledem ke zvyšující se potřebě hledat stále nové zdroje bílkovin s dobrými a využitelnými funkčními vlastnostmi, lze předpokládat čím dál častější využívání právě bramborových bílkovin. Rostlinný původ ve spojení s nutriční kvalitou a funkčními vlastnosti bramborových bílkovin ještě zvyšuje jejich potenciál díky použitelnosti ve vegetariánské a veganské výživě, především ve formě kvalitních bílkovinných izolátů.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Biologické a nutriční vlastnosti brambor

Brambor hlíznatý či lilek brambor (*Solanum tuberosum* L.) je víceletá, dvouděložná rostlina patřící do čeledi lilkovitých. Pochází z Jižní Ameriky, kde byla již před příchodem Evropanů poměrně intenzivně pěstována původními obyvateli. Do Evropy byly brambory dovezeny v 16. století (Bradshaw & Ramsay, 2009). V současnosti jsou brambory čtvrtou nejdůležitější plodinou po pšenici, kukuřici a rýži co se týká produkce (Mullins et al., 2006). Z hlediska lidské výživy se díky svým nutričním vlastnostem jedná o velice hodnotnou plodinu. Kromě převažujícího škrobu, sloužící v lidské výživě jako zdroj energie, obsahují bramborové hlízy celou řadu minerálů. Významný je také obsah látek s funkcí antioxidační ochrany (např. vitamíny, polyfenoly a barviva) díky nimž představují brambory kvalitní zdroj antioxidantů. Kromě uvedených antioxidantů plní tuto ochrannou funkci také některé bílkoviny, obsažené v bramborových hlízách. Jedná se například o enzym superoxid dismutasu (Ighodaro & Akinloye, 2017) nebo albumin (Gupta & Sharma, 2006). Albuminová frakce hlízových bílkovin je zastoupena jednou ze dvou majoritních skupin hlízových bílkovin - inhibitory proteas (Waglay & Karboune, 2004). Bílkoviny brambor patří podle indexu esenciálních aminokyselin (EAAI) mezi nejkvalitnější rostlinné bílkoviny. Jak bylo zmíněno již v úvodu této práce, bramborové bílkoviny předčí se svojí hodnotou 83 % bílkoviny semen sóji (62 %) a hrachu. Co se týká samotného zastoupení aminokyselin, vyznačují se bramborové bílkoviny, zejména patatin, vysokým obsahem lysinu. Limitující naopak mohou být sírné aminokyseliny, zejména methionin (Bárta et al., 2015; Bárta & Bártová, 2007). Hlízy brambor obsahují přibližně 70-80 % vody. Zbytek hmoty tvoří sušina zastoupená zejména polysacharidy - škrobem (Tab. 1).

Tab. 1: Chemické složení hlíz bramboru (převzato z Vokál et al., 2013)

Složka (látka)	Vyjádření v čerstvé hmotě (% hmotnosti)	Vyjádření v sušině (% hmotnosti)
voda	68-83	-
sušina	17-32	100
škrob	11-26	60-80
jednoduché cukry (glukóza, fruktóza, sacharóza)	0,5	2,1
vláknina	1-2	4-10
dusíkaté látky	1-3	6-15
bílkoviny (koagulované)	0,5-2	3-8
volné aminokyseliny (asparagin, glutamin, prolin)	0,1-1	0,5-4
lipidy	0,1	0,4
popeloviny	1,1	4,6

2.2 Hlízové bílkoviny

Obsah koagulovatelných bílkovin v sušině hlíz brambor činí přibližně 3-8,0 %. Obsah bílkovin v čerstvé hlíze je relativně malý, činí přibližně 0,5-2 % (Bradshaw & Ramsay, 2009). Míra zastoupení dusíkatých látek (NL) a bílkovin v bramborových hlízách ovlivňuje několik faktorů: Odrůda, hnojení dusíkem, oblast pěstování a podmínky skladování. Rozhodujícím faktorem určující obsah bílkovin a dusíkatých látek v hlízách je genotyp (odrůda) a hnojení dusíkem. Přímý podíl odrůdy na variabilitu v obsahu bílkovin a NL je asi 30-50 %, vliv odrůdy společně s prostředím zvyšuje tento podíl na 35-75 %. Se zvyšující se dávkou dusíkatých hnojiv aplikovaných při pěstování brambor narůstá obsah bílkovin i NL, avšak obsah NL narůstá výrazněji (Bárta & Bártová, 2007).

Z hlediska celkové spotřeby v České republice přijme člověk více bílkovin z brambor než z luštěnin, které jsou považovány za hlavní zdroj významných rostlinných bílkovin v lidské výživě. Vyplývá to z faktu, že průměrná spotřeba brambor v ČR na hlavu je přibližně 26x vyšší než spotřeba luštěnin (Tab. 2).

Právě díky vysoké nutriční hodnotě obsažených bílkovin a potenciálu jejich využití a technologickým možnostem izolace a separace hlízových proteinů z bramborové hlízové vody (PFJ, *Potato fruit juice*) je tedy logické a lze díky těmto dvěma důvodům předpokládat rozvoj šlechtění nových odrůd s vyšším obsahem bílkovin (Dale & MacKay, 1994).

Tab. 2: Průměrná roční spotřeba brambor a luštěnin a v nich obsažených bílkovin v ČR na obyvatele (upraveno podle situačních zpráv Ministerstva zemědělství)

Plodina	spotřeba plodiny na osobu [kg]	Obsah bílkovin v sušině [g / 100 g)	Přibližná spotřeba bílkovin na osobu [kg]
Luštěniny	2,7 (zralá semena)	21-25	< 0,68*
Bramory	70,1 (čerstvé hlízy)	1-3	0,7-2,1

* obsah bílkovin je snížen vlhkostí luštěninových semen, která však nesmí být podle vyhlášky č. 369/2009 Sb. vyšší než 15 %

V hlízové vodě převažuje zastoupení dvou majoritních skupin proteinů - patatinů a inhibitorů proteas, které dohromady tvoří až přes 80 % (Tab. 3) hlízových bílkovin (Macrae et al., 1998; Pots et al., 1999; Hoehenwarter et al., 2011).

Tab. 3: Relativní zastoupení bílkovin a jednotlivých skupin bramborových PIs v PFJ z odrůdy *Elkana* (upraveno podle Pouvreau, 2004)

Skupina proteinů	Patatin	PI-1	PI-2	PCPI	PAPI	PKPI	OSPI	PCI	Ostatní
Obsah v PFJ [%]	37,5	4,5	22,3	11,9	5,9	3,6	1,5	0,9	12,8

Bílkoviny hlíz brambor rozdělujeme v současnosti do 3 hlavních skupin (Pots, 1999, Pouvreau, 2004):

- 1) proteiny patatinového komplexu (patatin)
- 2) inhibitory proteas
- 3) ostatní proteiny

2.2.1 Patatin

Patatiny, dříve také uváděné jako tuberiny, představují jednu ze dvou majoritních skupin proteinů a tvoří 20-60% celkového obsahu bílkovin hlíz bramboru. Z hlediska rozpustnosti patří patatiny mezi globuliny (Macrae et al., 1998; Pots et al, 1999; Waglay et al., 2014). Patatiny jsou glykoproteiny plnicí zásobní funkci, slouží především jako zdroj aminokyselin, a vyskytují se v buněčných vakuolách parenchymatického pletiva v hlízách a listech (Sonnenwald et al. 1989). V nativním stavu je patatin dimer, přičemž molekulová hmotnost identických podjednotek patatinu kolísá v rozpětí 39-45 kDa podle jednotlivých isoform

(Pots, 1999). Primární strukturu patatinu izolovaného ze *Solanum tuberosum* tvoří 387 aminokyselin, oproti tomu isoforma patatinu izolovaná z tabáku je tvořena pouze 362 aminokyselinami (Brabcová, 2015). Přibližně 4 % řetězce představuje sacharidová část aminokyselin (Bárta, 2015). Bílkoviny patatinového komplexu jsou poměrně homologní skupinou proteinů oproti bramborovým inhibitorům proteas. Kromě zásobní funkce bylo také prokázáno enzymatické působení patatinu, jedná se zejména o lipidacylhyrolasovou a fosfolipasovou aktivitu (Brabcová, 2015). Dalšími enzymovými aktivitami spojených s patatinem jsou β -1,3 glukanasová (Tonón et al., 2001) a β -xylosidasová aktivita (Peyer et al., 2004).

Bílkoviny patatinového komplexu byly poprvé izolovány a purifikovány v roce 1980 za pomoci dvoustupňové chromatografie (Obr. 1). V prvním kroku byla provedena iontově výměnná chromatografie za použití media DEAE celulosy a v druhém kroku byla použita afinitní chromatografie s mediem Con A Sepharose (Racusen & Foote, 1980).

2.2.2 Ostatní proteiny

Mezi ostatní proteiny obsažené v bramborových hlízách, čili ty které nelze zařadit mezi proteiny patatinového komplexu ani inhibitory proteas, patří skupina proteinů tvořící podíl 20-45 % hlízových bílkovin (Pots et al., 1999; Hoehenwarter et al., 2011). Mezi ostatní hlízové proteiny patří zejména enzymy jako například lipoxygenasa, glyoxalasa, enolasa nebo polyubikvitin (Bauw et al., 2006; Rajendran et al., 2016). Mezi další významný protein spadající do této skupiny patří annexin. Tento membránový protein zprostředkovává v rostlinné buňce vazbu iontů Ca^{2+} na fosfolipidy v membráně. Předpokládá se, že se podílí na organizaci membránově asociovaných proteinových komplexů a jejich interakci se signálními molekulami, jsou tedy tím pádem spojeny se širokým rozsahem buněčných a vývojových procesů (Baucher et al., 2012). Bramborový annexin by se mohl stát v blízké době předmětem intenzivního výzkumu. Bylo prokázáno, že nadprodukce annexinu významně zvyšuje odolnost vůči abiotickým stresům, zejména suchu. Ovlivňuje rovněž toleranci ke stresu způsobeným světlem, zavírání průduchů a přijímání oxidu uhličitého. Annexin potlačuje také působení reaktivních metabolitů kyslíku, jež mohou být cytotoxické a vyvolávat mutagenézi. V budoucnosti by mohl annexin nalézt potenciál v oblasti rezistentního šlechtění, kdy by jeho exprese v transformovaných rostlinách mohla zvyšovat jejich toleranci vůči nepříznivým stresovým podmínkám (Szalonek et al., 2015).

Dalším studovaným zástupcem ostatních hlízových proteinů je bramborový lektin (STA, *Solanum tuberosum agglutinin*). STA je glykoprotein složený ze dvou homologních podjednotek s molekulovou hmotností 65,5 kDa, přičemž 52,3 % podjednotky tvoří sacharidová část (Allen et al., 1996). Jiný zdroj uvádí molekulovou hmotnost STA podjednotek 55 kDa (Kieliszewski & Orlando, 1997). Bramborový lektin má schopnost vazby na chitin a zároveň aglutinovat červené krvinky (Šafařík et al., 2010). Byla prokázána biologická aktivita STA způsobující vysokou mortalitu larev blýskáčka (Åhman & Melander, 2003).

2.3 Inhibitory proteas

Inhibitory proteas (PIs, *Protease inhibitors*) byly poprvé popsány v roce 1947. Mickel a Standish pozorovali jejich negativní působení na vývoj larev hmyzu. Larvy byly chovány na extraktech sóji obsahující právě tyto bílkoviny. Později byly tyto bílkoviny klasifikovány jako inhibitory proteas (Mickel & Standish, 1947). Současně s objevem PIs bylo tedy potvrzeno jejich insekticidní působení. Inhibitory proteas jsou velice heterogenní skupinou bílkovin. Jednotlivé skupiny PIs se od sebe liší svojí katalytickou aktivitou, strukturou, molekulovou hmotností, počty podjednotek a isoelektrickými body (Pouvreau, 2004). Jedná se obecně o velice rozšířenou skupinu proteinů. Jejich přítomnost byla prokázána u živočichů, rostlin, bakterií i hub (Habib & Fazilli, 2007). Zastoupení inhibitorů proteas činí 20-50 % obsahu hlízových bílkovin (Pots et al, 1999; Pouvreau, 2004).

Primární funkcí PIs je regulace proteolytických procesů prostřednictvím inhibice, zejména, endogenních proteas, jako je například trypsin, chymotrypsin, katepsin nebo papain. Schopnost PIs inhibovat proteasy úzce souvisí s obranou rostlin, o čemž podrobněji pojednává kapitola 2.3.1. U brambor hrají PIs, jakožto jedna ze dvou majoritních skupin hlízových bílkovin, významnou roli také při mobilizaci dusíkatých látek ze zásobních bílkovin například při klíčení hlíz, slouží tedy také jako zásobní bílkoviny (Weeda et al. 2010, Bárta et al., 2015). Bramborové inhibitory proteas, dříve označovány jako tuberiny, patří mezi bílkoviny rozpustné ve vodě. V rámci hlízových bílkovin jsou tedy součástí albuminové frakce (Waglay & Karboune, 2004).

2.3.1 Působení inhibitorů proteas

Inhibitory proteas se mohou v rostlinném těle vyskytovat v různých částech, například semenech a hlízách ale i v nadzemních orgánech. (Habib & Fazilli, 2007). PIs se v rostlinách uplatňují v obraně proti mikrobiálním patogenům a hmyzím škůdcům, kde často hrají klíčovou roli jako jeden z prvků nespecifické imunity rostlin (Kim et al., 2009).

Obecný princip inhibice proteas spočívá v navázání inhibitoru na aktivní místo proteinu. Dochází k vytvoření kovalentní vazby, což vede k inaktivaci proteasy. Vzhledem ke klíčové roli proteas v regulačních kaskádách a tvorbě či degradaci proteinů buněčné membrány prokaryotické buňky, dochází vlivem inhibice proteolytických procesů k narušení reprodukce bakterií (Farady & Craika, 2010; Dalbey et al., 2012).

U houbových patogenů dochází vlivem inhibice, zejména aspartátových, proteas k potlačení vitálních procesů organismu (Santos et al., 2013). Růst hub je zpomalen vlivem narušení proliferace hyf, což může mít za následek až úplné zastavení šíření mycelia a neschopnost čerpat živiny. Kromě antibakteriálního a antifungálního působení bylo také prokázáno působení rostlinných PIs proti patogenním virům, například HIV, žloutenky a herpetickým virům. Inhibitory proteas jsou schopny zamezovat reprodukci a šíření daných virů (Patick & Potts, 1998; De Clercq, 2004).

Bylo zjištěno, že k expresi antimikrobiálních proteinů v listech brambor dochází bezprostředně při napadení hmyzími patogeny, například druhy *Leptinotarsa decemlineata* nebo *Macrosiphum euphorbiae* (Duceppe et al., 2012). Experimentálně bylo prokázáno insekticidní působení inhibitorů proteas u transgenních rostlin, obsahující geny kódující různé rostlinné PIs, například proti larvám z řádů motýlů a brouků (Lawrence & Koundal, 2002; Ussuf et al., 2001). Mechanismus působení PIs proti hmyzím patogenům spočívá v inhibici aktivity jejich trávicích enzymů. Dochází ke ztrátě enzymových aktivit proteas, což má za následek jejich nadprodukcí. Zvýšená produkce trávicích enzymů způsobuje nedostatek, zejména siřných, aminokyselin v organismu. Dochází ke zpomalení vývoje jedince a jeho vyčerpání, což může v krajním případě vést až k jeho usmrcení (Rohrer et al., 2011).

Mezi zajímavé PIs bramborové PIs patří tři zástupci inhibitorů serinových proteas Kunitzova typu - Potide G, AFP-J a PT-1. Nejmenší specifitu a nejširší antimikrobiální působení bylo potvrzeno u inhibitoru Potide G. Je schopný inhibovat jak lidské, tak i rostlinné mikrobiální patogeny, například *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* a *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganins*, *Candida albicans* a *Rhizoctonia solani* (Kim et al., 2006). Bylo zjištěno také jeho působení proti bramborovému viru typu Y (PVY),

(Tripathi et al., 2006). U inhibitoru AFP-J byla zjištěna inhibice patogenu *Candida albicans*, způsobující některá lidská kvasinková onemocnění (Lee et al., 2012; Park et al., 2005). U proteinu PT-1 (potamin 1) bylo prokázáno antimikrobiální působení také proti *C. albicans*, ale také vůči houbovému patogenu *Rhizoctonia solani* nebo fytopatogenní bakterii *Clavibacter michiganensis* (Kim et al., 2005).

Brambory kromě inhibitorů proteas obsahují také další peptidy a proteiny s antimikrobiální aktivitou. Jedná se například o pseudothionin, který inhibuje růst bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* a také *Pseudomonas solanacearum* a *Fusarium solani*. Mezi další antimikrobiální peptidy patří peptidy snakin-1 a snakin-2 aktivní proti *C. michiganensis* a *Botrytis cinerea* a (Kim et al., 2013). Potenciál využití těchto dvou peptidů zvyšuje také možnost chemické přípravy jejich syntetických analogů, které vykazují stejnou antifungální aktivitu jako přirozené peptidy snakin-1 a snakin-2 (Harris et al., 2014).

K expresi inhibitorů proteas dochází tak vlivem abiotických stresů, například mechanickým poraněním nebo při stresu způsobeným suchem (Sanchez-Serrano et al., 1987; Ledoigt et al., 2006).

2.3.2 Klasifikace inhibitorů proteas

Jak již bylo uvedeno, inhibitory proteas jsou velice heterogenní a širokou skupinou proteinů. Dle databáze MEROPS verze 9.13 bylo k červenci roku 2015 objeveno celkem 74 658 inhibitorů peptidas (proteinů inhibujících endopeptidasy/proteinasy i exopeptidasy) zahrnujících 1428 interakcí mezi konkrétními inhibitory a jejich proteasami (Rawlings et al., 2015). Jednotlivé skupiny podskupiny a zástupci se liší svojí molekulovou svou hmotností, počty podjednotek, isoelektrickými body, dle proteas které PIs inhibují. PIs se liší také v délce řetězce (Bauw et al., 2006).

Klasifikaci komplikuje například struktura aktivních míst a jejich počet přičemž každé místo může inhibovat různé proteasy. Mohou se také vyskytovat homologní sekvence v peptidových řetězcích u podobných inhibitorů. Problematické je zejména rozdělení inhibitorů proteas Kunitzova typu, bylo zjištěno, že až 70 % bramborových PIs spadá do této „super-rodiny“ proteinů. Mnoho izolovaných bramborových PIs Kunitzova typu navíc vykazuje homologní sekvence k inhibitorům Kunitzova typu izolovaných z jiných rostlin (Pouvreau, 2003).

Z výše uvedených důvodů je klasifikace inhibitorů proteas poměrně obtížná. V současné době nejčastěji používaný způsob rozdělení bramborových PIs do sedmi skupin provedený

dle Pouvreau (2004). Zohledňuje více kritérií rozdělení, mezi něž patří právě molekulová hmotnost, počet podjednotek, isoelektrické body a také dle toho, jaký typ proteasy inhibují.

2.3.2.1 Bramborový inhibitor I

Bramborový inhibitor I (PI-1) byl poprvé popsán v roce 1962 autory Ryan a Balls. PI-1 je multimerický protein s molekulovou hmotností 40-45 kDa skládající se z pěti identických podjednotek (8 kDa). Každá podjednotka obsahuje jeden disulfidický můstek a obsahuje dvě aktivní místa, díky čemuž dokáže inhibovat trypsin a α -chymotrypsin. Nicméně vyšší afinita byla zjištěná k α -chymotrypsinu (Pouvreau, 2004).

PI-1 lze definovat také jako skupinu proteinů. Proteiny s homologní sekvencí byly objeveny především v rostlinách. Výskyt proteinů z PI-1 skupiny byl zaznamenán v různých částech tabáku, například v etiolovaných listech a květních pupenech tabáku, v apikálních meristémech a klíčících semenech rýže, stoncích a semenech laskavce červenoklasého, v mladých listech a plodech povijnice batátové a v rajčatech. Přítomnost PI-1 proteinu byla zaznamenána také například v kroužkovci, pijavici lékařské. Později byl pomocí sekvenačních analýz DNA potvrzen pravděpodobný výskyt genů exprimujících PI-2 také u mnoha druhů bakterií (Turra & Lorito, 2011).

K expresi PI-1 proteinů u rostlin dochází přirozeně při vystavení rostliny abiotickým stresům jako je například mechanické poranění, nedostatku vody, chladu, vysoké salinitě půdy a při biotických stresech – napadení hmyzími škůdci a virovými, bakteriálními nebo houbovými patogeny. Expres PI-1 je obecně zvyšována také indukcí methyl-jasmonátu a při působení kyseliny abscisové (Turra & Lorito, 2011).

2.3.2.2 Bramborový inhibitor II

Bramborový inhibitor 2 (PI-2, Pin2) neboli Bramborový inhibitor serinových proteas II (PSPI) je nejvíce zastoupeným proteinem v rámci bramborových PI's (Pouvreau, 2004). Je tvořen dvěma homologními podjednotkami o velikosti 10,2 kDa. Každá podjednotka je tvořena osmi cysteinovými vazbami, které tvoří čtyři disulfidické můstky. Jednotliví zástupci z této skupiny se mohou lišit svojí velikostí nebo složením protomeru. V bramborových hlízách bylo identifikováno celkem 7 isoform PI-2. Stejně jako PI-1 vykazuje inhibiční aktivitu vůči trypsinu i chymotrypsinu. V případě PI-2 dochází však na rozdíl od PI-1 k vyšší inhibici trypsinu na rozdíl od chymotrypsinu. U bramborového inhibitoru II byla zjištěna

antikarcinogenní aktivita způsobená inhibicí aktivity proteinu spojeného s tvorbou melanomů. Podobně jako patatin mají schopnost inhibovat cholecystokinin a tím způsobit navození sytosti (Pouvreau, 2004, Lapointe et al., 2016).

Geny exprimující PI-2 proteiny byly objeveny v květních pupenech brambor, v plodech rostlin *Solanum melongena* a *Lycopersicon peruvianum*, v květech *Nicotiana glauca*, ve stoncích a květech lilkovitých a ve stoncích, plodech a květech paprik. Stejně jako u PI-1 je exprese proteinů z této skupiny indukovaná vlivem prostředí v důsledku abiotických a biotických stresů. V bramborách dochází k expresi PI-2 v hlízách po celou dobu jejich růstu a jeho hladina klesá až při tvorbě hlízových klíčků. PI-2 proteiny slouží přirozeně k potlačení napadení hmyzími patogeny. Spolu s PI-1 byla prokázána jejich schopnost inhibovat růst fytopatogenních hub a bakterií (Turra & Lorito, 2011).

2.3.2.3 Bramborové inhibitory cysteinových proteas

Bramborové inhibitory cysteinových proteas (PCPI) jsou v hlízách zastoupeny nejméně v 9 isoformách. Ty se od sebe liší svojí molekulovou hmotností a soustřeďují se do dvou úrovní: 20,1 a 22,7 kDa. Isoelektrické body jednotlivých isoform se pohybují v poměrně velkém rozpětí 5,8-9,0 (Pouvreau, 2004). Bramborové inhibitory cysteinových proteas představují samostatnou skupinu, jejíž zástupci nejsou homologní s jinými známými inhibitory cysteinových proteas nebo se skupinou cystatinů. Jejich struktura se více podobá sojovému inhibitoru trypsinu Kunitzova typu (STI). Kromě inhibice cysteinových proteas, zejména papainu, vykazují některé proteiny v rámci této skupiny slabou inhibici trypsinu a chymotrypsinu. Tato schopnost, čili inhibovat proteasy více skupin, je mezi PIs poměrně vzácná (Gruden et al., 1997).

Inhibitory cysteinových proteas byly objeveny především u rostlin (brambory, kukuřice, rýže, sója, jablono), přítomné jsou však také u živočichů v případě některých savců. V bramborových hlízách se kromě inhibitorů cysteinových proteas s homologní sekvencí s proteiny Kunitzova typu, vyskytuje také další skupina inhibitorů cysteinových proteas - multicystatiny. Zástupci této skupiny mají 8 identických podjednotek a hmotnost celkového proteinu činí 85 kDa. Kromě hlíz brambor byly objeveny také v listech rajčete a semenech slunečnice. Multicystatiny mají homologní sekvence s živočišnými inhibitory cysteinových proteas (Pouvreau, 2004).

U PCPI bylo zjištěno také anti-metastatické působení díky schopnosti inhibovat invazi maligních buněk. Konkrétně bylo zjištěno působení bramborového inhibitoru cysteinových

proteas proti šíření buněk melanomu B16 u hlodavců. PCI se projevuje jako antagonist epidermálního růstového faktoru (EGF) díky vzájemné kompetici o vazbu k jeho receptoru EGFR (Kärenlampi & White, 2009).

Tab. 4: Rozdělení bramborových inhibitorů proteas do sedmi skupin podle jejich specifických vlastností a aktivit (upraveno podle Pouvreau, 2004).

název skupiny/proteinu	MH	podj.	pI	IA
Bramborový inhibitor proteas I (PI-1; Potato inhibitor I)	7,7-7,9	5	5,1-7,8	trypsin chymotrypsin elastasa
Bramborový inhibitor proteas II (PI-2, Potato inhibitor II)	10,2	2	5,5-6,9	trypsin chymotrypsin elastasa
Bramborový inhibitor cysteinových proteas (PCPI, Potato Cystein Protease Inhibitor)	20,1-22,8	1	5,8-9,0	papain trypsin chymotrypsin elastasa
Bramborový inhibitor aspartátových proteas (PAPI, Potato Aspartic Protease Inhibitor)	19,9-22,0	1	6,2-8,7	cathepsin D trypsin chymotrypsin elastasa
Bramborový inhibitor Kunitzova typu (PKPI, Potato Kunitz Protease Inhibitor)	20,2	1	8,0-9,0	trypsin chymotrypsin
Ostatní serinové inhibitory (OSPI, Other Serine Protease Inhibitor)	21,0-21,8	1-2	7,5-8,8	trypsin chymotrypsin elastasa
Bramborový inhibitor karboxypeptidasy (PCI, Potato Carboxypeptidase Inhibitor)	4,3	1	neurčeno	karboxipeptidasa A

MH - molekulová hmotnost [kDa], podj. - počet podjednotek, pI - isoelektrický bod, IA - inhibované proteasy

2.3.2.4 Bramborové inhibitory aspartátových proteas

V bramborových hlízách odrůdy *Elkana* byl zjištěn výskyt šesti různých inhibitorů aspartátových proteas. Molekulová hmotnost jednotlivých proteinů se pohybuje v rozmezí 19,9 až 22,0 kDa. Nejvýznamnější je inhibice proteasy cathepsinu D. Stejně jako PCPI však vykazuje také slabou inhibici chymotrypsinu a trypsinu (Bárta et al., 2015).

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.3.1, PAPI hrají významnou roli v inhibici růstu fytopatogenních hub. Díky struktuře HIV-1 proteasy by právě PAPI mohly hrát roli v potlačení replikace viru HIV (Fischer et al., 2015).

2.3.2.5 Bramborové inhibitory proteas Kunitzova typu

Bramborové inhibitory proteas Kunitzova typu (PKPI) tvoří dva monomerické proteiny o velikosti 20,2 kDa. Vykazují slabou inhibici vůči trypsinu a chymotrypsinu. Isoelektrické body těchto isoform jsou 8,0-9,0. Samostatně tyto dva proteiny představují asi 4 % celkových proteinů hlízové vody (Pouvreau, 2004). Tyto bramborové inhibitory Kunitzova typu se v přímém členění bramborových inhibitorů dle Pouvreau nezařazují do široké skupiny inhibitorů proteas Kunitzova typu, ale jsou jejich samostatnou podskupinou. Podle použitých imunochemických metod bylo zjištěno, že přibližně 70 % PIs přítomných v bramborových hlízách patří právě mezi Inhibitory Kunitzova typu a řadí se mezi ně například PSPI (PI-2), (Pouvreau, 2003).

Podle jiných studií je však samotná skupina PKPI širší a patří do ní více bramborových PIs, například PKPI-21 (21 kDa), PKPI-22 (22 kDa) a PCPI-23 (23 kDa). Tyto PIs jsou homologní s jinými rostlinnými inhibitory společně patřící do skupiny sojového inhibitoru Kunitzova typu (Valueva e al., 1998). Obecně do podskupiny proteinů Kunitzova typu také patří různé bramborové inhibitory proteas, například inhibitory trypsinu a/nebo chymotrypsinu, inhibitor subtilisinu, inhibitor cathepsinu D a trypsinu, inhibitor papainu a/nebo cathepsinu L (Valueva et al., 2000). Proteiny PSPI-21 a PSPI-22 jsou však podle Pouvreau (2004) řazeny již do skupiny ostatních inhibitorů serinových proteas (OSPI).

2.3.2.6 Ostatní inhibitory serinových proteas

Mezi ostatní inhibitory serinových proteas (OSPI) patří proteiny PSPI-21 (21 kDa), který je inhibitorem lidské leukocytové elastasy a inhibitor s molekulovou hmotností 22 kDa, označený jako inhibitor PSPI-22 (Pouvreau, 2004). Proteiny inhibují slabě trypsin a chymotrypsin. Významnějším způsobem však dochází k inhibici lidské leukocytové elastasy. PSPI-21 je zastoupena dvěma isoformami o hodnotách pI 6,3 a 5,2 a rozdílnou aminokyselinovou sekvencí. Obě isoformy jsou tvořeny dvěma heterogenními podjednotkami spojenými jednou disulfidickou vazbou (Valueva et al., 1998; Valueva et al., 2001).

2.3.2.7 Bramborové inhibitory karboxypeptidasy

Skupina bramborového karboxypeptidasového inhibitoru (PCI) je zastoupena pouze jedním proteinem. Jeho struktura je tvořena jednou globulární podjednotkou obsahující 3 disulfidické můstky (Chang et al., 1994). S molekulovou hmotností 4,3 kDa a polypeptidovým řetězcem složeným pouze z 39 aminokyselin se tak jedná o nejmenší bramborový PI. PCI se vyznačuje také vysokou mírou termostability (Bártová et al., 2012). Stejně jako ostatní bramborové PIs, hraje roli v přirozené obraně proti fytopatogenním mikroorganismům. Kromě standardních obranných mechanismů byla však u PCI, podobně jako u PCPI, experimentálně zjištěna také jeho schopnost inhibovat růst nádorových buněk adenokarcinomu slinivky břišní u člověka. Kromě působení proti růstu adenokarcinomu slinivky kompetuje PCI s EGF, což by mohlo mít v budoucnosti význam při výzkumu léčby rakoviny plic, prostaty, prsů nebo tlustého střeva (González et al., 2003; Blanco-Aparicio, 1998). Kromě uvedených PIs, byly objeveny specifické PIs inhibující proteasy s threoninem (Powers et al. 2002) nebo glutaminem (Baldisserotto et al., 2007) v aktivním místě.

2.4 Proteinové izoláty

Vhodným zdrojem pro izolaci hlízových proteinů je průmyslová hlízová voda (PFJ, *Potato fruit juice*), která vzniká jako vedlejší produkt při výrobě škrobu. Bramborová hlízová voda obsahuje přibližně 4-5 % sušiny, přičemž 27 % sušiny představují bílkoviny. Koncentrace proteinů v průmyslové hlízové vodě tedy činí průměrně 13,4 g/l (Konigsveld et al., 2001). V České republice je v současné době průmyslová hlízová voda pro účely izolace proteinů využívána ve škrobárně Lyckeby Amylex (Horažďovice), která tvoří majoritní podíl v oblasti výroby bramborového škrobu v České republice. V zemích západní Evropy je však ve škrobárnách již běžně zpracovávána pro získávání vysoce nutričně hodnotných, avšak denaturovaných, proteinů prostřednictvím tepelné koagulace (Shoenbeck et al., 2013). Takto získané bílkovinné koncentráty se uplatňují nejčastěji v krmivářství.

Proteinové izoláty z brambor mohou mít široké využití. Izoláty typu tepelného koagulátu jsou často využívány při výkrmu hospodářských zvířat. Izoláty v nativním stavu se vyznačují svou vysokou nutriční hodnotou. Při výkrmu odstavených prasat byl prokázán jejich pozitivní efekt na váhový přírůstek a redukci patogenních bakterií (Jin et al., 2008). Bramborové proteinové koncentráty mohou být díky pozitivnímu efektu, zejména díky

vysoké stravitelnosti a vysoké nutriční hodnotě, využité také jako bezmasá složka krmiva ve výživě lososů (Refstie & Tiekstra, 2003).

V současnosti však probíhá snaha k získávání hlízových proteinů, v nativním stavu za současného odstranění antinutričních faktorů (alkaloidy a jiné antinutriční látky) jinými způsoby, například pomocí membránových a chromatografických technik (Løkraa et al., 2008). Takto získané proteiny by bylo možné v blízké budoucnosti využít v potravinářském, případně kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Biologická hodnota bílkovin hlíz bramboru je vysoká, v rozmezí hodnot 90-100. Pro srovnání, biologická hodnota bílkovin vajec, sóji a fazolu odpovídá hodnotám 100, 84 a 73 (Lynch, 2011).

Průmyslově se do současné doby podařilo společnosti Solanic, jež je dceřinou společností škrobárenského koncernu AVEBE, získat tři typy nativních izolátů hlízových proteinů. Jedná se o izoláty nativních proteinů s vysokou molekulární hmotností nad 35 kDa (HMW, *High molecular weight*), která je zastoupená zejména patatinem. Dalším typem je izolát s převažujícím obsahem nativních nízkomolekulárních bílkovin pod 35 kDa (LMW, *Low molecular weight*), přičemž tento izolát je tvořen především inhibitory proteas (Giuseppin et al., 2013). Posledním typem je izolát celkového proteinu (patatinu i PIs) v denaturovaném či nativním stavu (TP, *Total protein*), který obsahuje oba typy proteinů v přibližně vyrovnaném poměru.

Nutriční hodnota bílkovinných izolátů ovlivňuje několik faktorů. Jedná se zejména o aminokyselinové složení, obsah volných aminokyselin a obsah antinutričních látek, zejména glykoalkaloidů (Pastuszewska et al., 2009). Pomocí jílových adsorbentů použitých jako náplň kolon při kolonové chromatografii lze však docílit odstranění většiny glykoalkaloidů z proteinových frakcí získaných z PFJ. Tímto krokem můžeme docílit izolace proteinů za většinového odstranění tohoto antinutričního faktoru (Ralla et al., 2012).

Produkty *Solanic S200* a *Patissionate S301P* představují další krok při zpracování hlízové vody pro izolaci bílkovin a jejich následného využití. Jedná se o izoláty bílkovin v nativním nedenaturovaném nebo pouze částečně denaturovaném stavu, což umožňuje jejich využití v potravinářství a kosmetickém průmyslu. Díky odstranění většiny obsahu glykoalkaloidů byla prokázána zdravotní nezávadnost těchto produktů (Lynch et al., 2012).

Výrazné želírovací a emulgační schopnosti a vysoká pěnivost a rozpustnost těchto izolátů zvyšuje jejich využitelnost v potravinách a potravinářských produktech. Vysoká pěnivost umožňuje použití těchto izolátů jako vhodné alternativy k sněhu vaječného bílku. Díky vysoké želírovací schopnosti můžeme těmito produkty nahradit želatinu. Emulgační vlastnosti lze využít při výrobě dresinků, zmrzlin nebo smetany (Alting & Pouvreau, 2011).

Schopnost tvořit pěnu může být navíc zlepšena vnášením plynného dusíku (N₂). Pěna vzniklá vnesením dusíku a vzduchu, vykazovala vyšší stabilitu vlivem tvorby menších bublin (Lomolino et al., 2015).

Podle patentu vlastněného společností Solanic (AVEBE) lze využít izolát typu LMW od společnosti Solanic následujícími způsoby (Giuseppin et al., 2013):

- a) výroba holicích pěn a zvlhčovač při podráždění pokožky
- b) součást potravin a nápojů používaných při dietách a při léčbě gastro-intestiálních chorob (proteolytická aktivita) a také léčbě či prevenci obezity (díky schopnosti navození pocitu sytosti)
- c) v kosmetickém průmyslu - inhibice mikroorganismů vyvolávající dermatologické problémy, např. akné

Kromě výše zmíněných izolátů nabízí společnost Bioriginal (Kanada) produkt Solathin. Jedná se izolát bramborových inhibitorů proteas, přičemž majoritní podíl (40 %) tohoto izolátu tvoří PI-2. Tento bílkovinný izolát nachází využití především jako dietický doplněk stravy. Obsažené inhibitory proteas vlivem inhibice cystokininu v důsledku zvyšují pocit nasycení a naopak snižují příjem potravy. Způsob výroby tohoto izolátu výrobce neuvádí.

2.5 Možnosti separace bílkovin hlíz bramboru

Bílkoviny hlíz bramboru je možno izolovat a separovat několika způsoby s ohledem na to, jaké proteiny či jejich skupiny chceme izolovat a v jakém stavu či množství chceme dané proteiny získat. Rozdílné metody izolace a purifikace budeme volit v případě průmyslové izolace a jiné v laboratorních podmínkách. Průmyslové metody izolace se soustřeďují na získání izolátů obsahující celé spektrum hlízových proteinů nebo v oddělené formě patatin či inhibitory proteas za co nejjednodušších podmínek izolace ve velkém množství. V laboratorních podmínkách lze většinou snadno simulovat podmínky průmyslové izolace. Oproti průmyslovému měřítku je možné izolovat a separovat proteiny z více typů výchozího materiálu, detailněji a získat tak skupiny a podskupiny proteinů či konkrétní zástupce v rámci těchto skupin pomocí více způsobů.

2.5.1 Průmyslová izolace a separace

Výchozím materiálem pro získávání proteinů hlíz brambor je průmyslová hlízová voda vznikající jako vedlejší produkt při zpracování brambor na škrob. Při průmyslové izolaci nesmí být výroba izolátů příliš nákladná, tak aby byla zajištěna rentabilita produkce. Základním kritériem pro volbu metody průmyslové izolace bílkovin hlíz je účel použití konkrétního typu izolátu. Možnosti využití jsou dány parametry finálního izolátu, které jsou určeny stavem samotných proteinů. V zásadě je třeba odlišovat, zda jsou bílkoviny v nativní formě či v opačném případě, zda a do jaké míry jsou denaturované. Samotný stav proteinů poté ovlivňuje jejich enzymatické či jiné aktivity, například antimikrobiální působení, stravitelnost, rozpustnost, pěnovost, emulgační schopnosti či některé senzorické vlastnosti izolátů. Tyto jednotlivé či souhrnné vlastnosti ovlivňují využitelnost proteinů v konkrétních aplikacích. Obecně lze tedy rozdělit průmyslové izoláty určené pro krmné (případně i výživové) nebo souhrnně potravinářské a další využití.

2.5.1.1 Izolace proteinů pro krmivářské využití

Nejstarším a stále nejrozšířenějším způsobem průmyslové izolace hlízových proteinů, zejména pro krmné účely, je tepelná koagulace, často ve spojení s isoelektrickou precipitací. Tato metoda má díky její rozšířenosti mnoho modifikací. Jeden ze způsobů provedení této kombinované metody probíhá v prvním kroku úpravou hodnoty pH původní PFJ pomocí anorganické kyseliny na hodnotu 4,8-5,2 což je rozmezí pH pokrývající hodnoty isoelektrických bodů patatinu a velké části PIs. V dalším kroku proběhne teplotní denaturace. Ta je nejčastěji zprostředkována zahříváním PFJ pomocí tepelných výměníků (80-95 °C) nebo využitím parních injektorů (104-121 °C). V důsledku působení vysoké teploty a isoelektrické precipitace dojde k vysrážení až 90 % bílkovin obsažených v PFJ. Výhodou této metody je vysoký obsah proteinů v izolátu a optimalizovaná technologie tohoto způsobu izolace. Inovovaný způsob této izolace zajišťuje také odstranění většiny obsahu glykoalkaloidů což umožňuje využití tohoto typu izolátu v krmivářství. Mezi nevýhody patří zejména zisk denaturovaných (koagulovaných) bílkovin a minimální rozpustnost. Takto získané proteiny jsou využívány pro krmné účely (Bárta et al., 2015; (Løkraa & Strætkevren, 2009; Kerr et al., 2009. Jejich využití v potravinářství či pro lidskou výživu je, díky narušeným či zničeným biologickým aktivitám a funkčním vlastnostem, komplikované.

Mezi další způsoby izolace precipitace proteinů z PFJ patří srážení síranem amonným, organickými rozpouštědly nebo ionty kovů. Jedná se o poměrně šetrné způsoby zachovávající ve větší či menší míře biologické aktivity proteinů v nativním stavu. Nevýhodami těchto precipitačních metod je značná finanční náročnost z hlediska vstupního materiálu a technologická náročnost při následném odstraňování solí či kovových iontů (Waglay et al., 2014, Bárta et al., 2015).

2.5.1.2 Izolace proteinů pro potravinářské využití

Vzhledem ke zmiňovaným výhodám a pozitivním vlastnostem hlízových bílkovin probíhá snaha o vytváření nových způsobů a inovací pro izolaci těchto bílkovin ve stavu vhodném pro potravinářské využití. Pro využití PIs v potravinářství, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu je nutné zohlednit několik faktorů: Získat bílkoviny ekonomicky rentabilním způsobem v nativním stavu za současného odstranění antinutričních faktorů, zejména glykoalkaloidů. Metody umožňující právě takovou izolaci můžeme rozdělit mezi chromatografické a membránové techniky.

V současné době se izolací bramborových bílkovin pro potravinářské účely zabývá pouze společnost Solanic, která je dceřinou společností škrobářenského koncernu AVEBE. Izolace proteinů z brambor probíhá pomocí několika kroků v rámci vícemodální adsorpční chromatografie, která je kombinována s ultrafiltrací pro zakoncentrování proteinů. V patentové přihlášce je uváděný postup izolace a purifikace hlízových proteinů, nicméně materiál adsorbentu v kolonovém systému znám není. Postup izolace se skládá z ekvilibrace kolony pufrům, úpravy pH PFJ, navázání proteinů na adsorbent, elucí patatinu pomocí jednoho pufru, elucí inhibitorů proteas pomocí jiného pufru. Zakoncentrování inhibitorů proteas bylo provedeno pomocí procesu ultrafiltrace. Frakce PIs jsou v následném kroku dialyzovány. Pomocí sprejového sušení je následně získán finální izolát ve formě prášku. (Giuseppin et al., 2012).

Kombinace membránových technik a ultracentrifugace umožňuje izolaci a separaci hlízových bílkovin v nativním stavu ve vysoké čistotě za odstranění obsahu glykoalkaloidů. Mezi nevýhody těchto metod patří zejména nutnost optimalizace účinných technologií pro izolaci bílkovin a s nimi spojená finanční náročnost z hlediska vstupních investic. Je však očekávána vysoká návratnost investic.

2.5.2 Experimentální izolace a separace

Výhodami izolace a separace hlízových bílkovin je více možností a způsobů izolace pomocí různých metod. Pro izolaci lze využít průmyslovou hlízovou vodu, bramborovou šťávu získanou z čerstvých hlíz, ale také lyofilizované části hlíz či pro jednotlivé proteiny také frakce bílkovin získané pomocí chromatografických či elektroforetických metod. Z konkrétních metod jsou kromě různých způsobů srážení využívány chromatografické a ultrafiltrační metody pro izolaci, případně jejich kombinace.

2.5.2.1 Ultrafiltrace a reverzní osmóza

Ultrafiltrace a reverzní osmóza jsou jednoduchými způsoby izolace hlízových bílkovin z PFJ využívající membrány s různě velkými póry. Umožňuje tedy izolaci proteinů podle jejich velikosti. Ve škrobárnách je využívána reverzní osmóza pro prekoncentraci před tepelnou koagulací. Výhodou tohoto postupu je jeho nenáročnost a zachování nativního stavu izolovaných proteinů, jsou zachovány funkční vlastnosti proteinů a jejich biologické aktivity (Zwijnenberg et al., 2002). Nevýhodou je nízká selektivita znemožňující například rozdělení jednotlivých skupin PIs a vyšší časová náročnost samotné separace. Mezi další nevýhody patří nízká životnost membrán a jejich zanášení.

2.5.2.2 Kombinované techniky purifikace a separace

Důležitým kritériem pro výběr chromatografické techniky je podmínka, zda chceme získat frakce proteinů, či konkrétní purifikované bílkoviny. Před detailní izolací PIs a isoformů patatinu většinou probíhá předseparace. Tu lze provádět více způsoby. Jedním způsobem je předseparace pomocí kolony gelové permeační chromatografie (Obr. 1) dle Pouvreau (2004), kdy dochází k rozdělení hlízových proteinů do tří frakcí. Dvě frakce obsahují pouze inhibitory proteas, přičemž jedna z frakcí je tvořena dvěma majoritními subfrakcemi. Jedná se o PI-1 a proteiny patatinového komplexu. Podle techniky provedené autory Melville a Ryan (1972) lze zahřátím společné frakce na 80 °C po dobu 5-6 minut oddělit termostabilní PIs a termolabilní patatin. Po následné filtraci pomocí 0,22 µm filtru dochází k získání čisté frakce PI-1. Ostatní frakce po separaci na gelové permeační koloně již obsahují purifikované frakce PIs.

Další, poměrně sofistikovaný postup purifikace patatinu a PIs byl proveden podle metody autora Bauw et al. (2006). Nejprve byly proteiny extrahovány z bramborové mouky pomocí extrakčního pufru, v dalším kroku došlo k jejich precipitaci pomocí octanu amonného a ethanolu. V průběhu extrakce byl celkový protein v několika krocích rozpuštěn a srážen a následně byla provedena 2D elektroforéza. Tato technika umožňuje rozdělení proteinů

podle jejich pI a následně podle molekulové hmotnosti. Po elektroforéze byly vyříznuty jednotlivé pruhy proteinových frakcí a byla provedena jejich digesce. Tyto frakce byly analyzovány pomocí technik MS. Nevýhodou tohoto postupu je především nemožnost jeho použití pro získání většího množství proteinů, tento způsob je tedy použitelný pouze pro analytické účely.

Novou metodou izolace a předseparace hlízových bílkovin z PFJ je odpařování při nízké teplotě a následná precipitace bílkovin pomocí ethanolu. V prvním kroku dojde k zakoncentrování PFJ pomocí odpařování za využití rotační vakuové odparky při nízké teplotě (40 °C, 35 mbar), tak aby nedošlo k narušení biologických aktivit. Ve druhém kroku dochází k precipitaci v 48 % roztoku ethanolu. Dojde k denaturaci a precipitaci přibližně 62 % hlízových bílkovin. Zatímco u patatinu a ostatních hlízových proteinů dochází k ireverzibilní denaturaci, u některých PIs je denaturace reverzibilní. Následně jsou precipitované proteiny resolubilizovány ve 100 mM roztoku fosforečnanu sodného. Resolubilizací bylo v rámci uvedeného výzkumu získáno přibližně 12 % proteinů z bílkovinného precipitátu. Pomocí SDS-PAGE bylo zjištěno, že rozpustná frakce je zastoupena převážně termolabilními PIs se zachovanou inhibiční aktivitou vůči trypsinu a jen minimálním obsahem patatinu (Taskila et al., 2017).

Posledním způsobem purifikace patatinu a PIs, který je využit v rámci této disertační práce, představuje dvoustupňová chromatografická purifikace dle metodiky autorů Racusen & Foote (1980). Pomocí tohoto postupu lze za použití dvou oddělených chromatografických separací získat čtyři samostatné frakce majoritních proteinů brambor. Díky iontové výměnnému, nejčastěji celulosovému mediu, lze rozdělit bazické frakce PIs od společného komplexu kyselých PIs a patatinu. Ve druhém kroku lze společnou frakci za využití media s afinitním ligandem typu Konkanavalin A rozdělit kyselé frakce PIs a proteiny patatinového komplexu (Bártová et al., 2009).

2.5.2.3 Separace pomocí chromatografického systému FPLC

Z hlediska separace PIs na jednotlivé skupiny, nikoli však jednotlivé proteiny, lze nejnadhěji dosáhnout rozdělení pomocí kapalinové chromatografie. Systém FPLC a využití kolon fungujících na různém principu separace jsme schopni rozdělit jednotlivé skupiny PIs podle jejich konkrétních vlastností. Vysokorychlostní kapalinová chromatografie (FPLC, *Fast protein liquid chromatography*) je v současné době široce rozšířeným automatizovaným systémem chromatografie pro separaci biopolymerů, nejčastěji proteinů a nukleových kyselin. Chromatograf typu FPLC byl poprvé použit v roce 1982 ve Švédsku jako upravený systém HPLC (Fägerstam et al., 1983). FPLC se zásadním způsobem odlišuje od HPLC především díky použití nižších tlaků, maximálně do hodnoty 5 MPa. Díky tomu je šetrnější při separaci makromolekul a nedochází tím pádem k poškození řetězce proteinů či peptidů (Madadlou et al., 2011).

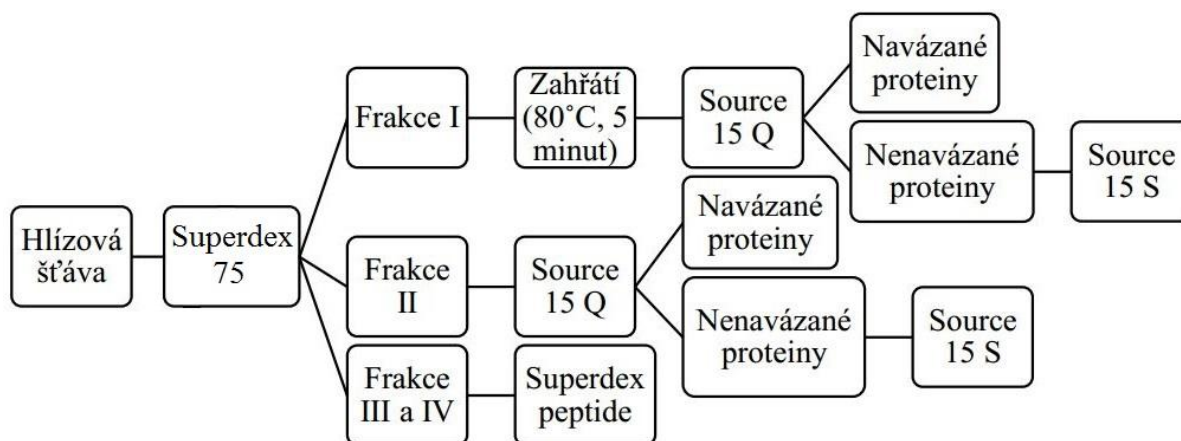
Iontově výměnná chromatografie

Pomocí iontově výměnné chromatografie (IEX, *Ion exchange chromatography*) lze rozdělovat PIs díky heterogenitě jejich isoelektrických bodů, čili na bazické a kyselé. Principem iontově výměnné chromatografie je výměna mezi ionty s kladným či záporným nábojem a opačně nabitými funkčními skupinami (ligandy), které jsou navázány na matici a společně tvoří stacionární fázi kolony. Proteiny a peptidy mají amfoterní charakter, jejich náboj a síla vazby na ligand jsou ovlivňovány pH prostředí (zvoleným pufrém). Síla vazby je navíc také 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 (Bárta, 2013).

K rozdělení na základě iontových interakcí lze použít několik dostupných iontově výměnných kolon, jejichž lože je tvořeno náplní nebo monolitem. Pouvreau (2004) použila ve své studii pro separaci PIs náplňové kolony s iontovými měniči Source 15 Q/S (Obr. 1). Medium tohoto typu je tvořeno syntetickou pryskyřicí, složenou z 15 μm velkých částic tvořících společně polystyren/divinyl benzenovou maticí. V případě měniče aniontů tvoří funkční skupiny (ligandy) kvartérní amonné skupiny, u měniče kationtů je ligand tvořen sulfonátovými kladně nabitými skupinami (GE Healthcare). Výhodou použití klasických náplní může být, v některých případech, vysoká míra rozlišení chromatografické separace a možnost výměny náplňového media v případě potřeby. Nevýhodou využití náplňových kolon

Lze spatřovat v nemožnosti použití vyššího průtoku mobilní fáze se vzorkem. Použití příliš vyšší průtokové rychlosti tak vede k zadržování vzorku v mezičásticových prostorech, narůstání tlaku v prostředí kolony a možnému poškození media, potažmo kolony nebo chromatografického systému. Nutnost použití nižší průtokové rychlosti může výrazně prodlužovat dobu separace, což může například snižovat použitelnost separace pro preparativní účely.

Obr. 1: Schéma jednoho ze způsobů chromatografické separace bramborových PIs na systému FPLC (upraveno podle Pouvreau, 2004)



Superdex 75/ peptide - kolony typu SEC, Source 15 Q/S - kolony typu IEX (GE Healthcare, UK)

Ve studiích prováděných autory Lorenc & Bárta (2017) a Bárta et al. (2013) bylo použito pro separaci PIs chromatografický systém FPLC v kombinaci iontově výměnnými kolonami UNO Q/S (Bio-Rad, USA). Kolony UNO se z hlediska svojí struktury řadí mezi monolitické kolony. Obsahují náplně ve formě komprimovaných gelů, konkrétně jsou to kopolymery methakrylamidových monomerů (Švec, 2004). Ligandy navázané na matici, stejně jako v případě kolon Source 15, představují u anexu kvartérní amonné skupiny a u katexu sulfonátové skupiny. Výhodou monolitických kolon oproti klasickým náplňovým kolonám představuje absence mezi-částicových prostor, mobilní fáze tedy musí nutně protékat póry monolitu. U kolon, jejichž náplň je tvořena monolitem, se nejčastěji vyskytují dva typy pórů. Velké póry (makropory) umožňují rychlý průtok mobilní fáze, přičemž střední póry (mesopory) poskytují dostatečně velký povrch pro vysokou adsorpční kapacitu. Konvektivní průtok póry u monolitických kolon umožňuje při separaci, v porovnání s kolonami náplňového typu, u nichž dochází k difúzi, využití vyšší průtokové rychlosti mobilní fáze bez nežádoucího zvyšování tlaku a vyšší propustnost, danou nižším odporem přenášených

látek. V kombinaci těchto vlastností monolitických kolon s využitím gradientové eluce dochází k rychlejší a účinnější separaci velkých molekul, například proteinů, nukleových kyselin nebo syntetických polymerů (Vojta et al., 2014; Švec, 2004; Ramírez-Palomino, 2014).

Gelová permeační chromatografie

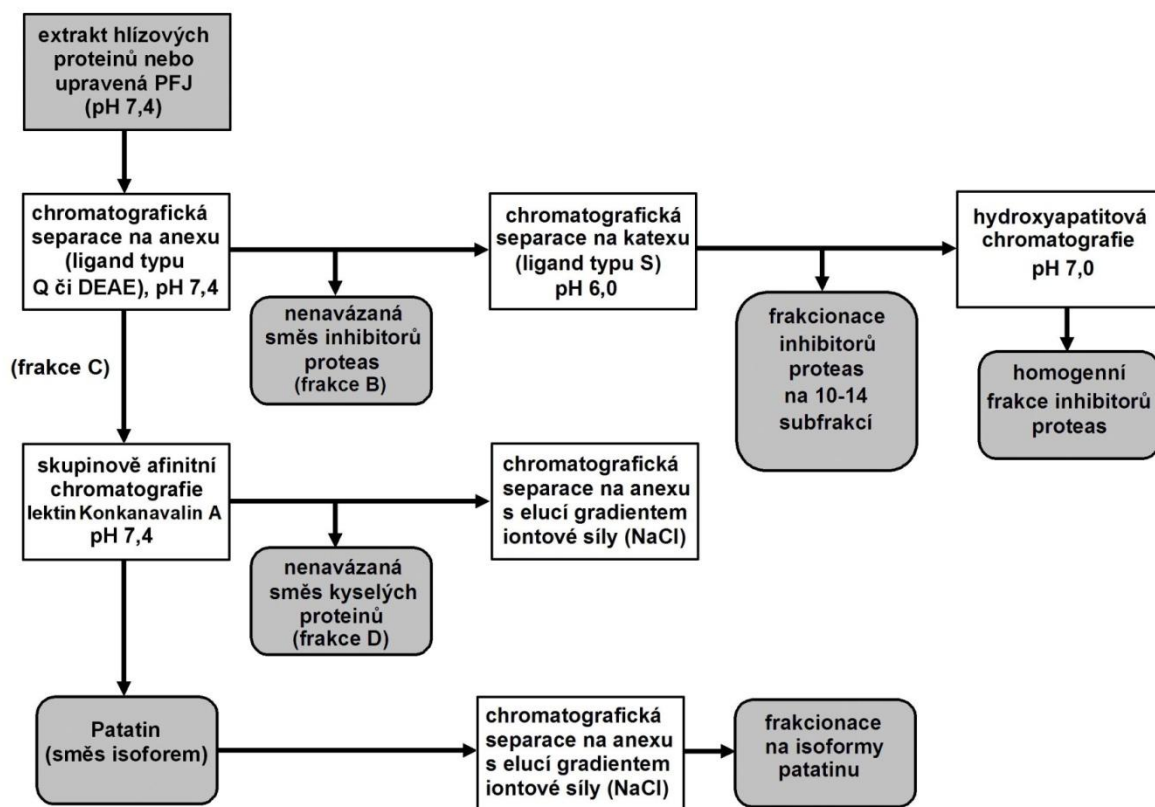
Gelová permeační chromatografie (GPC, *Gel permeation chromatography*) nebo také jinak SEC (*Size exclusion chromatography*) umožňuje separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Je možné podle ní separovat podle rozměrů jak vysokomolekulární, tak nízkomolekulární látky. Stacionární fázi těchto kolon tvoří matrice uniformních gelových kuliček (tzv. partikulí). Malé molekuly jsou zachycovány na stacionární fázi a pronikají do pórů matrice gelových částic, přičemž velké molekuly nemohou projít póry a tím pádem dochází k jejich rychlejší eluci. U velkých molekul tedy klesá difuze a vazba na matici. Velké molekuly opouští tedy kolonu nejdříve a následně dochází k postupné eluci menších molekul (Churáček, 1990). Společně s elektroforézou a RP-HPLC se jedná o nejrozšířenější techniku pro analýzu a kontrolu čistoty proteinů. Kromě určení molekulové hmotnosti byla GPC využita také k znovuskládání proteinů (Ejima et al., 2005).

Pomocí GPC můžeme provádět jak frakcionaci, tak skupinovou separaci. Při frakcionaci dochází k separaci proteinů podle malých rozdílů v molekulové hmotnosti. Při skupinové separaci provádíme dělení proteinů do dvou skupin na proteiny s nízkou a vysokou MW. Hlavní výhodou GPC je, že lze s její pomocí separovat směs proteinů lišící se svojí molekulovou hmotností ve velmi malém i velkém množství v nativní, nedenaturující podobě. Nevýhodou těchto kolon však může být poměrně malá rozlišovací schopnost a stejně jako v případě náplňových iontově výměnných kolon nemožnost využití vyšších průtoků, což významně prodlužuje délku separace a může ovlivňovat původně nativní stav proteinů. (Aguilar, 2004).

Kolony typu ENrich SEC (Bio-Rad, USA) představují moderní typ kolon využívající medium tvořené 10 μm velkými částicemi. Toto medium poskytuje dobré rozlišení chromatografické separace při nízkém tlaku v systému. Oproti jiným GPC kolonám poskytují kolony ENrich také při vyšším průtoku poměrně slušné rozlišení za relativně nízkého zpětného tlaku. Alternativu ke kolonám ENrich představují kolony řady Superdex od společnosti GE Healthcare (USA) jejichž medium je tvořeno 13 μm velkými částicemi. Ostatní parametry jsou podobné kolonám ENrich SEC.

Kolony gelové permeační chromatografie mohou v kombinaci s FPLC představovat účinný krok například při předseparaci bramborových PIs. Do současné doby není popsána studie zabývající se detailní separací jednotlivých frakcí PIs pomocí kolon gelové permeační chromatografie. Díky možnosti dělit proteiny podle molekulové hmotnosti se však nabízí potenciál pro využití těchto kolon při detailnější separaci PIs.

Obr. 2: Schéma chromatografické purifikační strategie podle Barty et al. (2013)



Afinitní chromatografie

Principem afinitní chromatografie (AC, *Affinity chromatography*) je využití specifických vlastností biologicky aktivních látek pro vytvoření stabilních a reverzibilních komplexů pomocí biospecifických interakcí spolu s ligandy, jež jsou součástí stacionární fáze chromatografické kolony. Díky afinitě konkrétní látky k ligandu, například proteinu, lze tuto látku pomocí reverzibilní vazby selektivně izolovat (Atasever et al., 2013). V literatuře však dosud nebyla popsána separace bramborových PIs pomocí kolon pracujících samostatně v afinitním režimu. Pro separaci bazických inhibitorů proteas je možné použít kolony

kombinující iontově výměnnou a afinitní chromatografii (Bárta et al., 2013; Lorenc, 2013). Kolony typu CHT5-I obsahují hydroxyapatitové medium, přičemž princip působení toho media zahrnuje nespecifické interakce mezi pozitivně nabitými vápenatými ionty a negativně nabitými fosfátovými ionty stacionární fáze s negativně nabitými karboxylovými a pozitivně nabitými amino skupinami proteinů. Efektivita separačního procesu by měla být optimalizována sférickým keramickým uspořádáním media, vylepšující fyzikální a chemickou nestabilitu původní krystalické formy hydroxyapatitu (Bárta et al., 2013). Tento typ chromatografie je doporučován pro pozdní fáze separačního procesu, což by mohlo být považováno jako nevýhoda. Naopak z hlediska určité specifické separace daných tímto typem media a kombinací dvou principů kapalinové chromatografie by mohly tyto typy kolon nabídnout vyšší rozlišení chromatografické separace.

2.6. Možnosti využití inhibitorů proteas

Inhibitory proteas mají díky svým vlastnostem a funkcím potenciál pro své využití v mnoha oblastech lidského usilování. Inhibitory proteas již v současnosti nacházejí uplatnění v potravinářství a medicíně. Díky svému antimikrobiálnímu a proteolytickému působení lze také předpokládat jejich využití v rostlinolékařství nebo kosmetickém průmyslu.

2.6.1 Potravinářství a krmivářství

Inhibitory proteas ve formě bílkovinných izolátů (izoláty typu LMW) lze uplatnit v lidské výživě a potravinářství. Avšak z důvodu jejich schopnosti inhibovat proteolytické enzymy, musí být pro zachování zdravotní nezávadnosti odstraněna nebo alespoň snížena jejich inhibiční aktivita právě v oblastech lidské výživy.

V současné době jsou již na trhu dostupné některé bramborové izoláty s převažujícím obsahem PIs. LMW izolát od společnosti Solanic - *Patissionate 301* lze díky vysoké pěnotvorné kapacitě PIs použít pro tvorbu potravinářských pěn. Lze ho tedy použít jako náhražku bílkového sněhu například pro vegany. Díky svým výrazným želírovacím schopnostem je možno využít je také místo pektinu. Produkty společnosti Solanic se uplatní ve veganské stravě a navíc splňují košer a halal certifikaci, což umožňuje použití těchto izolátů v židovské a arabské kuchyni (AVEBE, Solanic). Další komerční izolát bramborových proteinů typu LMW je produkt SolaThin společnosti Bioriginal (Kanada) zmíněný v kapitole

2.4 obsahující především PI-2 (40 % obsahu izolátu). Proteiny v rámci tohoto izolátu mají kromě samotné výživové funkce zachovány schopnost inhibice cholecystokininu (kapitola 6.2), čímž je usnadněna redukce příjmu potravy při dietách. Zachovaná enzymatická aktivita ale může naopak prostřednictvím inhibice trávicích enzymů způsobovat zažívací potíže. Obecně by bylo možné využít bramborové inhibitory proteas v nativním stavu, díky jejich antimikrobiálnímu potenciálu, rovněž jako konzervanty při ochraně čerstvých potravin.

Význam inhibitorů proteas by mohl být i v krmivářství. Bylo prokázáno, že bílkoviny z hlíz brambor v nativním stavu inhibují koliformní bakterie v zažívacím traktu kuřat (Ohh et al., 2009). Bramborové inhibitory proteas ve formě proteinových izolátů by tedy mohli být součástí krmných směsí pro hospodářská zvířata při dietách, zejména při infekčních onemocněních trávicího ústrojí. Bylo zjištěno, že inhibitory proteas Kunitzova typu inhibují mimo proteas také invertasu, čímž nepřímo ovlivňují obsah glukózy a fruktózy v bramborových hlízách (Glaczinski et al., 2002).

2.6.2 Medicína

Velmi významné je využití a potenciál inhibitorů proteas v medicíně. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.1, v praxi se inhibitory proteas výrazně uplatňují při léčbě virových onemocnění, zejména AIDS. Inhibitory proteas, včetně zástupců izolovaných bramborových hlíz představují jednu ze skupin léčiv využívaných při léčbě tohoto syndromu. Díky inhibici virové proteasy HIV asparátátového typu zabraňuje maturaci viru a jeho následné replikaci. Největší význam tedy hrají zejména inhibitory aspartátových proteas, které jsou v rámci bramborových PIs také zastoupeny (Fischer et al., 2015; Gebhardt & Fischer, 2014).

V rámci dalších výzkumů v oblasti lékařství bylo prokázáno působení PIs na snížení tělesné hmotnosti při léčbě obezity, ošetření peri-análních kožních zánětů, trombotických chorob, léčbě kandidóz a nádorových onemocnění (Bárta et al., 2015).

Bramborové PIs jsou schopny inhibovat cholecystokinin. Cholecystokinin je peptidický hormon, k jehož produkci dochází v tenkém střevu při nasycení. Jeho produkce zvyšuje tvorbu pankreatické šťávy ze slinivky, která je tvořena zejména trávicími enzymy. Při inhibici cholecystokininu dochází tedy k potlačení tvorby pankreatické šťávy což má za následek zpomalení vyprazdňování žaludku, delší pocit nasycení a dochází tím pádem ke snížení příjmu potravy (Pokorný, 2001; Bárta et al., 2015). Potenciální využití bramborových PIs při léčbě obezity zvyšuje také jejich schopnosti inhibovat specializované buňky 3T3-L1 umožňujících syntézu a akumulaci triacylglycerolů, jakožto hlavní složku živočišných

tukových buněk (Sun et al., 2013). Další uplatnění v oblasti následků způsobených obezitou se nabízí také u hydrolyzátů bramborových proteinů. Experimentálně byla prokázána schopnost těchto hydrolyzátů inhibovat apoptózu jaterních buněk a poškození jater u krys, které bylo způsobeno jaterní fibrózou. Tato nemoc byla způsobena indukovanou obezitou (Chiang et al., 2016).

Jak již bylo zmíněno, hlavním účelem výskytu inhibitorů proteas v bramborových hlízách je zejména jejich antimikrobiální působení, které bylo experimentálně prokázáno na řadě mikrobiálních patogenů způsobujících onemocnění člověka (kapitola 3.1). Samotné antimikrobiální působení PIs tedy nabízí velký potenciál pro jeho využití v oblasti rostlinolékařství a potravinářství. Inhibitory proteas teda mají například schopnost výrazně omezovat proteolytickou aktivitu stolice. Zvýšené množství proteas ve stolici pacientů může způsobovat vznik kožních zánětů v oblasti konečníků. Aplikace PIs proto může preventivně či akutně působit proti těmto obtížím (Ruseler - van Embden et al., 2004).

Některé inhibitory proteas, zejména bramborový inhibitor karboxypeptidasy vykazují antitrombotickou aktivitu, což dokázaly pokusy na myších. Mohou se tak uplatnit jako fibrinolytický prostředek pro léčbu trombóz (Kärenlampi & White, 2009). Velký potenciál nabízí bramborové PIs při léčbě karcinogenních onemocnění. Antikarcinogenní působení bylo zjištěno u PCPI v případě výskytu melanomu kůže, kdy prokázal schopnost kompetice s EFG a umožnění vazby na EFGR, čímž došlo k zastavení nekontrolovaného šíření maligních buněk. Klinický výzkum vybraných PIs by v budoucnosti mohl vést k vytváření prostředků a léčiv při léčbě více typů nádorových onemocnění (Sitjà-Arnau et al., 2005).

2.6.3 Rostlinolékařství

V oblasti fytopatologie, zejména v 90. letech, byla prováděna řada experimentů týkající se přenosu genů kódující inhibitory proteas. Transgenní rostliny obsahující geny kódující rostlinné inhibitory proteas vykazovaly zvýšenou rezistenci vůči hmyzím patogenům. Příklady transformovaných rostlin obsahující geny pro expresi PIs jsou uvedeny v tabulce 5.

Z přehledu je patrné, že bramborové inhibitory 1 a 2 mohou najít uplatnění v oblasti rezistentního šlechtění, zejména u transformovaných rostlin. Antimikrobiálních vlastností PIs by však kromě jejich *in vivo* působení bylo možné využít také mimo rostlinu. Jejich aktivita vůči mikroskopickým houbám a omezení mycelárního růstu by umožnilo jejich povrchovou aplikaci na krmivářské a potravinářské výrobky, případně jejich inkorporaci do obalových materiálů, čímž by zvýšily jejich trvanlivost vlivem inhibice růstu plísní na povrchu. Toto

potencionální využití PIs podporuje také jejich poměrně velká termostabilita PIs daná jejich nízkou molekulovou hmotností a strukturou zpevněnou disulfidickými vazbami.

Tab. 5 Příklady transgenních rostlin se zvýšenou rezistencí vůči hmyzím patogenům vlivem introdukce genů exprimující rostlinné PIs (upraveno podle Ussuf et al., 2001)

Zdroj a původ PI	Transformovaná rostlina	Rezistence ke škůdcům
vignový inhibitor trypsinu	tabák	<i>Manduca sexta</i>
	tabák	<i>Spodoptera litura</i>
	rýže,	<i>Sesamia inferens</i> , <i>Chilo</i>
	lilek brambor	<i>suppressalis</i>
	jabloň	<i>Lacnobiaoleracea</i>
	salát, rajče	Coleoptera, Lepidoptera
	řepka	Coleoptera, Lepidoptera
	brukev řepka	Coleoptera, Lepidoptera
	jahodník	Coleoptera, Lepidoptera
	slunečnice	Coleoptera, Lepidoptera
povijnice	Coleoptera, Lepidoptera	
PI-1	muškát, tabák	Lepidoptera, Orthoptera
PI-2	rýže	<i>Sesamia inferens</i>
	bříza, salát	Lepidoptera, Orthoptera
PI-1, PI-2	tabák	<i>Manduca sexta</i>
bramborový inhibitor chymotrypsinu	tabák	<i>Chrysodeixis eriosoma</i>
povijnicový inhibitor trypsinu	tabák	<i>Spodoptera litura</i>
	květák	<i>Pieris conidia</i>
rýžový inhibitor cysteinu	topol	<i>Chrysomela tremulae</i>
sojový inhibitor Kunitzova typu	rýže,	<i>Nilaparvata lugens</i>
	lilek brambor, tabák	Lepidoptera
ječmenný inhibitor trypsinu	pšenice	<i>Sitotroga cerealella</i>
kukuřičný cystatin	rýže	<i>Sitophilus zeamatis</i>
hořčičný inhibitor trypsinu	huseníček, tabák	Lepidoptera
tabákový inhibitor proteas	tabák, hrách	<i>Helicoverpa armigera</i>
inhibitor cysteinových proteas	tabák	Tobacco etch virus, Potato virus
fazolový inhibitor α -amylasy	hrách	<i>Callosobruchus maculatus</i>
	hrách	<i>Bruchus pisorum</i>
	vigna	<i>Callosobruchus chinensis</i> , <i>C. maculatus</i> , <i>C. analis</i>

3. CÍLE PRÁCE

Cíle práce

- 1) Hodnocení vybraných vlastností výchozího materiálu (bramborové hlízové vody a bramborové mouky) pěti vybraných odrůd brambor
- 2) Studium možností a provedení detailní izolace a separace inhibitorů proteas pomocí chromatografických technik z hlíz bramboru odrůd Adéla a Eurostarch
- 3) Studium vlastností a aktivit jednotlivých frackí bramborových PIs získaných po předchozí chromatografické separaci.

Tato práce je zaměřena na možnosti izolace a separace bramborových inhibitorů proteas a studium jejich vlastností. V prvním kroku bude provedeno hodnocení obsahu sušiny hlíz Adéla, Laura, Eurostarch, Ornella a Siby. U bramborové mouky těchto odrůd bude rovněž zjišťován obsah dusíku a dusíkatých látek, stanoven bude také obsah celkových polyfenolů. Ve druhém kroku bude provedena purifikace inhibitorů proteas z bramborové hlízové vody. Frakce bazických a kyselých inhibitorů proteas budou dále rozděleny pomocí iontově výměnných kolon na systému FPLC. Dílčí frakce po separaci na iontově výměnných kolonách budou dále separovány pomocí kolon využívající hydrofobní interace a gelovou permeační chromatografií. Získané frakce budou analyzovány a identifikovány pomocí SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrie, Poslední část této práce bude zaměřena na zjištění antioxidačních aktivit a antifungální působení proti fytopatogenním houbám u vybraných frackí bramborových PIs

Hypotézy

- 1) Lze prokázat významné rozdíly v obsahu sušiny, dusíkatých látek, bílkovin a celkových polyfenolů mezi vybranými odrůdami.
- 2) Pomocí dvoustupňové purifikace a separace za využití systému FPLC a kolon různých typů lze získat komplexní i detailní frakce jednotlivých skupin inhibitorů proteas.
- 3) U frackí PIs získaných chromatografickými separacemi se projeví antifungální a antioxidační aktivity, které se budou mezi jednotlivými frakcemi prokazatelně lišit.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Příprava materiálu a stanovení sušiny

Výchozím materiálem pro izolaci proteinů byla hlízová voda (PFJ, *Potato fruit juice*) pěti odrůd bramboru. V rámci práce byly použity odrůdy Adéla a Laura, které jsou určeny pro přímý konzum a odrůdy Eurostarch, Ornella a Siby využívané pro průmyslové zpracování, zejména pro výrobu škrobu. Odrůda Ornella je rovněž využitelná pro smažené výrobky. Hlízy byly získány z brambor vybraných odrůd pěstovaných na pozemku ZF JU v Českých Budějovicích. Pozemek se nachází v zemědělské výrobní oblasti obilnářské, v nadmořské výšce 380 m n. m. Půda pozemku je typově hnědá, kyselá, druhově hlinitopísčité. Jako doplňkový výchozí materiál byla použita průmyslová hlízová voda získaná z blíže neurčených odrůd brambor pro zpracování, vznikající jako vedlejší produkt při výrobě škrobu. Hlízová voda byla získána ze škrobárny Lyckeby Amylex (Horažďovice).

Sklizené hlízy byly pečlivě omyty, zbaveny nečistot a usušeny. Poté byly hlízy zváženy a spočítány pro zjištění průměrné hmotnosti jedné hlízy. Následně byly v rámci každé odrůdy ve 3 opakováních vybrány 3 hlízy lišící se velikostí (malá, střední, velká). Tyto hlízy od každé odrůdy byly nakrájeny na plátky a následně byly vloženy do tří samostatných dóz, ve kterých byly v čerstvém stavu zváženy. Následně byly dózy s plátky zamrazeny při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, lyofilizovány po dobu 4 dní ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,520 mbar) a opět zváženy, čímž byl gravimetricky zjištěn obsah sušiny.

Pro přípravu bramborové šťávy bylo zpracováno 6,1-7,1 kg (dle odrůdy) hlíz všech velikostí. Pomocí kuchyňského odšťavňovače byly získány 3-4 l bramborové šťávy. Ke šťávě byl přidán konzervant (5 g siřičitanu disodného a 3,5 g disiřičitanu sodného ve 100 ml H_2O) v množství 1 ml/100 ml PFJ zabraňující oxidativnímu hnědnutí. Šťáva byla přelita do centrifugačních dóz a byla centrifugována po dobu 30 min (4500 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po centrifugaci byla šťáva filtrována pomocí filtračního papíru. Pomocí centrifugace a filtrace byla z bramborové šťávy odstraněna většina škrobu, čímž byla získána bramborová hlízová voda - PFJ. Po centrifugaci a filtraci byla hlízová voda přelita do plastových lahví a dále použita nebo zamrazena pro uchování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2 Obsah dusíku a dusíkatých látek

Vzorky ve formě plátek hlíz byly homogenizovány pomocí planetového mlýnu (Fritsch PULVERISETTE 6, Německo). Homogenizovaný materiál ve formě mouky byl u odrůd Adéla, Eurostarch, Laura, Siby a Ornella navážen v množství 25 mg do cínových kapslí. Jako standard pro výpočet obsahu dusíku při stejné navážce byla použita kyselina asparagová (aspartát), pomocí které došlo ke stanovení „denního faktoru“. Kapsle se vzorky byly vloženy do autosampleru pro automatickou analýzu.

Stanovení obsahu dusíku v bramborové mouce proběhlo pomocí modifikované Dumasovy metody pomocí přístroje Rapid N Cube (Elementar, Německo). V první fázi této metody je vzorek spálen při vysoké teplotě (větší než 960 °C) v atmosféře bohaté na kyslík. Dochází k přeměně vzorku na popel za současného uvolnění vody, oxidu uhličitého a dusíku. Plyny prochází sorpčními kolonami, které zachycují oxid uhličitý a vodu. Zbývající oxidy dusíku jsou redukovány na samotný dusík, který je detekován tepelně-vodivostním detektorem. Pomocí standardně používaného koeficientu 6,25 je po zjištění koncentrace dusíku zjištěn také obsah dusíkatých látek (Elementar.de, 2016).

4.3 Obsah polyfenolů v hlízách

V rámci analýz základního materiálu byl zjišťován obsah celkových polyfenolů, který byl stanovován spektrofotometricky pomocí modifikované metody využívající Folin-Cicalteauva činidla (Lachman et al., 2006). Tato metoda je využívána pro stanovení celkového obsahu polyfenolů za využití roztoku obsahující oxidy wolframu a molybdenu. Dochází k redukční reakci činidla s polyfenoly za vzniku žlutých, zelených až modrých produktů, podle míry obsahu polyfenolů. Folin-Cicalteauvo činidlo je nespecifické a reaguje s veškerými fenolovými skupinami obsažených ve vzorcích (Waterhouse, 2002).

Před samotným měřením byla provedena extrakce vzorků bramborové mouky pěti zkoumaných odrůd. Mouka byla navážena do mikrocentrifugačních zkumavek v množství 100 ± 1 % mg a extrahována po dobu 24 h v 1 ml 80 % vodného roztoku methanolu za stálého třepání. Po extrakci následovala centrifugace při 10 000 rpm po dobu 15 min při 20 °C. Následně byl odebrán supernatant s extraktem.

Při samotném měření bylo 20 μ l vzorků naředěno 1980 μ l destilované vody a promícháno. K naředěnému vzorku bylo přidáno 100 μ l Folin-Cicalteauva roztoku a 300 μ l

karbonátu sodného. Výsledná reakce byla promíchána a inkubována při pokojové teplotě po dobu 2 h. Po inkubaci byl vzorek spektrofotometricky měřen při 765 nm proti slepému vzorku. Absorbance byla měřena při vlnové délce 765 nm. Jako standard byla použita kyselina gallová, byla vytvořena kalibrační křivka a zjištěna rovnice pro výpočet obsahu polyfenolů. Jako slepý vzorek byl použit 80% vodný roztok methanolu. Výsledek byl vyjádřen jako ekvivalent gallové kyseliny (v g/kg sušiny).

4.4 Chromatografická purifikace a separace PIs

4.4.1 Purifikace pomocí kolony DEAE

Dvoustupňová chromatografická purifikace byla použita jako předseparační krok před vlastní separací PIs na systému FPLC. Purifikace byla provedena dle modifikované metodiky (Obr. 1) vypracované autory Bárta et al. (2013) na základě principu purifikace patatinu autorů Racusen a Foot (1980). Po rozmrazení PFJ došlo k úpravě jejího pH na hodnotu 7.4 pomocí 2 M NaOH. Mezitím byly kolony ekvilibrovány pomocí startovacího pufru (složení jednotlivých pufrů je uvedeno v příloze 2) při 4° C v lednici, dokud nebyla hodnota pH průchozího pufru 7,4. Po ekvilibraci bylo 40 ml PFJ s upravenou hodnou pH na hodnotu 7,4 nanášeno na chromatografickou kolonu obsahující 100 ml media Iontosorb DEAE 100-250 (Iontosorb, ČR). Tímto krokem byly do připravených dóz získány frakce „B“ (nezachycený propad) obsahující frakce bazických inhibitorů proteas. Následně byla kolona promývána

pro vymytí reziduí nenavázaných proteinů. Po promytí byla provedena eluce navázaných složek, čím byla získána frakce „C“ (zachycená frakce) zahrnující směs kyselých inhibitorů proteas a proteinů patatinového komplexu. Frakce „C“ byla také sbírána do dóz. Ve druhém kroku purifikace byla tato frakce nanášena na gravitační kolonky s mediem Con A Sepharose 4B (GE Healthcare, UK) pro odstranění patatinu. Po purifikaci byla provedena regenerace nejdříve pomocí 1M HCl a následně pomocí 0,5 M NaOH. Pro uchování byla provedena krátká ekvilibrace uchovávacím pufrem, ve kterém byla kolona následně dlouhodobě uchována. Podrobný postup dílčích kroků je uveden v příloze 5.

4.4.2 Purifikace pomocí kolony Con A Sepharose 4B

Medium Con A Sepharose 4B (GE Healthcare Life Sciences, USA) obsahuje specifický afinitní ligand, zastoupený proteinem ze skupiny lektinů - konkanavalin A. Konkanavalin se vyznačuje svojí schopností vázat glykoproteiny. V této práci byl využit tento adsorbent k oddělení kyselých PIs a proteinů patatinového komplexu. V první fázi byla provedena ekvilibrace kolony na hodnotu pH 7. Po ekvilibraci kolony bylo nanášeno na 100 ml media 36 ml zakonzentrované (lyofilizace) a rozpuštěné frakce „C“ obsahující směs kyselých PIs a patatinu. Medium s nanášeným vzorkem bylo řádně promícháno skleněnou tyčinkou v uzavřené koloně. Po 10 minutách došlo k otevření kohoutu a do dóz byl zachytáván propad (frakce „D“) zahrnující kyselé inhibitory proteas. Následně byla kolona promývána objemem startovacího pufru, přičemž část propadu byla ještě zachytávána jako frakce „D“. Po promytí kolony byla provedena eluce navázaných složek, čímž byla získána frakce „E“ obsahující proteiny patatinového komplexu. Do dóz byl zachytáván veškerý eluční objem.

Všechny frakce získané pomocí dvoustupňové purifikace byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Laemmli, 1970) a byla u nich změřena koncentrace proteinů pomocí metody BCA. Frakce „B“ a „C“ byly zakonzentrovány lyofilizací pro následnou chromatografickou separaci na systému vysokorychlostní kapalinové chromatografie (FPLC). Složení pufrů použitých při purifikaci pomocí Con A a podrobný postup je uveden v přílohách 3 a 6.

4.4.3 Koncentrace bílkovin

Využitím BCA metody modifikované dle Smith et al. (1985) byla pomocí destičkového spektrofotometru xMark (Bio-Rad, USA) změřena koncentrace proteinů u PFJ odrůd a také jednotlivých purifikovaných a separovaných frakcí získaných pomocí chromatografie. Následně vypočítán výtěžek proteinů po prvním kroku purifikace součtem frakcí „B“ a „C“. BCA metoda se používá k určení koncentrace proteinů na základě barevné reakce (purpurové zbarvení) způsobené interakcí s peptidovou vazbou a následné měření absorbance ($\lambda = 562 \text{ nm}$) pomocí spektrofotometrie. Tato metoda je založena na alkalické redukci měďnatého iontu na měďný a následné chelataci měďného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku fialového zbarvení. Pro BCA analýzu byl použit Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, USA), pro sestavení kalibrační křivky byla použita ředící řada albuminového standardu.

4.4.4 Chromatografická separace na systému FPLC

Pro separaci frakcí inhibitorů proteas byl využit systém vysokorychlostní kapalinové chromatografie BioLogic DuoFlow Pathfinder 20 (Bio-Rad, USA). Systém se skládá z pracovní stanice, „maximizéru“, UV/VIS detektoru s deuteriovou lampou umožňující měření absorbance při čtyřech vlnových délkách, pH detektoru, kolektoru frakcí a počítače se softwarem BioLogic DuoFlow. Pro odsolení byla použita smyčka o objemu 5 ml, pro separaci proteinových frakcí byly použity smyčky o objemu - 1 ml (UNO S6, UNO S6 a CHT5-I) a 50 μ l (ENrich SEC 650, kolony HIC). Chromatogramy uvedené v této práci nemají z důvodu lepší vizualizace píků sjednocené měřítko. Metody chromatografické separace na FPLC použité v rámci této práce byly převzaty z metodiky autorů Bárta et al. (2013) a optimalizovány.

4.4.4.1 Odsolení proteinových frakcí

Před vlastní chromatografickou separací frakcí PIs proběhlo odsolení zakoncentrované frakce „D“ na systému FPLC. Odsolení bylo nutno provést z důvodu zvýšeného zasolení po předchozí purifikaci a promývání pufrů, které obsahují NaCl. Odsolení bylo provedeno pomocí kolony Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 desalting cartridges naplněnou substrátem Bio-Gel P-6 (Bio-Rad, USA) fungující na principu gelové permeační chromatografie pomocí protokolu uvedeného v příloze 7. Před odsolením byly zakoncentrované frakce rozpuštěny v ultračisté vodě. Jako pufr byla použita filtrovaná a degasovaná ultračistá voda.

4.4.4.2 Separace pomocí kolony UNO S6

Při této separaci byla použita kolona umožňující výměnu kationtů UNO S6 (Bio-Rad, USA). Tato kolona obsahuje silně negativně nabitě sířičitanové skupiny. Pro tuto separaci byly použity frakce „B“ odrůd Adéla a Eurostarch, které byly po odsolení zakoncentrovány lyofilizací. Průběh separace je znázorněn v protokolu v příloze 8. Po separaci byly vybrané frakce sbírány do dóz a později použity při separaci pomocí kolony CHT5-I.

Tab. 6: Složení pufrů použitých pro separaci proteinu na koloně UNO S6

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

4.4.4.3 Separace pomocí kolony UNO Q6

Kolona UNO Q6 (Bio-Rad, USA) umožňuje výměnu aniontů. Funkční skupiny tvoří u této kolony silně pozitivně nabitě aminoskupiny. Pomocí této kolony byly separovány kyselé bramborové inhibitory proteas zastoupené v purifikované frakci „B“ odrůd Adéla a Eurostarch. Průběh separace je uveden v příloze 9.

Tab. 7: Složení pufrů použitých pro separaci proteinu na koloně UNO Q6

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

4.4.4.4 Separace pomocí kolony CHT-5I

Kolona typu CHT5-I (Bio-Rad, USA) obsahuje biokeramický materiál ve formě hydroxyapatitu fungující na základě principu afinitní chromatografie prostřednictvím nespecifických interakcí funkčních skupin s negativně a pozitivně nabitými skupinami aminokyselin v separovaných proteinech. Pomocí této kolony byly separovány frakce PIs získané po separaci na koloně UNO S6. Průběh separace je znázorněn v příloze 10.

Tab. 8: Složení pufrů použitých pro separaci proteinu na koloně CHT5-I

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

4.4.4.5 Separace pomocí kolony ENrich SEC 650

Kolony typu EnRich SEC (Bio-Rad, USA) typu fungují v režimu gelové permeační chromatografie. Medium je tvořeno 10 µm velkými sférickými polymerními částicemi s nízkou nespecifickou vazebnou aktivitou umožňující zachování biologické aktivity separovaných proteinů. Tato kolona byla použita jako doplňková separace frakcí, jež nebylo možno separovat na koloně CHT5-I. Průběh separace je znázorněn v příloze 11.

Tab. 9: Složení pufrů použitých pro separaci proteinu na koloně ENrich SEC 650

komponenta (ml)	ENrich startovací pufr	ENrich uchovávací pufr
	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 7,4	20 % ethanol
1 M Tris-HCl, pH 7,4	50	0
5 M NaCl	20	0
abs. ethanol	0	200
deionizovaná H ₂ O	930	800

4.4.4.6 Separace pomocí kolony HiTrap

Řada HiTrap (GE Healthcare, USA) představuje nové typy kolon fungující na principu hydrofobních interakcí. Poskytují vysoké rozlišení a minimálně 80 % výtěžek. Dynamická vazebná kapacita je minimálně 20 mg proteinu na 1 ml media. V rámci této práce byly použity kolony Butyl HP a Phenyl FF, které se liší obsaženým mediem. Kolona Butyl HP obsahuje medium Butyl Sepharose High Performance, kolona Phenyl FF obsahuje Phenyl Sepharose 6 Fast flow. Tyto typy kolon byly použity pouze pro zkušební formu separace

UNO S frakce odrůdy Siby a izolát typu LMW *Patissionate S301P* (Solanic, Nizozemsko) tvořený bramborovými inhibitory proteas. Startovací pufr obsahoval 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Na_2HPO_4 (pH 7,0), eluční pufr byl tvořen 0,1 M Na_2HPO_4 (pH 7,0). Průběh separace je znázorněn v příloze 12.

4.5 SDS-PAGE

Pro analýzu proteinových spekter a identifikaci proteinů byla použita elektroforetická metoda SDS-PAGE dle Laemmliho (1970). SDS-PAGE neboli denaturační polyakrylamidová elektroforéza je běžně využívaná metoda určená pro separaci a identifikaci proteinů. Metoda byla optimalizována podle Čurna (1995). V rámci této disertační práce byla použita sestava vertikální elektroforézy Hoefer SE 600 (Hoefer, USA). Pro analýzu identifikaci hlízových proteinů byl použit 10 % a 12 % separační gel a 3,75 % Zaostřovací gel. Vzorky byly nanášeny na gel v množství 10 μl (B, C, D a E frakce), přičemž vznikly smísením 40 μl vzorku a 10 μl vkladacího pufru. Těsně před použitím se k 500 μl nanášecího pufru přidalo 170 μl merkaptoethanolu. Vzorek s obsahem nanášecího pufru byl v termobloku v mikrocentrifugačních zkumavkách zahřán na teplotu 99 °C po dobu 3 min, poté byl ochlazen a nanášen na gel v uvedeném množství. Jako hmotnostní marker byl použit Blue Protein ladder 3,5- 245 kDa (Central European Biosystems, ČR), který byl neřaděný nanášen na gel v množství 5 μl . Elektroforetická separace byla prováděna za podmínek napětí 150 V prvních 30 minut a následně při napětí 200 V po dobu 4-6 hodin. Byl použit totožný horní a dolní vanový pufr. Po separaci byly gely vyjmuty ze sendvičové sestavy, opláchnuty ve vodě a barveny přes noc pomocí barvicího roztoku. Po barvení byly gely odbarveny pomocí příslušného roztoku. Gely byly odbarvovány pomalým třepáním v dózách s roztokem po dobu přibližně 6 h a následně pomocí destilované vody za využití horizontální třepačky. Po odbarvení byly gely přímo ve vlhkém stavu vyhodnoceny pomocí fotodokumentačního zařízení Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA), případně byla provedena fixace a následně byly gely vyhodnoceny. Složení jednotlivých pufrů a komponentů pro barvení, odbarvení a fixaci je uvedeno v příloze 13.

4.6 Hmotnostní spektrometrie

4.6.1 Příprava vzorku

Proteinové frakce byly zpracovány pomocí metody FASP (*Filter-aided sample preparation*) spočívající v ultrafiltraci pomocí filtračních kolonek. Vzorky jsou pomocí této metody zbaveny detergentů a rozštěpeny na dílčí peptidy. Tato metoda slouží zejména k izolaci purifikovaných peptidových frakcí. Proteinové frakce byly smíseny s 8 M močovinou (v 100 mM Tris-HCl, pH 8.5). Vzorky byly nejdříve centrifugovány při 7,000 x g (další centrifugace byly provedeny při 14,000 g) po dobu 30 min při 20 °C v centrifugačních filtrech Microcon s propustností 30 kDa (Merck, USA). Zachycené proteiny byly promyty 200 µL močovinného pufru a opět centrifugovány. Finální proteinové koncentráty byly smíseny se 100 µL močovinného pufru obsahující 50 mM jodoacetamidu a inkubovány v temnu po dobu 20 min. Po dalším centrifugačním kroku byly vzorky třikrát promyty 100 µL močovinného pufru a třikrát 100 µL močovinného pufru obsahující 50 mM hydrogenuhličitanu sodného. Trypsin (Promega, USA) byl následně přidán na filtry kolonek a s proteiny následně inkubován po dobu 18 h při 37 °C. Tryptické peptidy byly eluovány samotnou centrifugací a následně dalšími dvěma centrifugacemi s přidávkou 50 µL 50 mM hydrogenuhličitanu sodného. Výsledné peptidy byly extrahovány do vialek pomocí pufru obsahující 2,5 % kyseliny mravenčí, 50 % acetonitrilu a 100 % acetonitrilu s přidávkou polyethylenglykolu (finální koncentrace 0,001 %) a zakoncentrovány pomocí SpeedVac koncentrátoru (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.6.2 LC-MS/MS analýza peptidů

LC-MS/MS analýzy byly provedeny pomocí systému nízkoprůtokové chromatografie RSLCano ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, USA). Před LC separací byly provedena ekvilibrace předkolony a kolony. Tryptické digesty byly odsoleny pomocí předkolony se sorbentem X-Bridge BEH 130 C18 s velikostí částic 3.5 µm (Waters, USA). Po promytí předkolony pomocí 0,1 % kyseliny mravenčí byly peptidy eluovány (průtok 300 ml/min) do separační kolony Acclaim Pepmap100 C18 (3 µm částice, 75 µm × 500 mm; Thermo Fisher Scientific, USA) s využitím gradientové eluce

(mobilní fáze A: 0,1 % kyselina mravenčí ve vodě, mobilní fáze B 0,1 % kyselina mravenčí v 80 % acetonitrilu). Eluce začala zvyšujícím se gradientem mobilní fáze B: 1 % - 56 % v prvních 100 minutách běhu (14 % ve 30. minutě, 30 % v 60 % minutě a 56 % ve 100. minutě). Následně gradient mobilní fáze B vzrostl lineárně během 5 minut na hodnotu 80 %, přičemž v tomto stavu následujících 15 minut probíhala isokratická eluce. Výstup analytické kolony byl přímo spojen s iontovým zdrojem Digital PicoView 550 ion source a emitorem SilicaTip (New Objective, USA). Součástí systému bylo rovněž zařízení ABIRD (*Active Background Ion Reduction Device*) určené pro zlepšení iontového signálu, případně zpřesnění identifikace proteinů (ESI Source Solution, USA).

Data byla získána pomocí data-závislé strategie vybírající až 10 prekurzorů ze zjištěného skenu (rozsah 350 – 1 700 m/z). Rozlišení mapovacího skenu bylo 60 000 (pro 400 m/z) s cílovou hodnotou 1×10^6 iontů pro jeden sken po dobu vstřiku maximálně 500 ms. MS/MS spektra byla získána pomocí vysokoenergetické kolizní disociace (HCD, *Higher energy collisional dissociation*) prostřednictvím akumulace 50 000 iontů při rozlišení 15 000 (pro 400 m/z). Maximální doba vstřiku činila 500 ms a dynamické vyloučení bylo povoleno po dobu 45 s pro získání MS/MS spektra. Izolační okno bylo nastaveno na hodnotu 2 m/z.

Pro analýzu hrubých MS dat byl použit software Proteome Discover (verze 1.4) v součinnosti s programem Mascot (Matrixscience, UK) a databázového vyhledávače SEQUEST. MS/MS data byla nejdříve hledána proti modifikované cRAP databázi (<http://www.thegpm.org/crap/>) obsahující 115 proteinových kontaminantů (např. keratin, trypsin a další). MS/MS spektra byla vyhodnocena pomocí vyhledávače Mascot. Sekvence analogické k sekvencím z databáze cRAP, s vyšším iontovým skóre než 30, byly vyřazeny z následných databázových vyhledávání. Finální databázová vyhledávání byla provedena proti UniProtKB databázi pro *Solanum tuberosum*. Tolerance počtu jednotlivých peptidů a MS/MS fragmentů činila 10 ppm a 0,05 Da. Některé typy modifikace, jako například: oxidace methioninu, deamidace (N, Q), acetylace (N-konce) a karbamidometylace (C) modifikace a jedno štěpení enzymu, byly zohledněny pro všechna vyhledávání. Percolator byl použit pro následné zpracování výsledků vyhledávání. Byly zohledněny pouze peptidy s hodnotou $q < 0,01$, a alespoň 6 aminokyselinami v prvním místě pořadí. Proteiny shodné se stejnou sadou peptidů byly hlášeny jako proteinové skupiny. Proteinové skupiny/proteiny byly vyhodnocovány, pouze pokud obsahovaly alespoň jeden unikátní peptid.

Pomocí technik MS bylo hodnoceno zastoupení jednotlivých proteinů v hlízové vodě odrůd Adéla a Eurostarch ze dvou ročníkových opakování (2014 a 2015), tyto nerozdělené proteinové vzorky byly vzájemně porovnány. Bylo zjišťováno také zastoupení a

proporcionalita proteinů v dílčích frakcích získaných po separaci na FPLC pomocí kolon UNO S6 (bazické frakce) a UNO Q6 (kyselé frakce). Rovněž byly srovnány soubory frakcí Adéla i Eurostarch získaných právě po separacích na obou zmíněných kolonách.

4.7 Antimikrobiální aktivity

Pomocí biotestů na pevném mediu dle metodiky Hyunth et al. (1996) bylo zjišťováno působení frakcí inhibitorů proteas na růst patogenních hub *Rhizoctonia solani* a *Fusarium solani*. Inokulum fytopatogenních hub bylo dodáno v aktivní formě na želatinových discích od České sbírky mikroorganismů (Brno, ČR).

V prvním kroku došlo ke kultivaci fytopatogenních hub na Petriho miskách na mediu Potato dextrose agar (HiMedia, Indie) inkubovaných při 25 °C. Ve druhém kroku byly prováděny samotné biotesty. Do Petriho misek o průměru 90 mm bylo rozlito 8 ml připraveného media Iso-Sensitest Agar (Thermo Fisher Scientific, USA). Po ztuhnutí agarů byl na střed Petriho misek přenesen pomocí korkovrtu kruhový terčik media s houbovým patogenem. Po třech dnech růstu při teplotě 25 °C byly těsně za okraji zóny růstu patogena vytvořeny pomocí korkovrtu v mediu čtyři otvory na čtyřech protilehlých stranách pro aplikaci vody (kontrola) a proteinových roztoků vybraných frakcí PIs o koncentraci 1, 5 a 10 mg proteinu na 1 ml vody. Vzorky a voda jako kontrola byly aplikovány v množství 30 µl na jamku, přičemž došlo k difuzi do media. Následně byly vzorky inkubovány při 25 °C po dobu 1-2 dnů, podle rychlosti růstu mycelia, pro vytvoření potenciálních zón inhibice růstu. Po inkubaci bylo pozorováno případné vytvoření zón inhibice růstu patogena vlivem působení PIs v místech styku s patogenem. V případě vzorků s prokázanou pozitivní inhibicí růstu fytopatogenů byly příslušné Petriho misky zaznamenány pomocí fotoaparátu a vyhodnoceny.

4.8 Antioxidační aktivity

U mouky vybraných odrůd a dále pak frakcí bramborových PIs získaných po chromatografických separacích byly zjišťovány jejich antioxidační aktivity pomocí metod využívající radikály ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) na základě modifikované metodiky dle Lachmana et al. (2007) a DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl) na základě modifikované metodiky dle Šulce et al. (2007).

Princip metody využívající ABTS (2,2-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát) nazývaný také jako TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) spočívá v inaktivaci radikálového kationtu $ABTS^{++}$ pomocí antioxidantů, který vzniká oxidací původního ABTS, v této práci za pomoci oxidu manganičitého. Vlivem chemického zhášení (změnou barevné reakce) dochází k úbytku absorbance při vlnové délce 734, který je měřitelný spektrofotometricky. 54,9 mg ABTS bylo rozpuštěno v 5 mM fosfátovém pufru (pH 7,0) a aktivováno na radikálový kationt pomocí 1 g MnO_2 za stálého míchání po dobu 30 minut. Roztok byl následně centrifugován po dobu 5 minut při 7000 rpm. Následně byl zfiltrován přes stříkačkový filtr (0,25 μm) a naředěn fosfátovým pufrem na absorbanci $0,500 \pm 0,01$. Pro měření antioxidační aktivity hlíz brambor byly použity vzorky připravené extrakcí původně pro měření obsahu polyfenolů (kapitola 4.3), vzorky byly naředěny v poměru 1:9 (vzorek:voda). Roztoky proteinových frakcí o koncentraci 1 mg/ml byly přidány v množství 100 μl k 900 μl upraveného radikálu. Absorbance byla měřena při vlnové délce 734 nm.

Měření antioxidační aktivity pomocí radikálu DPPH (1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl) je založeno na schopnosti stabilního volného radikálu reagovat s donory vodíku. DPPH vykazuje silnou absorpci v UV/VIS spektru. Při reakci DPPH s donory vodíku dochází k měřitelné barevné změně při vlnové délce 515 nm. Nejprve byl připraven zásobní roztok rozpuštěním 25 mg radikálu DPPH v 100 ml čistého methanolu, který byl skladován při nízké teplotě v chladničce bez přístupu světla. Pro přípravu pracovního roztoku bylo odebráno 10 ml zásobního roztoku, který byl doplněn do 100 ml methanolem. Absorbance roztoku činila $0,800 \pm 0,01$. Pro měření pomocí DPPH byly v případě měření antioxidační aktivity hlíz brambor použity neředěné vzorky po předchozí extrakci pro měření obsahu polyfenolů (kapitola 4.3). Roztoky proteinových frakcí o koncentraci 1 mg/ml byly přidány v množství 25 μl k 975 μl pracovního roztoku. Absorbance byla měřena při vlnové délce 515 nm. Jako slepý vzorek byl použit 100 % methanol.

4.9 Statistické hodnocení

Statistické vyhodnocení dat u výchozího materiálu (obsah sušiny, dusíkatých látek, obsah polyfenolů, antioxidační aktivity) a vzájemné korelace mezi jednotlivými vlastnostmi bylo provedeno pomocí programu STATISTICA 10 (Statsoft, USA). Pro zjištění a porovnání rozdílů mezi skupinami dat a jejich závislostmi byla použita metoda jednocestné analýzy variance (ANOVA) využívající testu homogenity rozptylů (F-test). Následné hodnocení

rozdílů výsledků mezi jednotlivými odrůdami byl využit post-hoc Tukeyův HSD test. Pro zjištění korelací a úměr mezi jednotlivými parametry byla použita metoda jednoduché lineární regrese.

5. VÝSLEDKY

5.1 Obsah sušiny a dusíkatých látek

Byla zjištěna průměrná hmotnost jedné hlízy (Příloha 1) a pomocí gravimetrického stanovení byl stanoven obsah sušiny u pěti studovaných odrůd ze tří samostatných opakování. V tabulce 10 jsou uvedeny zjištěné hodnoty obsahu sušiny.

Tab. 10: Obsah sušiny hlíz vybraných odrůd a obsah dusíku a dusíkatých látek v sušině hlíz

Odrůda	Obsah sušiny [%]	Obsah dusíku [%]	Obsah NL (N x 6,25) [%]
<i>Adéla</i>	16,6	2,1	12,6
<i>Eurostarch</i>	21,1	1,4	8,8
<i>Laura</i>	17,6	1,4	8,4
<i>Ornella</i>	25,2	1,1	6,9
<i>Sibu</i>	21,1	1,0	6,0

Na základě uvedených výsledků jsou patrné výrazné rozdíly v obsahu sušiny mezi odrůdami určenými pro přímý konzum a odrůdami určené pro zpracování na škrob, kdy obsah sušiny u odrůd pro zpracování byl průkazně vyšší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($df = 1$; $F = 37,651$; $p = 0,000$). Porovnání rozdílů mezi jednotlivými odrůdami je uvedeno v obrázku 3.

Obr. 3: Statistické porovnání rozdílů v obsahu sušiny mezi jednotlivými odrůdami

Tukey HSD test; variable sušina Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,06800, df = 10,000						
Cell No.	odrůda	Adéla 16,600	Eurostarch 21,100	Laura 17,600	Ornella 25,200	Sibu 21,100
1	Adéla		0,000176	0,005996	0,000176	0,000176
2	Eurostarch	0,000176		0,000176	0,000176	1,000000
3	Laura	0,005996	0,000176		0,000176	0,000176
4	Ornella	0,000176	0,000176	0,000176		0,000176
5	Sibu	0,000176	1,000000	0,000176	0,000176	

MS = průměrná velikost čtverce, df = stupně volnosti
pozn. červené p-hodnoty značí statisticky průkazné rozdíly v obsahu sušiny mezi odrůdami

Obsah dusíku lyofilizovaných hlíz brambor byl měřen pomocí modifikované Dumasovy metody. Po použití standardního koeficientu 6,25 byl získán také obsah dusíkatých látek v sušině. Obsah dusíkatých látek byl nejvyšší u odrůdy Adéla. Obsahy dusíku a dusíkatých látek v hlízách vybraných odrůd jsou uvedeny v tabulce 10. Obsah dusíkatých látek byl statisticky prokazatelně vyšší u konzumních odrůd na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($df = 1$; $F = 37,543$; $p = 0,000$). Porovnání rozdílů mezi jednotlivými odrůdami je uvedeno v obrázku 4.

Obr. 4: Statistické porovnání rozdílů v obsahu dusíkatých látek mezi jednotlivými odrůdami

Tukey HSD test; variable NL						
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests						
Error: Between MS = ,53791, df = 24,000						
Cell No.	vzorek	Adéla 12,648	Eurostarch 8,7851	Laura 8,4473	Sibu 5,9996	Ornella 6,9247
1	Adéla		0,000126	0,000126	0,000126	0,000126
2	Eurostarch	0,000126		0,956571	0,000136	0,002639
3	Laura	0,000126	0,956571		0,001870	0,080691
4	Sibu	0,000126	0,000136	0,001870		0,405646
5	Ornella	0,000126	0,002639	0,080691	0,405646	

MS = průměrná velikost čtverce, df = stupně volnosti

pozn. červené p-hodnoty značí statisticky průkazné rozdíly v obsahu dusíkatých látek mezi odrůdami

Byla zjištěna negativní korelace mezi obsahem sušiny a dusíkatých látek, tedy nepřímá úměrnost mezi těmito parametry při hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($r = -0,7104$; $p = 0,179$). Výsledné grafické znázornění korelace mezi oběma parametry je uvedeno v příloze 15.

5.2 Obsah polyfenolů a antioxidační aktivity vybraných odrůd

Zjištěný celkový obsah polyfenolů (*Total polyphenols*, TPP) u jednotlivých odrůd (Tab. 11) představoval bezmála dvakrát vyšší hodnoty TPP konzumních odrůd (v průměru 2,47 g TPP na kg sušiny hlíz) v porovnání s odrůdami pro zpracování (v průměru 1,38 g TPP na kg sušiny hlíz). Rozdíl mezi konzumními odrůdami a odrůdami pro zpracování byl tedy statisticky významný na hladině $\alpha = 0,05$ ($df = 4$; $F = 108,714$; $p = 0,000$). Porovnání rozdílů mezi jednotlivými odrůdami je uvedeno na obrázku 5.

Obr. 5: Statistické porovnání rozdílů v obsahu celkových polyfenolů mezi jednotlivými odrůdami

Tukey HSD test; variable obsah polyfenolů Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,01690, df = 19,000						
Cell No.	odrůda	Adéla 2,5299	Laura 2,3922	Eurostarch 1,2569	Ornella 1,6179	Sibu 1,3313
1	Adéla		0,490688	0,000137	0,000137	0,000137
2	Laura	0,490688		0,000137	0,000137	0,000137
3	Eurostarch	0,000137	0,000137		0,003223	0,898459
4	Ornella	0,000137	0,000137	0,003223		0,039974
5	Sibu	0,000137	0,000137	0,898459	0,039974	

MS = průměrná velikost čtverce, df = stupně volnosti

pozn. červené p-hodnoty značí statisticky průkazné rozdíly v obsahu celkových polyfenolů mezi odrůdami

Antioxidační aktivita byla prokázána u všech odrůd zhášením kyslíkovým radikálů ABTS a DPPH (Tab. 11). U hlíz konzumních brambor byla v průměru vyšší než u hlíz pro zpracování. Stejně jako v případě obsahu polyfenolů, byl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v antioxidačních aktivitách v případě obou použitých metod mezi odrůdami konzumních brambor a odrůdami pro zpracování na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (DPPH: df = 4; F = 463,85; p = 0,000 | ABTS: df = 4; F = 442,57; p = 0,000). Byly také srovnány rozdíly antioxidačních aktivit mezi jednotlivými odrůdami (Obr. 6).

V rámci provedeného statistického srovnání závislostí obsahu polyfenolů a antioxidačních aktivit byla zjištěna přímá závislost (korelace) mezi celkovým obsahem polyfenolů a antioxidační aktivitou na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (DPPH: b = 20,24912; t = 7,775952; p = 0,000 | ABTS: b = 21,91574; t = 9,838943, p = 0,000). Výsledné grafické znázornění lineární regrese je uvedeno v příloze 17.

Tab. 11: Obsah polyfenolů a antioxidačních aktivit hlíz vybraných odrůd brambor

Odrůda	Obsah polyfenolů [g TTP/kg sušiny hlíz]	Zhášecí aktivita vůči radikálu ABTS [%]	Zhášecí aktivita vůči radikálu DPPH [%]
<i>Adéla</i>	2,53	64,9	67,1
<i>Eurostarch</i>	1,26	42,5	36,8
<i>Laura</i>	2,39	66,7	50,1
<i>Ornella</i>	1,33	49,7	38,6
<i>Sibu</i>	1,62	34,2	35,0

Obr. 6: Statistické porovnání rozdílů antioxidačních aktivit pomocí metod DPPH a ABTS mezi jednotlivými odrůdami

Tukey HSD test; variable ABTS Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1,3419, df = 10,000						
Cell No.	odrůda	Adéla 64,928	Eurostarch 42,536	Laura 66,667	Ornella 49,720	Sibu 34,237
1	Adéla		0,000176	0,405160	0,000176	0,000176
2	Eurostarch	0,000176		0,000176	0,000277	0,000195
3	Laura	0,405160	0,000176		0,000176	0,000176
4	Ornella	0,000176	0,000277	0,000176		0,000176
5	Sibu	0,000176	0,000195	0,000176	0,000176	

Tukey HSD test; variable DPPH Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1,1710, df = 10,000						
Cell No.	odrůda	Adéla 67,188	Eurostarch 36,863	Laura 50,060	Ornella 38,588	Sibu 34,978
1	Adéla		0,000176	0,000176	0,000176	0,000176
2	Eurostarch	0,000176		0,000176	0,352481	0,278490
3	Laura	0,000176	0,000176		0,000176	0,000176
4	Ornella	0,000176	0,352481	0,000176		0,014769
5	Sibu	0,000176	0,278490	0,000176	0,014769	

MS = průměrná velikost čtverce, df = stupně volnosti

pozn. červené p-hodnoty značí statisticky průkazné rozdíly antioxidačních aktivit mezi odrůdami

5.3 Hodnocení obsahu bílkovin

5.3.1 Koncentrace a obsah bílkovin v hlízové vodě

Výsledky uvedené v tabulce 12 ukazují nižší výtěžek bílkovin u odrůd pro přímý konzum oproti odrůdám pro zpracování. Celkovým výtěžkům bílkovin v souvislosti s typem odrůdy odpovídá obsah bílkovin v původní PFJ, kromě odrůdy Laura, kdy obsah bílkovin v PFJ této odrůdy předčil obsah bílkovin v PFJ odrůdy Eurostarch rozdílem 0,2 g/l. Průměrný obsah bílkovin byl přesto u odrůd pro zpracování vyšší, než u odrůd pro přímý konzum. Výtěžky jednotlivých frakcí zjištěných pomocí metody BCA, získaných dvoustupňovou purifikací, jsou uvedeny v tabulce 13.

Tab. 12: Obsah bílkovin v PFJ vybraných odrůd

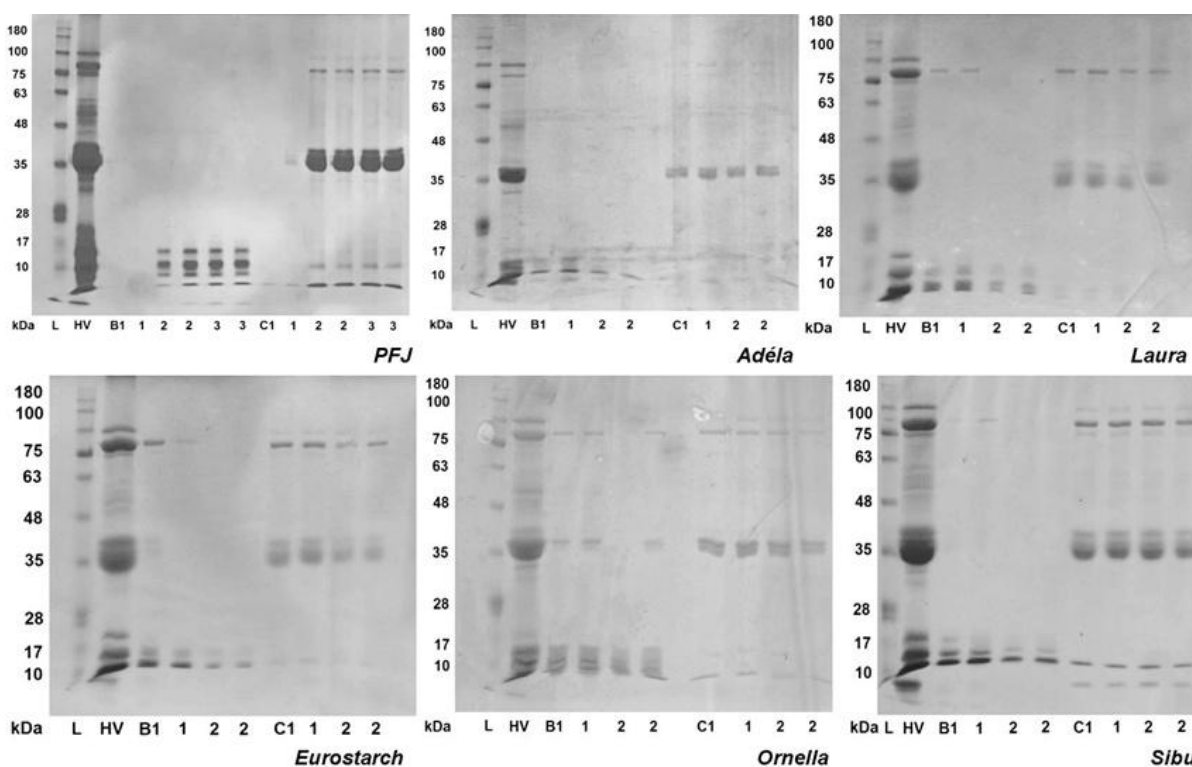
Odrůda	<i>Adéla</i>	<i>Laura</i>	<i>Eurostarch</i>	<i>Ornella</i>	<i>Sibu</i>
Obsah bílkovin v PFJ [g/l]	10,0	14,1	13,9	15,1	14,6
Výtěžek bílkovin z PFJ [g/l]	8,9	12,9	13,7	13,8	14,8

V souvislosti s obsahem bílkovin v PFJ byla také zjišťována jejich korelace s obsahem dusíkatých látek, přičemž byla zjištěna nepřímá úměra mezi obsahem dusíkatých látek a obsahem čistých bílkovin v jednotlivých odrůdách na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($r = -0,9510$; $p = 0,013$). Výsledné grafické znázornění lineární regrese je uvedeno v příloze 16.

5.3.2 Ověření výsledků purifikace a obsahu bílkovin v dílčích frakcích

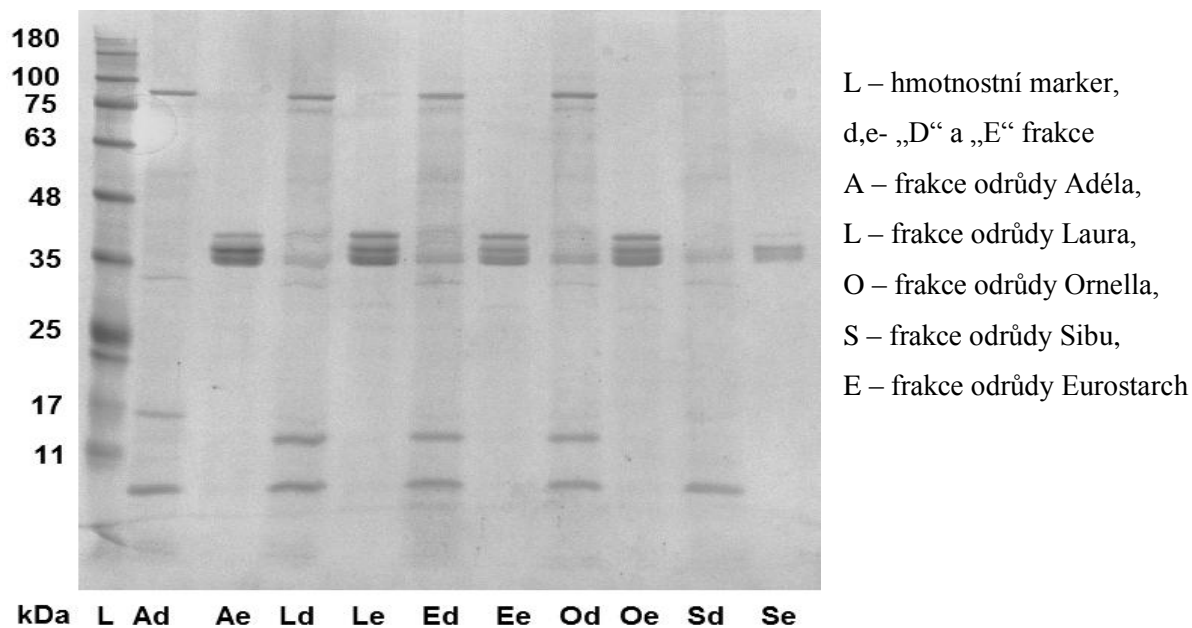
Pomocí dvoustupňové purifikace došlo k úspěšnému rozdělení hlízových proteinů do čtyř predikovaných frakcí.

Obr. 7: Elektroforetické profily hlízové vody a vybraných odrůd po purifikaci na mediu DEAE



HV – hlízová voda, B – frakce „B“, C – frakce „C“, 1,2 – první a druhý propad proteinových frakcí získaných dvoustupňovou purifikací, L (ladder) – hmotnostní marker

Obr. 8: Elektroforetické profily „D“ frakcí (kyselých inhibitorů proteas) a „E“ frakcí (isoforem patatinu) vybraných odrůd po purifikaci na mediu Con A



Tab. 13: Koncentrace a výtěžky proteinů ve frakcích získaných po dvoustupňové purifikaci

Frakce	Koncentrace [µg/mL]	Výtěžek [mg]	Frakce	Koncentrace [µg/mL]	Výtěžek [mg]
Adéla „B“	817,013	164	Adéla „D“	504,4	60
Adéla „C“	957,167	192	Adéla „E“	163,72	38
Laura „B“	1201,25	240	Laura „D“	505,26	61
Laura „C“	1384,53	277	Laura „E“	372,44	89
Eurostarch „B“	1442,31	289	Eurostarch „D“	618,25	74
Eurostarch „C“	1288,79	258	Eurostarch „E“	351,74	84
Ornella „B“	1437,57	288	Ornella „D“	437,99	53
Ornella „C“	1313,8	263	Ornella „E“	430,23	103
Sibů „B“	1248,25	250	Sibů „D“	622,56	74
Sibů „C“	1712,27	343	Sibů „E“	557,87	134

Využitím media Iontosorb s ligandem DEAE došlo podle elektroforeogramů (Obr. 7) jednotlivých odrůd a PFJ k separaci bazických inhibitorů proteas (frakce „B“) od společné frakce patatinu a kyselých inhibitorů proteas (frakce „C“). U frakce „B“ byly vizualizovány zejména proteiny o velikosti ~6-25 kDa . Pomocí MS analýz provedených u rozdělené frakce bazických PIs byla potvrzena zejména přítomnost PAPI, PCPI a PSPI. U frakce „C“ byly majoritní pruhy identifikovány jako proteiny patatinového komplexu o velikosti ~41-43 kDa.

5.4 Chromatografie na systému FPLC

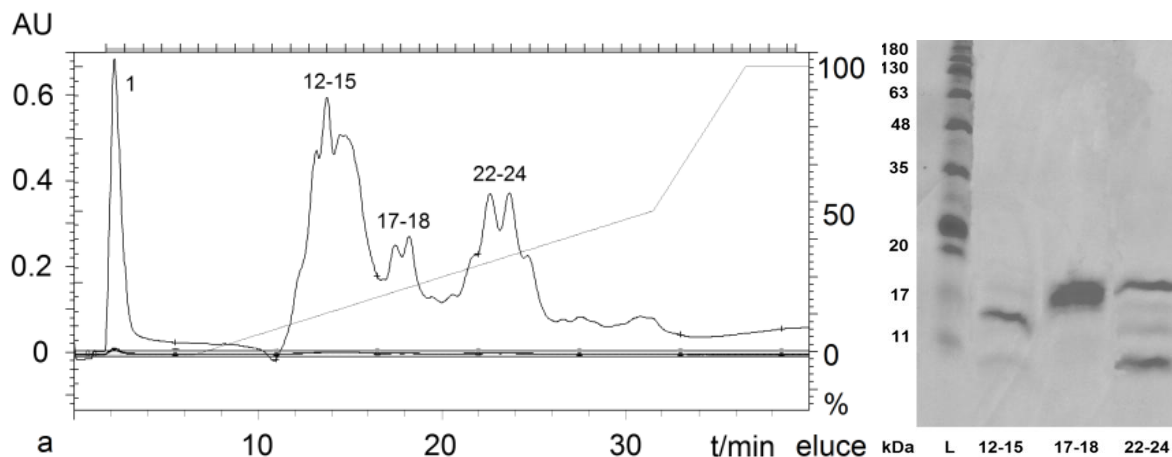
5.4.1 Odsolení proteinových frakcí

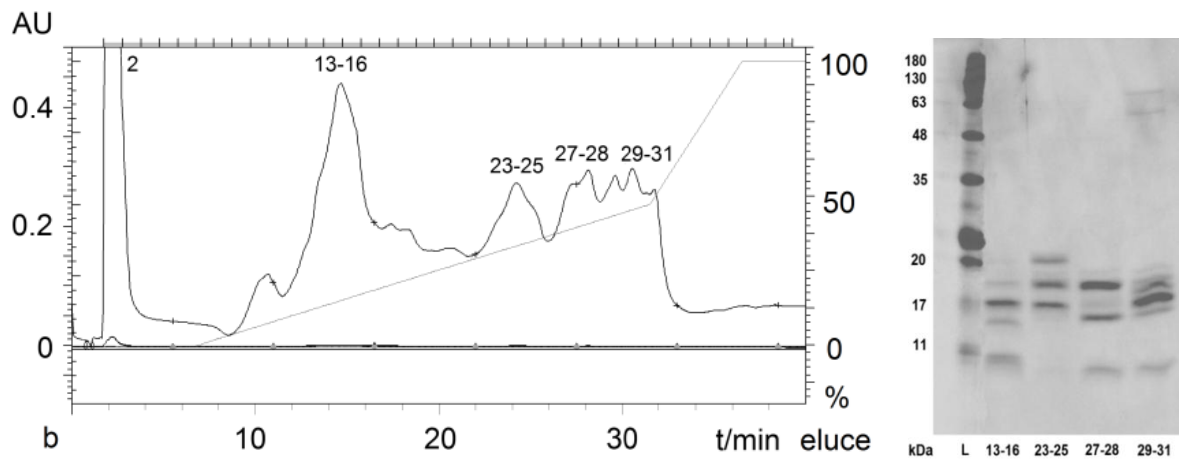
Frakce „B“ a „D“ byly odsoleny pomocí odsolovací kolony (cartridge) Bio-Gel P6 na systému FPLC. Odsolení bylo úspěšné, bylo možno od sebe oddělit odsolené a neodsolené frakce, které byly určeny podle zjištěné konduktivity. Odsolené frakce byly dále použity pro další kroky chromatografické separace.

5.4.2 Separace PIs pomocí UNO S6

Při využití kolony s kationtovým měničem UNO S6 došlo k rozdělení bazických inhibitorů proteas (frakce „B“) do tří až čtyř samostatných frakcí zastoupení podjednotky (16,4 kDa) bramborového inhibitoru serinových proteas II (Obr. 9).

Obr. 9: Chromatografická separace na koloně UNO S6 a následná kontrola a rozdělení frakcí pomocí SDS-PAGE



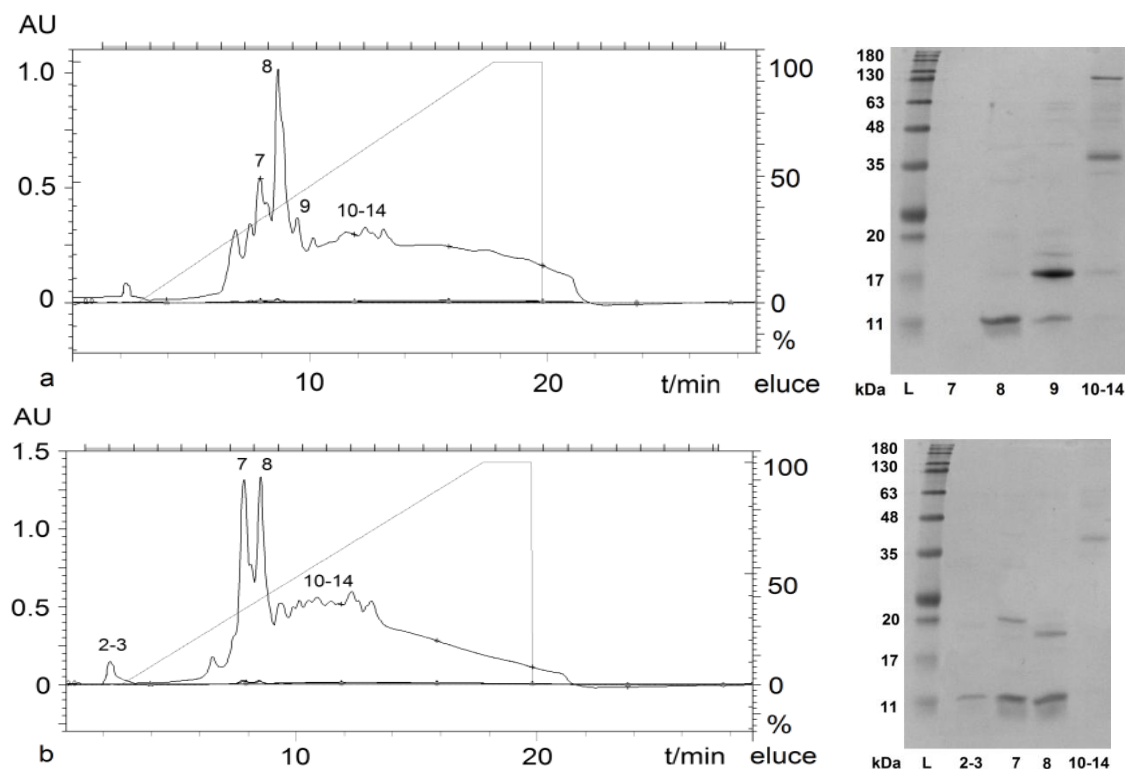


a – odrůda Adéla, b – odrůda Eurostarch, průtok: 4 ml m^{-1} , detekce: UV/VIS 214 nm, čísla v poli - označení sbíraných a dále analyzovaných proteinových frakcí

5.4.3 Separace PIs pomocí UNO Q6

Pomocí kolony s aniontovým měničem UNO Q6 (Obr. 3) došlo k rozdělení převážně kyselých inhibitorů proteas do 3-4 frakcí. Dvě frakce se u obou odrůd po kontrole pomocí SDS-PAGE projeví jako výrazně majoritní. Tyto proteinové frakce mají velikost $\sim 10 \text{ kDa}$ a $16-17 \text{ kDa}$.

Obr. 10: Chromatografická separace na koloně UNO Q6 a následná kontrola a rozdělení frakcí pomocí SDS-PAGE

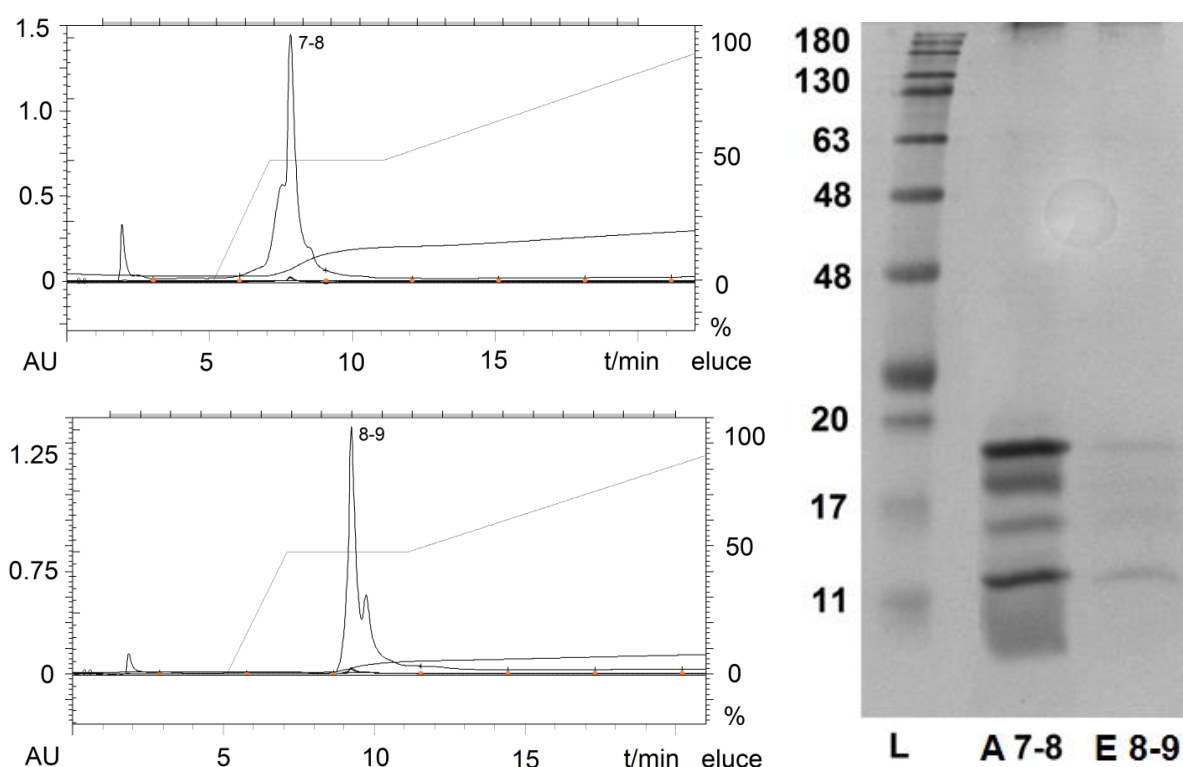


a – odrůda Adéla, b – odrůda Eurostarch, průtok: 4 ml m^{-1} , detekce: UV/VIS 214 nm, čísla v poli - označení sbíraných a dále analyzovaných proteinových frakcí

5.4.4 Separace PIs pomocí CHT5-I

Při využití kolony CHT5-I došlo pouze k rozdělení zachycené a nezachycené frakce. Zachycená frakce byla vizualizována pouze v podobě jednoho výrazného píku představující komplex většiny bramborových inhibitorů proteas. Výsledné chromatogramy s analýzou frakce pomocí SDS-PAGE je uvedena v obrázku 11.

Obr. 11: Chromatografická separace na koloně CHT5-I a následná kontrola a rozdělení frakcí pomocí SDS-PAGE

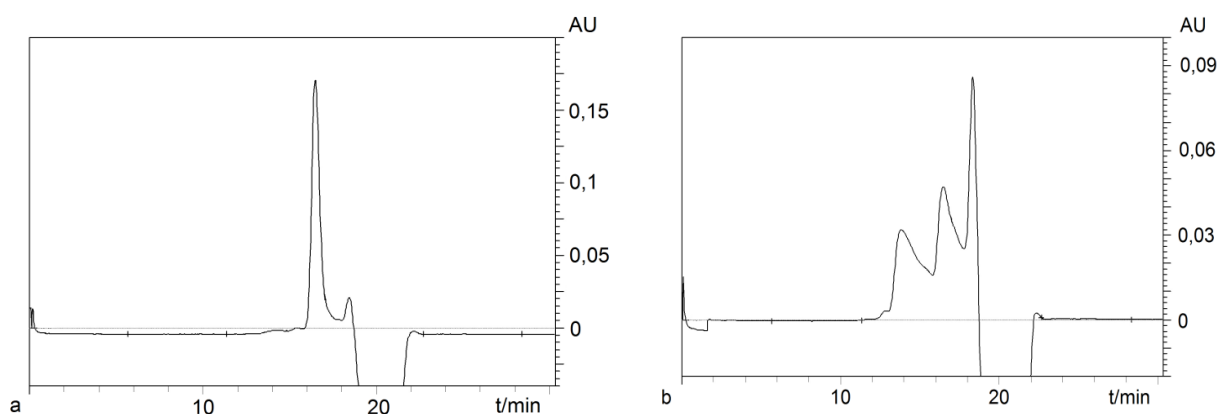


Adéla - A (nahore), Eurostarch - E (dole), průtok: 4 ml m^{-1} , detekce: UV/VIS 214 nm, čísla v poli - označení sbíraných frakcí

5.4.5 Separace PIs pomocí SEC 650

Tento typ kolony byl použit pouze jako doplňková separace PIs v režimu analytické chromatografie. Díky rozdílu molekulových hmotností jednotlivých skupin inhibitorů proteas se podařilo rozdělit zachycenou komplexní frakci z předchozí separace na koloně CHT5-I, přičemž došlo k rozdělení PIs do 2 chromatografických píků u odrůdy Adéla a 3 píků u odrůdy Eurostarch.

Obr. 12: Chromatografická separace na koloně EnRich SEC



a – odrůda Adéla, b – odrůda Eurostarch, průtok: 1 ml m^{-1} , detekce: UV/VIS 214 nm

5.4.6 Separace PIs pomocí Butyl HP a Phenyl FF

Při chromatografii na kolonách využívající hydrofobní interakce nedošlo k rozdělení nanesených proteinů při použití UNO S frakcí odrůdy Siby a rovněž ani při separaci LMW proteinového izolátu 301P. V průběhu chromatografické separace nedošlo ani v jednom z případů k tvorbě píků.

5.5 Hmotnostní spektrometrie

Pomocí technik hmotnostní spektrometrie byly identifikovány zastoupené proteiny, zjištěny jejich molekulové hmotnosti a určena jejich proporcionalita v rámci získaných frakcí. Bylo hodnoceno zastoupení proteinů v komplexních frakcích, celkový hlízový protein získaný po lyofilizaci hlízové vody a souhrnná frakce bazických inhibitorů proteas (frakce „B“), získaná po purifikaci a také dílčí frakce získané po separacích na systému FPLC pomocí iontově výměnných kolon.

5.5.1 Obsah proteinů v bramborové hlízové vodě

V PFJ odrůd Adéla a Eurostarch byl zastoupen celý komplex bramborových hlízových proteinů, které jsou uvedeny v tabulce 14. Mezi dvě majoritní skupiny proteinů u všech variant podle míry zastoupení patří proteiny patatinového komplexu a inhibitory aspartátových proteas (PAPI). U vzorků PFJ nedošlo k výraznější změně v relativním

zastoupení tří majoritních skupin proteinů, kromě vzorku „Adéla 2014“, kdy byla na místo patatinu majoritní skupina inhibitorů aspartátových proteas. Třetí místo zaujímají proteiny, jež nebylo možno identifikovat. Mezi další přítomné inhibitory proteas patří skupina bramborový inhibitor proteas (PI-2) a ostatní inhibitory serinových proteas (zejména typy 3, 5, 6, 7, 8), inhibitory cysteinových proteas (PCPI) a bramborový inhibitor proteas I (PI-1) jsou zastoupeny v malém množství, karboxypeptidasový inhibitor (PCI) byl v uvedených vzorcích zastoupen pouze ve stopovém množství. Ostatní proteiny nepřesáhly více než 10 % obsahu hlízových proteinů. Konkrétní zastoupení a proporcionalita hlízových proteinů u obou odrůd a opakování jsou uvedeny v tabulce 14.

Tab. 14: Relativní [%] zastoupení skupin proteinů v jednotlivých v PFJ odrůd Adéla a Eurostarch v roce 2014 a 2015

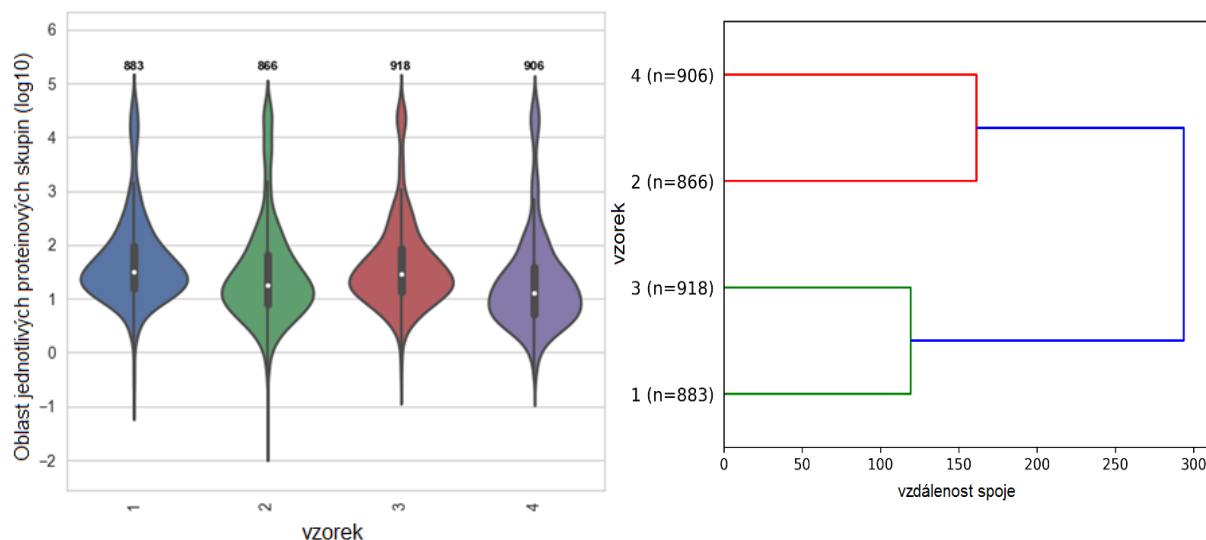
Adéla 2014		Adéla 2015		Eurostarch 2014		Eurostarch 2015	
PAPI	36,8	patatin	31,7	patatin	41,3	patatin	52,3
patatin	22,9	PAPI	21,1	PAPI	20,6	PAPI	17,3
n. p.	11,8	n. p.	16,8	n. p.	10,0	n. p.	7,8
o. SPI	10,2	PI-2	8,4	ostatní	9,2	ostatní	6,1
PI-2	7,8	o. SPI	7,5	PI-2	6,8	o. SPI	5,7
ostatní	4,1	ostatní	6,2	o. SPI	4,8	PCPI	4,8
PCPI	3,4	PCPI	5,3	PCPI	3,8	PI-2	4,0
PI-1	3,0	PI-1	3,0	PI-1	3,5	PI-1	2,0

PAPI - bramborový inhibitor aspartátových proteas, PCPI - bramborový inhibitor cysteinových proteas, o. SPI - ostatní inhibitory serinových proteas, PI-1 - bramborový inhibitor proteas I, PI-2 - bramborový inhibitor proteas II, n. p. - necharakterizované proteiny, jejichž sekvence nemohla být identifikována, ostatní - ostatní identifikované proteiny, nejčastěji enzymy různých typů nebo membránové proteiny (např. lipoxygenasa, glyoxalasa, enolasa, annexin atd.)

Na obrázku 13 je uveden houslový graf vyjadřující podobnosti v zastoupení a kvantitě jednotlivých proteinových skupin mezi odrůdami Adéla a Eurostarch. Vertikální rozvrstvení určuje počet proteinových skupin (\log^{10}), šířka grafů naopak kvantitativní zastoupení jednotlivých proteinových skupin. Čísla nad jednotlivými grafy vyjadřují počet kvantifikovaných proteinových skupin v daném vzorku. Shluková (clusterová) analýza byla použita pro globální srovnání vzorků. Byla provedena pomocí metody hierarchického shlukování za využití Manhattanské metriky pro měření vzdáleností podobnosti vzorků.

V obou případech byla potvrzena větší podobnost vzorků totožných odrůd různých ročníků nežli podobnost totožných ročníků a různých odrůd.

Obr. 13: Houslový graf a shluková analýza orientačně vyjadřující podobnost v relativním zastoupení jednotlivých proteinů u variant PFJ odrůd Adéla a Eurostarch mezi ročníkovými opakováními



Oblast jednotlivých proteinových skupin (*PG Area*) (\log_{10}) - dekadický logaritmus relativního zastoupení proteinových skupin ve vzorku ($PG\ ppm = PG\ area / \text{sum of all } PG\ areas * 1,000,000$)
 1 - Adéla 2014, 2 - Eurostarch - 2014, 3 - Adéla 2015, 4 - Eurostarch 2015

5.5.2 Bazické PIs

Po separaci na koloně UNO S6 bylo identifikováno více skupin bazických bramborových PIs. Mezi jednotlivými frakcemi byly rozdíly v poměru zastoupení skupin PIs, přesto byl však nejčastěji majoritní obsah inhibitorů aspartátových proteas. Nezachycená frakce, u odrůdy Adéla byla tvořena inhibitory aspartátových proteas a proteiny patatinového komplexu u odrůdy Eurostarch. Majoritní část frakcí tvořily také neidentifikované a necharakterizované proteiny o velikostech 24 a 25 kDa, v menší míře 14 kDa. Mezi další obsažené PIs tvořil největší obsah skupina PCPI, PI-2 a ostatní inhibitory serinových proteas, v menší míře, přibližně 5 % bylo zastoupení PI-1. Nezachycenou frakci u odrůdy Eurostarch tvořily především patatiny (36,7 %) a lipoxygenasa společně s proteiny jež pravděpodobně představují lipoxygenasu (32 %), u odrůdy Adéla tvořily nezachycenou frakci především PAPI (56,8 %). V nezachycené frakci odrůdy Adéla byl rovněž zaznamenán poměrně vysoký obsah ostatních proteinů tvořený například lyasou, peroxidasami nebo superoxid dismutasou. Zastoupení jednotlivých skupin proteinů je uvedeno v tabulce 15.

Tab. 15: Relativní [%] zastoupení skupin proteinů v jednotlivých frakcích po separaci na koloně UNO S6 u odrůdy Adéla (A) a Eurostarch (E)

A 2-3		A 12-16		A 17-18		A 22-24	
PAPI	56,8	PAPI	52,7	PAPI	35,2	PAPI	33,7
n. p.	14,1	n. p.	15,5	n. p.	25,3	n. p.	31,1
PI-2	11,3	o. SPI	12,5	PCPI	18,6	PCPI	28,3
PI-1	5,7	PI-2	10,5	o. SPI	9,4	PI-2	3,3
ostatní	7,2	PI-1	7,6	PI-2	6,9	PI-1	3,0
PSPI	4,2	PCPI	0,9	PI-1	4,3	o. SPI	0,6
patatin	0,7	ostatní	0,3	ostatní	0,3	ostatní	0

E 2-3		E 10-11		E 13-16		E 23-26		E 27-32	
patatin	36,7	PAPI	50,3	n. p.	35,5	PAPI	58,8	n. p.	35,4
lipox.	32,0	PI-2	17,8	PAPI	28,0	n. p.	14,0	PAPI	28,0
n. p.	11,7	o. SPI	13,4	PCPI	23,9	PCPI	10,7	PCPI	23,9
PAPI	7,9	PI-1	13,0	PI-2	9,1	PI-2	9,0	PI-2	9,1
PI-1	2,5	n. p.	3,2	o. SPI	3,0	PI-1	6,4	o. SPI	3,0
PI-2	3,4	ostatní	1,9	ostatní	0,5	o. SPI	0,8	ostatní	0,6
PSPI	2,4	PCPI	0,4	PI-1	0	ostatní	0,3	PI-1	0
ostatní	3,4								

PAPI - bramborový inhibitor aspartátových proteas, PCPI - bramborový inhibitor cysteinových proteas, PSPI 7- bramborový inhibitor proteas 7, o. SPI - ostatní inhibitory serinových proteas, PI-1 - bramborový inhibitor proteas I, PI-2 - bramborový inhibitor proteas II, n. p. - necharakterizované proteiny, jejichž sekvence nemohla být identifikována, lipox.- lipoxygenasa, ostatní - ostatní identifikované proteiny, nejčastěji enzymy různých typů nebo membránové proteiny (např. PTI lipoxygenasa, glyoxalasa, enolasa, lyasa, annexin atd.)

5.5.3 Kyselé PIs

Frakce separované pomocí kolony UNO Q6 byly zastoupeny především inhibitory aspartátových proteas, bramborovým inhibitorem proteas II a ostatními inhibitory serinových proteas a necharakterizovanými proteiny. Nejvíce abundantní necharakterizované proteiny mají velikost 25 kDa a méně zastoupené proteiny 14 a 22 kDa. Téměř veškeré inhibitory cysteinových proteas jsou obsaženy v nezachycené frakci odrůdy Eurostarch, u odrůdy Adéla jsou zastoupeny ve frakci A 7. Ostatní identifikované proteiny tvoří nejmenší část obsahu studovaných frakcí separovaných pomocí UNO Q6.

Tab. 16: Relativní [%] zastoupení skupin proteinů v jednotlivých frakcích po separaci na koloně UNO Q6

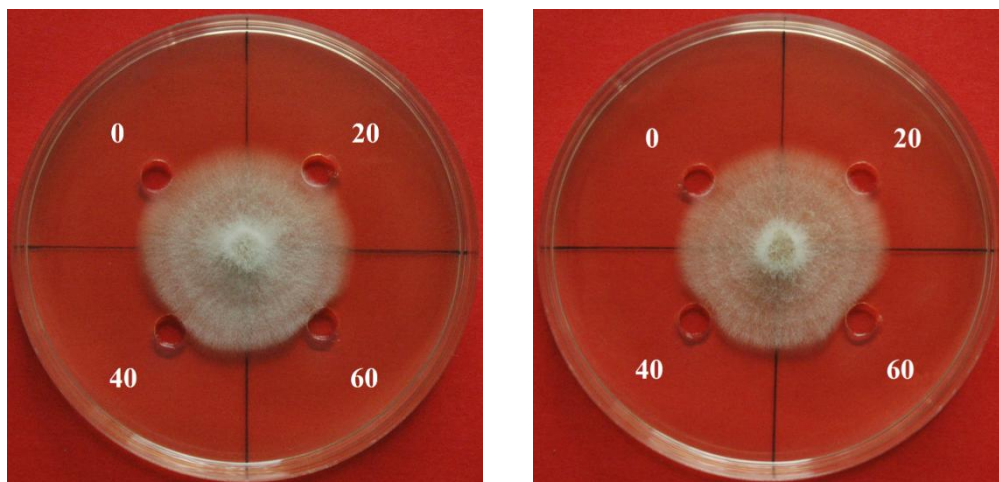
A 7		A 8		A 9		E 2-3		E 8		E 9		E 10-14	
PAPI	25,8	PAPI	42,5	PAPI	36,3	PAPI	39,9	PAPI	39,4	PAPI	28,9	patatin	37,0
PCPI	22,0	o. SPI	22,3	o. SPI	31,5	n. p.	20,6	PI-2	20,2	PI-2	22,1	lipox.	15,1
n. p.	21,3	PI-2	18,8	PI-2	15,3	PCPI	18,8	o. SPI	18,9	o. SPI	19,9	o. SPI	14,0
PI-2	9,9	PI-1	10,3	PI-1	8,9	PI-2	9,8	PI-1	15,9	PI-1	14,0	n. p.	9,2
PSPI 7	9,8	n. p.	3,8	n. p.	6,9	o. PSPI	7,0	n. p.	3,9	n. p.	14,0	PI-2	8,5
PI-1	7,8	PCPI	1,2	ostatní	0,7	ostatní	2,7	ostatní	1,2	ostatní	0,8	PAPI	8,1
o. SPI	2,8	ostatní	1,1	PCPI	0,4	PI-1	1,2	PCPI	0,5	PCPI	0,3	PI-1	5,7
ostatní	0,6											ostatní	1,8
												PCPI	0,6

PAPI - bramborový inhibitor aspartátových proteas, PCPI - bramborový inhibitor cysteinových proteas, PSPI 7- bramborový inhibitor proteas 7, o. SPI - ostatní inhibitory serinových proteas, PI-1 - bramborový inhibitor proteas I, PI-2 - bramborový inhibitor proteas II, n. p. - necharakterizované proteiny, jejichž sekvence nemohla být identifikována, lipox.- lipoxygenasa, ostatní - ostatní identifikované proteiny, nejčastěji enzymy různých typů nebo membránové proteiny (např. lipoxygenasa, glyoxalasa, enolasa, annexin atd.)

5.6 Antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivity byly zjišťovány prostřednictvím biotestů na pevném mediu vůči významným houbovým patogenům brambor - *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani*. Antifungální aktivita byla prokázána v případě frakcí „B“ u obou odrůd, čili převážně bazických PIs ve formě komplexu inhibitorů aspartátových, cysteinových a serinových proteas (Obr. 14). Inhibiční zóny byly vytvořeny v případě vysokých koncentrací proteinů v roztoku (40 a 60 mg/ml) viditelně vůči patogenu *F. solani*. Slabá, pouze nepatrně pozorovatelná, antifungální aktivita byla prokázána také v případě proteinové frakce „Adéla UNO S6 12-15“ a právě také u „B“ frakcí obou odrůd o koncentraci 10 mg/ml vůči *F. solani*. V rámci ostatních zkoumaných frakcí nebyla antifungální aktivita průkazně potvrzena, avšak v rámci některých testů docházelo k vytvoření anomálií v inhibici růstu, vzniklé pravděpodobně silnou a nepravidelnou difuzí roztoku do media, jejichž ukázky jsou uvedeny v příloze 14.

Obr. 14: Antifungální působení roztoků PIs o koncentraci 20-60 mg/ml obsažených v „B“ frakcích odrůd Adéla (vlevo) a Eurostarch (vpravo) vůči patogenu *Fusarium solani*



0, 20, 40, 60 - koncentrace proteinového roztoku [mg/ml], nanáška roztoku - 30 μ l/jamka

5.7 Antioxidační aktivity proteinových frakcí

Mírou zhášení kyslíkových radikálů ABTS a DPPH byly získány výsledky antioxidačního působení jednotlivých frakcí PIs (Tab). Na základě získaných výsledků lze potvrdit antioxidační aktivity bramborových inhibitorů proteas, zejména u metody využívající radikál ABTS. Pomocí metody dvouvýběrového t-testu (test středních hodnot) byly porovnány výsledky zhášecích aktivit u obou metod mezi rozdílnými koncentracemi. Zatímco u metody využívající radikál DPPH nebyl zaznamenán průkazný rozdíl ve zhášecích aktivitách mezi jednotlivými frakcemi na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ($t = 6,411$; $p = 0,360$), u metody využívající ABTS byl prokázán statisticky významný rozdíl ($t = -5,425$; $p = 0,000$). Mezi jednotlivými frakcemi se v případě vyšší koncentrace projevil rozdíl v hodnotách antioxidačních aktivit. Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u frakcí „B“ obou odrůd při koncentraci 60 mg/ml. Lze tedy potvrdit nárůst antioxidační aktivity se zvyšující se koncentrací proteinů v případě metody využívající radikál ABTS.

Tab. 17: Antioxidační aktivita vybraných frakcí PIs

Frakce	Zhášecí aktivita DPPH* [%]		Zhášecí aktivita ABTS* [%]	
	10 mg/ml	60 mg/ml	10 mg/ml	60 mg/ml
AB1	8,9	10,2	15,1	96,2
EB1	8,6	9,8	21,3	97,1
AD1	7,2	2,9	10,1	39,0
ED1	7,8	3,4	10,9	46,6
AS 12-15	15,0	5,8	12,2	57,3
AS 17-18	11,5	3,9	9,1	23,2
AS 21-25	11,3	4,0	9,3	24,1
AS 29-30	9,5	5,1	10,9	22,9
ES 1-3	15,3	6,2	12,3	59,1
ES 12-15	13,6	5,7	10,3	27,7
ES 23-25	13,9	5,8	10,3	41,2
ES 29-31	7,3	4,4	9,6	20,8
AQ 7-8	6,8	2,7	9,2	45,2
AQ 9-10	15,2	2,1	10,4	47,6
AQ 13-14	13,4	2,1	8,9	33,0
EQ 7	13,1	2,6	7,3	22,5
EQ 8-9	7,1	2,0	7,8	56,4
EQ 10-14	5,0	2,7	9,9	41,4

* Zhášecí aktivita je schopnost látek ve vzorku, vykazující antioxidační aktivity, zhášet kyslíkový radikál. Tato aktivita je vyjádřena spektrofotometricky měřitelným, relativním úbytkem absorbance způsobený reakcí vzorku s pracovním roztokem radikálu vůči samotnému pracovnímu roztoku radikálu

6. DISKUZE

6.1 Obsah sušiny a dusíkatých látek

Obecně lze tvrdit, že odrůdy s kratší vegetační dobou, nejčastěji pro přímý konzum, se vyznačují nižším obsahem sušiny, jež je tvořena zejména škrobem, než odrůdy polopozdní a pozdní určené především ke zpracování. Lze tedy říci, že samotná odrůda má podstatný vliv na obsah sušiny (Bárta et al., 2008). Zjištěné obsahy sušiny hlíz v této práci u studovaných odrůd brambor potvrzují uvedený předpoklad. V případě odrůd určených pro přímý konzum - Adély (raná) a Laury (poloraná) byl obsah sušiny statisticky průkazně menší (v průměru 17,1 %), než u odrůd pro zpracování - Eurostarch, Siby a Ornella (polopozdní až pozdní), kde činil obsah sušiny v průměru 22,5, čili zhruba o třetinu vyšší.

Bradshaw & Ramsay (2009) uvádí obsah dusíkatých látek (NL) v sušině v rozmezí 6-15 %, přičemž čisté bílkoviny tvoří jejich poloviční či mírně nadpoloviční část. Obsah dusíkatých látek zjištěný v sušině hlíz vybraných odrůd v rámci této práce se vyskytoval v rámci uvedeného rozptylu. Vyšší obsah byl zjištěn u konzumních odrůd Adéla a Laura a u odrůdy pro zpracování Eurostarch. U odrůd Ornella a Siby byl obsah NL podstatně nižší. I přes vyšší obsah NL u odrůdy Eurostarch byl v souhrnu prokázán statisticky významně vyšší obsah dusíkatých látek u odrůd pro přímý konzum. Uvedené výsledky a statistické hodnocení tedy potvrdily nepřímou úměru mezi obsahem sušiny a dusíkatých látek.

Obsah dusíku a dusíkatých látek ovlivňují kromě odrůdy ještě další faktory. Gugala et al. (2015) v rámci jejich výzkumu potvrdili pozitivní vliv herbicidů na hladinu celkového dusíku v bramborových hlízách. Vlivem působení herbicidů tedy pravděpodobně dochází ke stresu, jenž může mít za následek vyšší kumulaci proteinů v hlízách. Kromě vlivu herbicidů byl rovněž v rámci této studie a studie provedených Lachmanem et al. (2005) potvrzen signifikantní vliv pěstební oblasti a průběhu počasí (ročníku) na obsah dusíku v hlízách (Gugala et al.; 2015; Lachman et al., 2005).

6.2 Obsah polyfenolů u odrůd a jejich antioxidační aktivity

Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že obsah polyfenolů v sušině byl v průměru více než 1,5x vyšší u konzumních odrůd v porovnání s odrůdami pro zpracování.

Srovnání tohoto parametru u odrůd pro přímý konzum a odrůd pro zpracování dosud nebylo publikováno, proto by bylo vhodné na tuto studii navázat. Obsah polyfenolů pozitivně koreluje se zhášecí aktivitou jak vůči radikálu ABTS, tak DPPH. Lze tedy potvrdit, že antioxidační aktivita je přímo úměrná celkovému obsahu polyfenolů. Tuto přímou souvislost také potvrzuje práce Lachmana et al. (2006), ve které byl potvrzen až o polovinu vyšší obsah polyfenolů a úměrně celková antioxidační kapacita u brambor fialových odrůd oproti bramborám se žlutou dužninou. Stěžejní roli v tomto daném výzkumu hrál především daleko vyšší obsah anthokyanů u fialových odrůd. Kromě anthokyanů zvyšují antioxidační aktivitu také karotenoidy (xantofily) či kyselina askorbová. Obsah všech těchto látek je jedním ze znaků představující vnitřní kvalitu odrůdy a je dán především genotypem. Cílem šlechtitelů je tedy mimo jiné zvyšování obsahu fenolických a jiných antioxidačních látek v hlízách bramboru (Hamouz et al., Brown, 2005. Kromě genotypu byl potvrzen také vliv nadmořské výšky a hnojení draslíkem a hořčíkem na obsah polyfenolů (Lachman et al., 2006). Obsah polyfenolů a vyšší antioxidační aktivita byla u odrůd pro přímý konzum rovněž statisticky významně vyšší než u odrůd pro zpracování, což může být dáno například výběrem materiálu, při šlechtění a tvorbě konzumních odrůd, který vykazuje vyšší vnitřní kvalitu čili též vyšší antioxidační aktivitu.

6.3 Koncentrace, obsah a relativní abundance bílkovin

S obsahem sušiny i dusíkatých látek souvisí obsah proteinů. Statistickým hodnocením byla zjištěna negativní korelace mezi relativním obsahem „čistých“ bílkovin a dusíkatých látek ($N \times 6,25$). Na základě získaných výsledků byl zjištěn průměrně vyšší obsah proteinů v PFJ u studovaných odrůd pro zpracování (14,5 g/l PFJ) v porovnání s odrůdami pro přímý konzum (12,1 g/l PFJ). U konzumní odrůdy Laura byl přesto zjištěn nepatrně vyšší obsah bílkovin v PFJ, než u odrůdy Eurostarch (Tab. 12). U odrůdy Siby byl zjištěn větší výtěžek bílkovin v porovnání s obsahem bílkovin v PFJ. Zjištěný výsledek byl pravděpodobně způsoben chybou v měření, která může souviset s použitou metodou BCA. Tato metoda může vzhledem k jejímu principu vykazovat odchylky v měření.

Zjištěné výsledky obsahu průměrného obsahu bílkovin podle typu odrůdy odpovídají studii provedené autory Bárta & Bártová (2007), podle které bylo také zjištěno vyšší průměrné zastoupení bílkovin u 20 odrůd pro zpracování (58,1 %) oproti stejnému počtu odrůd pro přímý konzum (48,5 %). Zastoupení bílkovin ale může být však u jednotlivých

odrůd, či jejich typů, variabilní, jak bylo zjištěno právě u odrůdy Laura. Predikce, že odrůdy pro zpracování mají vyšší obsah bílkovin, než odrůdy pro konzum tedy nemusí být vždy potvrzena. Vyšší obsah bílkovin u odrůd pro zpracování by bylo možné zdůvodnit lepší schopností utilizace jednoduchých dusíkatých látek do bílkovinné podoby. Autoři ve své práci svými výsledky také naznačují, že odrůdy s vyšším obsahem sušiny (převážně odrůdy pro zpracování) jsou schopny tvořit bílkoviny v hlízách více, než odrůdy (pro přímý konzum) s nižším obsahem sušiny, což potvrzují také výsledky uvedené v této práci. Kromě uvedených souvislostí zjistili také negativní korelaci mezi raností a obsahem bílkovin v čerstvé hmotě. Negativní korelaci mezi těmito znaky uvádí ve své práci také Miedema et al. (1976). Kromě odrůdy mají statisticky významný vliv na obsah dusíku a dusičnanů v hlízách také oblast pěstování a rok pěstování spojené s mnoha dílčími faktory (Lachman et al., 2005).

Ze získaných výsledků koncentrace a odvozených výtěžků bílkovin vyplývá, že nejvyšších výtěžků dosahují frakce „B“ (průměr všech odrůd činí (246 mg) a „C“ (267 mg). Vlivem dalšího purifikačního procesu dochází ke snížení výtěžku bílkovin u frakcí „D“ (64 mg) a „E“ (90 mg). Pokles koncentrace je způsoben nepřítomností frakce „B“ a částečným ztrátám proteinů v mrtvém objemu spolu s pufry. Koncentrace frakcí získaných po separaci UNO S6 byla v průměru 64 $\mu\text{g/ml}$, přičemž koncentrace některých frakcí bez zakoncentrování v původním stavu se však blížila téměř nulovým koncentracím, z tohoto důvodu by bylo v případě dalších separací a měření nutno zvážit zakoncentrování bílkovin v daných frakcích.

Pomocí MS analýz bylo v rámci identifikovaných proteinů v PFJ potvrzeno převažující zastoupení PIs (45,1 %) oproti patatinu (37,1 %) v průměru obou odrůd a ročníkových opakování. Pouvreau (2004) pomocí MS identifikace získala podobné celkové výsledky zastoupení patatinu (37,5 %) a PIs (48,0) u odrůdy Elkana. Obě studované odrůdy se však v rámci této práce od sebe výrazně liší, u odrůdy Adéla výrazně převyšují PIs, u odrůdy Eurostarch naopak patatin. U odrůdy PFJ odrůdy Adéla z roku 2014 předčil obsah samotných inhibitorů aspartátových obsah patatinů téměř dvojnásobně. Rozdíl ve výrazně vyšší expresi PIs na úkor patatinu může být způsoben silným působením biotických nebo abiotických stresorů, případně jejich kombinací. Projevil se rovněž velmi výrazný rozdíl v proporcionalitě obsažených PIs. Stejným způsobem jako v práci nizozemské autorky Pouvreau (2004) významně převažuje obsah PI-2 (22,3 % v PFJ), převažují v rámci této práce proteiny ze skupiny PAPI u obou odrůd (Adéla - 29 %, Eurostarch - 19 %). Obsah PCPI v rámci tohoto srovnání byl v průměru více než o 7 % vyšší v průměru PFJ odrůd Adéla i Eurostarch oproti odrůdě Elkana. Pomocí provedených analýz nebylo možné charakterizovat a klasifikovat

v průměru obou odrůd 11,6 % obsažených proteinů. Zjištěné molekulové hmotnosti pohybující se v rozmezí 24-25 kDa ukazují na možné zastoupení dalších PIs, zejména PAPI nebo PSPI. V rámci těchto skupin byly identifikovány jednotlivé proteiny právě s těmito molekulovými hmotnostmi.

Celkové srovnání rozvrstvení relativního obsahu jednotlivých skupin pomocí houslového grafu a shlukové analýzy potvrdil větší podobnost mezi stejnými odrůdami v rámci obou ročníků, než mezi oběma odrůdami v rámci jednoho ročníku. Toto orientační srovnání naznačuje větší vliv genotypu (odrůdy) na zastoupení proteinových skupin než vliv prostředí (ročníku). Dosud však u brambor nebyla provedena žádná studie srovnávající zastoupení jednotlivých proteinových skupin v bramborových hlízách u více odrůd a ročníkových opakování, která by studovala vliv těchto faktorů na obsah a skladby hlízových proteinů. Případná studie by také mohla pomoci objasnit markantní rozdíly v proporcionalitě jednotlivých skupin PIs u odrůd studovaných v rámci této práce s odrůdou *Elkana* studovanou v rámci práce autorky Pouvreau (2004).

6.4 Hodnocení úspěšnosti dvoustupňové purifikace PIs

Pomocí SDS-PAGE a MS byla potvrzena úspěšnost dvoustupňové purifikace. Na elektroforeogramech SDS-PAGE zachycující proteiny obsažené ve frakcích „B“ a „D“, kde byl předpoklad přítomnosti samotných PIs, byly vizualizovány pruhy o malé molekulové hmotnosti (do 20 kDa), zatímco u frakcí „C“ a „E“ s predikcí obsahu patatinu došlo k zobrazení pruhů o velikosti ~40 kDa, naznačující pravděpodobnou přítomnost proteinů patatinového komplexu. Kromě odstranění patatinu došlo také k odstranění drtivé většiny ostatních proteinů, především enzymů. Největší výhodou tohoto postupu obecně je možnost získání jak patatinu, tak PIs v nativním stavu se zachovanou biologickou aktivitou. Díky tomu že se jedná o chromatografickou purifikaci, lze při aplikaci velkých kolon využít tento způsob také v průmyslovém měřítku. V rámci této práce bylo potvrzeno částečné zachování biologických aktivit zejména u frakcí „B“ po prvním kroku purifikace, kdy byla potvrzena jejich antimikrobiální a zvýšená antioxidační aktivita.

Dvoustupňová purifikace patatinu (podle Racusen & Foote, 1980) není však jedinou možnou metodou umožňující separaci patatinu a PIs. Pouvreau (2004) ve své práci u odrůdy *Elkana* použila pro prvotní separaci hlízových proteinů jiný postup. V prvním kroku využila k rozdělení proteinů v PFJ kolonu Superdex 75 prep grade (GE Healthcare, USA) fungující

v režimu gelové permeační chromatografie. V tomto kroku došlo rozdělení inhibitorů proteas do 3-4 samostatných frakcí. Proteiny patatinového komplexu byly zachyceny v první frakci společně s bramborovým inhibitorem I (PI-1). K oddělení patatinu (40-42 kDa) od PI-1 (ve formě polymeru 38,5-39,5 kDa) došlo pomocí tepelné koagulace. Zatímco PI-1 díky svojí termostabilitě zůstal rozpuštěný v roztoku, termolabilní patatin koaguloval a precipitoval. Druhou frakci představovala většina skupin PIs (20-23 kDa) kromě inhibitorů karboxypeptidas (4,3 kDa), které byly následně identifikovány ve frakci 3 a 4. K dělení hlízových proteinů dochází tedy podle velikosti, nikoli podle jejich náboje jako v případě dvoustupňové purifikace. Tento postup však představuje vhodnou alternativou pro purifikaci a rozdělení bramborových PIs využitého v této práci. Obecnou nevýhodou je však oproti němu nutnost odstranění patatinu pomocí tepelné koagulace, čímž dojde k jeho ireverzibilní denaturaci.

Pomocí dalšího způsobu autorů Bauw et al. (2006) zmiňované v rešeršní části této práce byly proteiny izolovány srážením, separovány pomocí 2D elektroforézy a vyříznuty cílové frakce proteinů či jednotlivé proteiny z gelu. Největší výhodou tohoto postupu je propojení purifikačního procesu a separace do jednoho kroku a jeho účinnost. Lze pomocí něj detailně izolovat jednotlivé reverzibilně denaturované hlízové bílkoviny: jednotlivé PIs či jejich skupiny, isoformy patatinů či ostatní hlízové bílkoviny a posléze provádět jejich analýzy a separace na peptidy pomocí technik MS a dále molekulárně biologické metody. Tento způsob jednokrokové izolace, purifikace a separace PIs není však možno v této formě použít pro preparativní způsoby, nelze tedy detailně provádět studium jejich vlastností a aktivit a samozřejmě nelze využít způsob v této formě pro tvorbu bílkovinných izolátů.

Nejnovějším způsobem izolace PIs z hlíz brambor je kombinace vakuového odpařování a srážení ethanolem následovaná resolubilizací proteinů pomocí trisového pufru. Patatiny s většinou PIs jsou srážením ireverzibilně denaturovány a není možné provést v dalším kroku jejich resolubilizaci. Rozpuštěné proteiny, tvořící přibližně 12 % vysrážených proteinů z předchozího kroku, tedy představuje frakci stabilních PIs. Tyto PIs mají zachovanou biologickou aktivitu, což dokládá jejich inhibiční aktivita vůči trypsinu. Nevýhodami, na rozdíl od mnou provedeného postupu, je v tomto případě zejména nízká výtěžnost proteinů, neselektivní izolace menší frakce bramborových PIs a nerozdělená, vysrážená frakce komplexu inhibitorů proteas a patatinů. Jedná se však o poměrně jednoduchý způsob získání frakce PIs v nativním stavu, který je potenciaálně využitelný v průmyslovém měřítku (Taskila et al.).

Dvoustupňová purifikace patatinu a PIs ve srovnání s ostatními metodami izolace hlízových proteinů poskytuje řadu výhod, jež jsou uvedeny v prvním odstavci této kapitoly. Vlivem jednotlivých purifikačních kroků došlo k pravděpodobnému postupnému snižování biologických aktivit, přičemž u některých proteinových frakcí mohly být aktivity sníženy natolik, že u těchto frakcí mohl být zachovaný pouze zbytkový efekt, což bylo naznačeno pomocí hodnocení antioxidačních a antifungálních aktivit jednotlivých frakcí.

6.5 FPLC separace a hodnocení získaných frakcí

Jak již bylo uvedeno v literární části a potvrzeno v experimentální části této práce, bramborové PIs jsou majoritním komplexem jednotlivých proteinů, či skupin proteinů často tvořenou v některých případech pouze jedním či dvěma zástupci. Jednotlivé PIs vykazují často homologii v rámci určitých vlastností s jinými PIs (například MW nebo pI), velmi často se ale vzájemně liší jinými vlastnostmi. Proto je velmi obtížné je úspěšně rozdělit a purifikovat ze širších komplexů do užších skupin na základě společných vlastností (molekulové hmotnosti, pI a náboji či afinitě k určitým látkám či jiných biologických aktivit). Chromatografické separace na systému FPLC použité v rámci provedené studie tím pádem nemohly zcela oddělit jednotlivé skupiny či zástupce PIs v purifikované formě. Jeden z mála způsobů umožňující separaci jednotlivých PIs je například 2D elektroforéza, jež je zmíněna v postupu v kapitole 6.4. Výsledky MS analýzy ukazují, že lze pomocí separace na systému FPLC částečně oddělit frakce na základě proporcionality skupin PIs, ale i jednotlivých proteinů v rámci těchto skupin.

6.5.1 Separace bazických PIs na koloně UNO S6

Podle elektroforetických a analýz hmotnostní spektrometrie provedených Pouvreau (2004) po separaci na koloně Source 15S bylo v oblasti PIs s hodnotou isoelektrického bodu v bazické oblasti potvrzeno zastoupení inhibitoru cysteinových proteas (PCPI) a jeho isoform, inhibitoru aspartátových proteas (PAPI) a komplex inhibitorů Kunitzova typu (PKPI). Všechny tyto skupiny zahrnují PIs o velikosti přibližně 20-21 kDa (Pouvreau, 2004). I v tomto případě se výsledky zastoupení PIs liší od práce autorky Pouvreau (2004), přítomné PIs v separované na koloně UNO S6 v rámci této práce byly identifikovány jako PAPI, PI-2 a PI 1 a další PSPI, navíc byly rovněž identifikovány zástupci PCPI a stopy PCI.

Mezi jednotlivými separovanými frakcemi PIs docházelo ke změnám proporcionality, přesto však vždy byly výrazně majoritní PIs ze skupiny PAPI. Druhou nejvíce zastoupenou skupinou byly neidentifikované proteiny, které s velkou pravděpodobností patří mezi PAPI nebo PSPI. Významné je rovněž zastoupení lipoxygenasy a proteinů jež pravděpodobně představují lipoxygenasu u nezachycené frakce odrůdy Eurostarch.

Pro detailnější rozdělení na jednotlivé isoformy v rámci daných skupin PIs by bylo nutné optimalizovat chromatografii využívající hydrofobní interakce (HIC, *Hydrophobic interaction chromatography*), která byla úspěšně použita ve srovnávané práci dle Pouvreau (2004), avšak v rámci této studie nedošlo při použití kolon využívajících tento princip k úspěšné separaci bramborových PIs.

6.5.2 Separace kyselých PIs na koloně UNO Q6

Po separaci na koloně Source Q15 provedených Pouvreau (2004) byla identifikována přítomnost PI-1, PI-2 a PCPI. Přestože frakce separované pomocí kolony UNO Q6 jsou zastoupeny také především PIs ze skupiny PAPI a neidentifikovanými proteiny, významné je také zastoupení PI-2 a dalších inhibitorů serinových proteas a PCPI. Stejně jako v případě separace na UNO S6 nebylo možno zcela oddělit jednotlivé skupiny PIs do užších skupin, zejména nedošlo k oddělení bazických PAPI od inhibitorů serinových proteas, k čemuž by bylo opět vhodné využít například optimalizované metody HIC nebo GPC. Zbytkové molekuly patatinu ve frakci „D“ u frakce 10-14 byly retenovány v koloně pomocí měniče aniontů, avšak k jejich eluci došlo až v pozdní fázi separace díky vzrůstajícímu gradientu eluční síly.

6.5.3 Separace pomocí CHT5-I, Enrich SEC 650 a HIC kolon

Pro detailnější rozdělení byla zvolena separace na koloně CHT5-I využívající nespecifických interakcí, čili afinitu mezi separovanými bílkovinami a ligandem. Pomocí této separace došlo k oddělení zachycené a neseparované frakce. V případě některých vzorků napříč oběma odrůdami došlo k oddělení menšího píku. Po ověření přítomných skupin PIs pomocí SDS-PAGE a MS technik nemá tento typ separace z důvodu malého rozlišení větší význam. Docílení lepší separace by mohlo být zprostředkováno využitím odlišného typu ligandu v rámci AC. Z důvodu detailnějších separací frakcí získaných pomocí IEX bylo

přistoupeno k použití kolon fungující na principu gelové permeační, a hydrofobních interakcí využívající chromatografie.

Metoda separace pomocí kolony EnRich SEC 650 byla zvolena jako alternativa k separaci na základě principů afinitní chromatografie, případně HIC. Pomocí této chromatografie došlo k rozdělení vybraných frakcí po separaci na CHT koloně do 2-3 dílčích píků. Vzhledem k použití této kolony pouze k analytickým účelům, umožňující mizivý výtěžek bílkovin v separovaných frakcích, nebyly frakce sbírány a dále analyzovány. Avšak právě tento způsob separace detailnějších frakcí by mohl představovat vhodnou alternativu k separaci na CHT-I pro detailnější rozdělení skupin proteinů získaných iontově výměnou chromatografií. Při aplikaci větších, preparativních kolon by mohla být GPC naopak použita pro prvotní rozdělení PIs a patatinu stejně jako v práci autorky Pouvreu (2004).

Při separaci pomocí kolon využívající hydrofobní interakce nedošlo k rozdělení inhibitorů proteas u použitých frakcí. Přestože chromatografie typu HIC byla již v minulosti využita k separaci bramborových inhibitorů proteas, v rámci výzkumu spojeného s touto prací se kolony nepodařilo rozdělit. Pouvreau (2004) použila v rámci svého experimentu, k separaci na koloně s hydrofobními interakcemi medium Phenyl Superose (Amersham Biosciences, USA), frakce inhibitorů proteas získaných po separacích na iontově výměnných kolonách (Source 15 S/Q). Došlo k separaci a dobrému rozlišení více proteinových frakcí, které byly následně identifikovány jako PI-1, PI-2, PAPI, PCPI a PKPI. Schmidt et al. (2017) ve své práci použili pro separaci purifikovaných inhibitorů proteas z PFJ a proteinových izolátů, kolonu s náplní Butyl Sepharose High Performance (GE Healthcare, USA). Pomocí této separace se v obou případech směsných frakcí bramborových PIs (purifikovaných z PFJ a z proteinového izolátu) podařilo rozdělit vzorky do dvou frakcí (píků), přičemž obsah jedné frakce tvořil inhibitor serinových proteas 5 a inhibitor aspartátových proteas 2 a druhá frakce obsahovala směs PIs ze skupiny PI-2, inhibitorů cysteinových proteas a rovněž také některé inhibitory serinových a aspartátových proteas (Schmidt et al., 2017). Z uvedených výsledků vyplývá, že HIC chromatografie je v případě bramborových PIs vhodnější spíše pro rozdělení detailnějších frakcí. Frakce použité v rámci této separace byly velmi komplexní, což mohlo být příčinou neúspěšného rozdělení PIs.

6.7 Antimikrobiální aktivity

Jak bylo uvedeno v literární části této práce (kapitola 2.3.1), antimikrobiální aktivita bramborových PIs byla v podmínkách *in vitro* potvrzena v řadě prací (Kim et al., 2006; Park et al., 2005; Tripathi et al., 2006). Na základě výsledků této práce byly antimikrobiální aktivity potvrzeny ve výraznější míře při vysokých koncentracích v rámci v „B“ frakcí obou odrůd, v menší míře u frakce „Adéla UNO S 12-15“ proti patogenu *F. solani*. Nepravidelné inhibiční zóny pozorované v některých případech (Příloha 14) mohly být způsobeny zbytkovým efektem antifungálního působení v součinnosti se silnou difuzí roztoku do media. Z těchto výsledků lze přinejmenším potvrdit antifungální působení komplexu inhibitorů proteas *in vitro* (PAPI, PCPI, PCI, případně PSPI). Vlivem purifikačních a separačních procesů, interakcí s pufrů a ligandy, mohlo docházet k postupnému snížení antimikrobiálních aktivit u detailnějších frakcí získaných pomocí separace na FPLC. Potvrzené antimikrobiální aktivity byly zaznamenány u frakcí, které neprošly druhým krokem dvoustupňové purifikace dle Racusen & Foot (1980).

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že uvedený postup, zejména po druhém kroku dvoustupňové purifikace, není příliš vhodný pro testování antimikrobiálních aktivit bramborových PIs. Termolabilní PIs srážecími a purifikačními procesy trpí a postupně dochází ke ztrátě jejich biologických aktivit, což bylo naznačeno významnou ztrátou antimikrobiální aktivity po druhém kroku dvoustupňové purifikace. Zatímco v prvním testování antimikrobiálních aktivit byla zachována částečná aktivita některých frakcí, v dalších případech testování nebyla aktivita potvrzena, kromě výše uvedené výjimky.

Vhodnější a ověřený postup pro testování a zachování významné antimikrobiální aktivity bramborových PIs je popsán v práci autorky Kamenová (2016), kde je navržen a optimalizován postup pro přímou izolaci PIs pomocí tepelné koagulace (při 80 °C) z hlízové (odráždové) šťávy. Při tomto postupu dochází k separaci termolabilního patatinu z hlízové šťávy a termostabilních PIs (identifikovaných jako PI-1, PI-2 a PCI) se zachovanou nebo částečně zachovanou antifungální aktivitou. Nejvýraznější inhibice růstu pomocí takto získaných PIs byla zaznamenána u odrůdy Sibů vůči patogenům rodu *Fusarium* (*graminearum*, *oxysporum* a *solani*).

Využitelnost postupu tepelné koagulace pro izolaci termostabilních PIs dokládají také další studie. Ruseler - van Embden et al. (2004) využili metodu tepelné koagulace (65 °C, 15 min), kdy došlo k rozdělení hlízových proteinů do dvou frakcí - původní precipitované frakce

a užší resolubilizované frakce. Obě frakce měly následně vliv na potlačení růstu fekálních bakterií a jejich proteolytického působení. Kim et al. (2006) využili ve své studii tepelnou koagulaci (70 °C, 20 min) v kombinaci s ultrafiltrací a purifikovali pomocí DEAE a HPLC potide-G - serinový inhibitor Kunitzova typu. Takto izolovaný peptid vykazoval širokospektrální působení proti řadě patogenních bakterií a hub. Satheesh & Murugan (2010) použili pro purifikaci 14,3 kDa velkého inhibitoru proteas kombinaci precipitace síranem amonným a medium Sephadex G-75 a DEAE sepharosy, čistota purifikovaného proteinu byla ověřena pomocí RP-HPLC. Takto získaný protein také vykazoval široké působení proti různým druhům bakteriálních i houbových patogenů.

Podle uvedených postupů je zřejmé, že dosud nejjednodušší cestou pro využití antimikrobiálního potenciálu bramborových PIs je izolace a purifikace termostabilních zástupců PIs, u kterých zůstávají nejvíce zachovány jejich biologické aktivity, případně využít postupy, které umožní zachování antimikrobiálních aktivit u celého spektra bramborových PIs, například membránové a chromatografické techniky za trvale udržovaných nízkých teplot.

6.8 Antioxidační aktivity proteinových frakcí

Podle Li et al. (2008) antioxidační aktivity peptidů a bílkovin či jejich dílčích frakcí a schopnost zhášení kyslíkových radikálů silně koreluje s jejich aminokyselinovým složením. Pozitivní vliv má podle uvedené studie vyšší obsah hydrofobních aminokyselin a histidinu. Bramborové inhibitory proteas na základě získaných výsledků vykazují při vysoké koncentraci (60 mg/ml) významnou antioxidační aktivitu prokázanou zhášením radikálů DPPH i ABTS, která může být ovlivněna právě vyšším obsahem hydrofobních aminokyselin v bramborových PIs (Bárta et al., 2015). Se vzrůstajícími počty purifikačních kroků a separací PIs byl však zaznamenán u „detailnějších“ frakcí PIs pokles jejich antimikrobiálních aktivit a rovněž antioxidační aktivity, čili nejvyšších antioxidačních aktivit, stejně jako v případě antimikrobiálních aktivit, dosahují frakce „B“ obou odrůd. Důvod poklesu antioxidačních aktivit pravděpodobně nebude způsobený degradací bílkovin, kratší peptidy (štěpy) mívají často zachovanou a často dokonce vyšší antioxidační aktivitu než původní bílkoviny. Pro zpřesnění míry antioxidačních aktivit bramborových PIs by bylo vhodné analýzy doplnit dalšími metodami stanovení antioxidačních aktivit, například metodou FRAP (*Ferric reducing antioxidant potential*) a ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*).

7. ZÁVĚR

Jak již bylo uvedeno, inhibitory proteas jsou velice širokou a heterogenní skupinou proteinů vyskytující se napříč *Eukaryoty* i *Prokaryoty*. Jejich klasifikace je však i do současné doby nejednoznačná a obtížná. V bramborových hlízách plní tři funkce, přičemž nejvýznamnější je funkce obranná, kdy působí v rámci nespecifické imunity vůči mikrobiálním a hmyzím patogenům. Kromě schopností antifungálních a insekticidních byla prokázána řada vlastností a aktivit, které společně předurčují jejich využití v oblastech medicíny, fytofarmacie, potravinářství, kosmetice, případně dalších aplikacích.

Mezi nejčastěji využívaný způsob získávání hlízových proteinů, včetně PIs, v průmyslovém měřítku pro krmivářské účely patří tepelná koagulace či isoelektrická precipitace. Pro zachování jejich biologických aktivit, funkčních vlastností a tím pádem plnohodnotné aplikace je nutné použít a optimalizovat jiné techniky izolace a separace. Největší potenciál v možnosti získání PIs z hlízové vody právě v nativním stavu mají chromatografické a membránové (filtrační) metody, případně jejich kombinace. Takto získané bílkoviny mohou být potenciálně využitelné ve zmiňovaných oblastech lidské činnosti.

Na základě navržených cílů této práce byly zjišťovány vlastnosti výchozího materiálu, dále byla provedena chromatografická purifikace bramborových PIs a jejich separace na systému FPLC. Posledním cílem bylo studium vybraných vlastností a aktivit získaných frakcí PIs. Cílem této práce bylo zjištění vlastností výchozího materiálu ve formě bramborové hlízové vody a bramborové mouky pěti vybraných odrůd, hlavním cílem následně bylo studium možností a provedení detailního postupu izolace a separace inhibitorů proteas pomocí chromatografických technik z hlíz bramboru odrůd Adéla a Eurostarch a třetím cílem bylo studium vlastností jednotlivých, separovaných skupin bramborových PIs.

7.1 Vlastností výchozího materiálu

Bylo prokázáno rozdílné průměrné zastoupení sušiny mezi konzumními odrůdami (17,1 %) a odrůdami pro zpracování (22,5 %). Obsah dusíkatých látek byl v průměru naopak vyšší u odrůd konzumních brambor (10,5 %) oproti odrůdám pro zpracování (7,2 %), a byl nepřímo úměrný obsahu sušiny. Obsah čistých proteinů v PFJ byl však naopak průměrně vyšší u odrůd pro zpracování (14,5 %) oproti odrůdám pro přímý konzum (12,1 %) a negativně tedy

koreluje s obsahem dusíkatých látek. Výsledky těchto vlastností a vzájemné vztahy mezi nimi zjištěné v rámci této práce byly potvrzeny také ve výzkumech jiných autorů. Nejvíce zastoupenými proteiny v PFJ odrůda Adéla a Eurostarch byly patatiny a inhibitory aspartátových proteas. Významný podíl tvořily také necharakterizované proteiny patřící pravděpodobně mezi inhibitory aspartátových nebo serinových proteas.

Obsah polyfenolů byl v průměru významně vyšší u konzumních odrůd (2,46 gTPP/kg sušiny) v porovnání s odrůdami pro zpracování (1,40 gTPP/kg sušiny). Antioxidační aktivity byly potvrzeny zejména v rámci metody využívající zhášení radikálu ABTS, kdy bylo u frakcí „B“ (bazických inhibitorů proteas) dosaženo při koncentraci 60 mg/ml téměř 100 % zhášecí aktivity. Rovněž byla u souboru studovaných odrůd zjištěna pozitivní korelace mezi obsahem polyfenolů a antioxidačními aktivitami.

7.2 Hodnocení chromatografické separace a identifikace proteinů

Pomocí dvoustupňové chromatografické purifikace došlo k předpokládanému rozdělení hlízových proteinů z PFJ do čtyř skupin - frakcí bazických inhibitorů proteas (frakce „B“) společnou skupinu patatinu a kyselých inhibitorů proteas (frakce „C“), kyselých PIs (frakce „D“) a patatinu (frakce „E“). Úspěšnost purifikace byla potvrzena pomocí SDS-PAGE.

Pomocí separace na systému FPLC s využitím monolitických kolon a gradientové eluce došlo k účinné, a v porovnání s klasickými náplňovými gelově permeačními kolonami také rychlejší, separaci PIs. Pomocí analýz MS bylo potvrzeno převažující zastoupení inhibitorů aspartátových proteas, u kolony UNO S6 byla druhá nejvíce abundantní skupina neidentifikovaných proteinů, pravděpodobně inhibitorů proteas, následovalo zastoupení PIs ze skupiny PCPI. Po separaci na koloně UNO Q6 převažovalo opět zastoupení PAPI následované různými PSPI, zejména PI-2. Pomocí kolony CHT5-I, došlo pouze k rozdělení na zachycenou a nezachycenou frakci. Pomocí doplňkové separace na koloně EnRich SEC bylo možné rozdělit zachycenou frakci z kolony CHT5-I do 2-3 frakcí. Pomocí kolon Phenyl FF a Butyl HP využívajících hydrofobní interakce nedošlo k rozdělení žádné ze separovaných frakcí PIs.

7.3 Studium vybraných vlastností bramborových PIs

Antioxidační aktivity byly vyjádřeny schopností frakcí PIs zhaset kyslíkové radikály ABTS a DPPH. Bylo potvrzeno antioxidační působení vůči oběma radikálům, přičemž proti radikálu ABTS bylo potvrzeno významně vyšší antioxidační působení, na rozdíl od radikálu DPPH, které je však z velké části dáno všeobecně vyšší zhasací aktivitou vůči tomuto radikálu. Nejvyšší antioxidační působení bylo prokázáno u frakcí „B“, byla při koncentraci 60 mg/ml potvrzena 96-97 % zhasací aktivita. Frakce AS 12-15, ES 1-3 a EQ 8-9 při koncentraci 60 mg/ml vykazovaly zhasací aktivitu vyšší než 50 %.

Antifungální aktivita byla potvrzena vůči fytopatogenům *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani*. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla prokázána opět u frakce „B“, kdy došlo zejména při koncentraci 60 mg/ml k vytvoření pozorovatelných zón v reakci na inhibici mycelia houby. V menší míře byla prokázána také u frakce AS 12-15 vůči *F. solani* při koncentraci 10 mg/ml. Na základě těchto výsledků lze tedy potvrdit antifungální i antioxidační aktivity bramborových PIs.

Jak bylo zmíněno v úvodu této práce, inhibitory proteas jsou z mnoha důvodů hojně studovanou skupinou proteinů. Do současné doby našly svoje uplatnění v oblasti lékařství (jako součást léčiv proti AIDS) a potravinářství (ve formě bílkovinných izolátů). Na praktické využití v dalších aplikacích, zmíněných napříč touto prací, však (bramborové) inhibitory proteas stále čekají i přes jejich nesporný potenciál. Byly zjištěny vybrané vlastnosti hlízové vody a bramborové mouky zkoumaných odrůd, včetně vzájemných souvislostí mezi těmito vlastnostmi a rozdíly mezi odrůdami. Hlavním cílem této práce bylo však nalézt vhodné způsoby izolace a rozdělení jednotlivých skupin bramborových PIs a zjištění jejich biologických vlastností - antimikrobiálních a antioxidačních aktivit. Na základě výsledků lze potvrdit využitelnost provedených způsobů purifikace a separace bramborových PIs a zároveň prokázat jejich antimikrobiální a antioxidační potenciál.

8. SEZNAM LITERATURY

- Aguilar M. I. (2004): HPLC of peptides and proteins: Methods and protocols. New Jersey: Humana Press Inc., ISBN 1-59259-742-4.
- Åhman I., Melander M. (2003): Potato proteins, and other plant proteins, as potential transgenic resistance factor to pollen beetles in oilseed rape. *Annals of Applied Biology*, 143: 235-260.
- Allen A. K., Bolwell G. P., Brown D. S., Sidebottom C., Slabas A. R. (1996): Potato lectin: A three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline-containing sequences and sequence similarities to wheat-germ agglutinin. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 28: 1285-1291.
- Alting A. C., Pouvreau L. (2011): Potato proteins. In: Phillips G.O. and Williams P. A. (ed.). *Handbook of Food Proteins*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK. pp. 316-334.
- Atasever A., Ozdemir H., Gulcin I., Irfan Kufrevioglu O. (2013): One-step purification of lactoperoxidase from bovine milk by affinity chromatography. *Food Chemistry*, 136: 864-870.
- Baldisserotto A., Marastonia M., Trapellaa C., Gaviolib R., Ferrettic V., Prettoc L., Tomatisa R. (2007): Glutamine vinyl ester proteasome inhibitors selective for trypsin-like (β 2) subunit. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42: 586-592.
- Bárta J., Bártová V. (2007): *Bílkoviny hlíz bramboru (Solanum tuberosum L.)*. Vědecká monografie. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Česká republika, ISBN 978-80-7394-036-2.
- Bárta J., Bártová V., Brabcová A., Diviš J., Horáčková V., Kamenová A., Zdráhal Z. (2015): *Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu Solanum*. 1. vyd. České Budějovice: KURENT, Česká republika, ISBN 978-80-87111-42-0.
- 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, Zemědělská fakulta, ISBN 978-80-7394-405-6
- 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*, 57: 9028-9034.

- 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.
- Bárta J., Čepl J., Diviš J., Hamouz K., Jůzl M., Vacek J. (2008): Brambory. In: Prugar J. (ed.): *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. Praha, Kvasný průmysl, pp. 241-261. ISBN 978-80-86576-28-2
- Baucher M., Pérez-Morga D., El Jaziri M. (2012): Insight to plant annexin function. *Plant Signaling & Behavior* 7: 524–528.
- Bauw G., Nielsen H. V., Emmersen J., Nielsen K. L., Jørgensen M., Welinde K. G. (2006): Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. *The FEBS Journal*, 273: 3569-3584.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 12370-12377.
- Brabcová A. (2015): Charakteristika patatinových proteinů z hlíz vybraných genotypů kulturních a planých druhů brambor. *Disertační práce*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
- Bradshaw J.E., Ramsay G. (2009): Potato origin and production. In: Singh, J., Kaur, L. (eds.): *Advances in Potato Chemistry and Technology*, 2. vyd. Elsevier, Oxford, UK. pp. 1-26, ISBN 978-0-12-8000022-1.
- Brown C. R. (2005): Antioxidants in Potato. *American Journal of Potato Research*, 82: 163-172.
- Chiang W.-D., Huang C.-Y., Paul C.-R., Lee Z.-Y., Lin W.-T. (2016) - Lipolysis stimulating peptides of potato protein hydrolysate effectively suppresses high-fat-diet-induced hepatocyte apoptosis and fibrosis in aging rats. *Food & Nutrition Research*: 60: 31417.
- Čurn V. (1995): Studium uplatnění metod elektroforézy bílkovin ve šlechtění řepky olejné. *Disertační práce*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
- Dalbeya R. E., Wanga P., van Dijk J. M. (2012): Membrane Proteases in the Bacterial Protein Secretion and Quality Control Pathway. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76: 311-330.

- Dale M. F. B., MacKay G. R. (1994): Inheritance of table and processing quality. In Bradshaw J. E., MacKay G. R.: *Potato Genetics*. CAB International, Wallingford. p. 552, ISBN 0 85198 869 5.
- De Clercq E. (2004): Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology*, 30: 115-133.
- Duceppe M. O., Cloutier C., Michaud D. (2012): Wounding, insect chewing and phloem sap feeding differentially alter the leaf proteome of potato, *Solanum tuberosum* L. *Proteome Science*, 73: 1-14.
- Ejima D., Yumioka R., Arakawa T., Tsumoto K. (2005): Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1094: 49-55
- Fägerstam L. G., Lizana J., Axiö-Fredriksson U. B., Wahlström L. (1983): Fast chromatofocusing of human serum proteins with special reference to alpha 1-antitrypsin and Gc-globulin. *Journal of Chromatography*, 266: 523-532.
- Farady C. J., Craik C. S. (2014): Mechanisms Of Macromolecular Protease Inhibitors. *ChemBioChem*, 11: 2341-2346.
- Fischer M., Kuckenbergh M., Kastilan R., Muth J., Gebhardt C. (2015): Novel in vitro inhibitory functions of potato tuber proteinaceous inhibitors. *Molecular Genetics and Genomics*, 290: 387-398.
- Gebhardt C., Fischer M. (2015): Novel uses of potato tuber proteinaceous inhibitor. Německo. Patent EP2918281 A1, 13. 3. 2014.
- Giuseppin M. L. F., van Nieuwenhuijzen N. H., Lambers T. T., Spelbrink R. E. J. (2014): Non-astringent protein products. Nizozemsko. Patent US 8821956 B2, 12. 11. 2010.
- Glaczinski H., Heibges A., Salamini F., Gebhardt C. (2002): Members of the Kunitz-type protease inhibitor gene family of potato inhibit soluble tuber invertase in vitro. *Potato Research*, 45: 163-176.
- González C., Neira J. L., Ventura S., Bronsoms S., Rico M., Avilés F. X. (2003): Structure and dynamics of the potato carboxypeptidase inhibitor by 1H and 15N NMR. *Proteins*, 50: 410-422.
- Gruden K., Strukelj B., Ravnikar M., Poljsak-Prijatelj M., Mavric I., Brzin J., Pungercar J., Kregar I. (1997): Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterisation and immunocytochemical localisation studies. *Plant Molecular Biology*, 317-323.

- Gugała M., Sikorska A., Zarzecka K., Kapela K. (2015): Changes in the Content of Total Nitrogen, Phosphorus and Potassium In Potato Tubers Under the Influence of the use of Herbicides. *Journal of Ecological Engineering*, 16: 82-86.
- Gupta V. K., Sharma S. K. (2006): Plants as natural antioxidants. *Natural Product Radiance*, 5: 326-334.
- Habib, H., Fazili K. M. (2007): Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2: 68-85.
- Hamouz K., Lachman J., Čepl J., Dvořák P., Pivec V., Prášilová M. (2007): Site conditions and genotype influence polyphenol content in potatoes. *Horticultural Science*, 34: 132-137.
- Harris P. W. R., Yang S.-H., Molina A., López G., Middleditch M., Brimble M. A. (2014): Plant Antimicrobial Peptides Snakin-1 and Snakin-2: Plant antimicrobial peptides snakin-1 and snakin-2: chemical synthesis and insights into the disulfide connectivity. *Chemistry*, 20: 5102-5110.
- Hoehenwarter W., Larhlimi A., Hummel J., Egelhofer V., Selbig J., van Dongen J. T., Wienkoop S., Weckwerth W. (2011): MAPA distinguishes genotype-specific variability of highly similar regulatory protein isoforms in potato tuber. *Journal of Proteome Research*, 10: 2979-2991.
- 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.
- Chang J. Y., Canals F., Schindler P., Querol E., Avilés F. X. (1994): The Disulfide Folding Pathway of Potato Carboxypeptidase Inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 22087-22094.
- Churáček J. (1990): *Analytická separace látek*. Praha: Nakladatelství technické literatury, Česká republika, ISBN 80-03-00569-8.
- Ighodaro O. M., Akinloye O. A. (2017): First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine (In Press)*.
- Jin Z., Yang Y. X., Choi J. Y., Shinde P. L., Yoon S. Y., Hahn T. W., Lim H. T., Park Y., Hahm 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*, 86: 1562-1572.

- Kärenlampi S. O., White P. J. (2009): Potato Proteins, Lipids and Minerals. In: Singh, J., Kaur, L. (eds.): *Advances in Potato Chemistry and Technology*, 1. vyd. Elsevier, Oxford, UK. pp. 99-126, ISBN 978-0-12-374349-7
- Kerr C. A., Goodband R. D., Smith J. W., Musser R. E., Bergström J. R., Nessmith W. B., Tokach M. D., Nelssen J. L. (1998): Evaluation of potato proteins on the growth performance of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 76: 3024-3033.
- Kieliszewski M. J., Orlando R. (1997): Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of tomato extensin monomers and potato lectin. *Phytochemistry*, 45: 9-14.
- 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 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*, 14: 4349-4360.
- Kim J. Y., Park, S. C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J. W., Hahm, K. S. and Park Y. (2009): Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 2860-2872.
- 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.
- Koningsveld G. A., Gruppen H., De Jongh H., Wijngaards G., Boekel M. A. J. S., Walstr P., Voragen, A. G. J. (2001): The solubility of potato proteins from industrial potato fruit juice as influenced by pH and various additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 134-142.
- Lachman J., Hamouz K., Čepl J., Pivec V., Šulc M., Dvořák P. (2006): Vliv vybraných faktorů na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu hlíz brambor. *Chemické listy*, 100: 522-527.
- Lachman J., Hamouz K., Dvořák P., Orsák M. (2005): The effect of selected factors on the content of protein and nitrates in potato tubers, *Plant, Soil and Environment*, 51: 431-438.

- Lapointe H. R., Li S., Mortazavi S., Zeng J. (2016): Expression and Purification of a Potato Type II Proteinase Inhibitor in Escherichia coli Strain BL21(DE3). *The Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 2: 34-40.
- Lawrence P. K., Koundal K. R. (2002): Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5: 93-109.
- Lee J.-K., Gopal R., Seo C. H, Cheong H., Park Y. (2012): Isolation and Purification of a Novel Deca-Antifungal Peptide from Potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung) Against *Candida albicans*. *International journal of molecular sciences*, 13: 4021-4032.
- Ledoigt, G., Griffaut, B., Debiton, E., Vian, C., Mustel, A., Evray, G., Maurizis, J.-C. and Madelmont, J.-C. (2006): Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38: 268-271.
- Li Y., Jiang B., Zhang T., Mu W., Liu J. (2008): Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry* 106: 444-450.
- Løkraa S., Strætkvern K. O. (2009): Industrial Proteins from Potato juice. A Review. *Food*, 3: 88-95.
- Løkraa S., Hellan 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*, 41: 1089–1099.
- Lomolino G., Vincenzi S., Gazzola D., Crapisi A., Curioni A. (2015): Foaming properties of potato (*Solanum tuberosum*) proteins: A study by the gas sparging method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 475: 75-83.
- Lorenc F. (2013): Separace vybraných frakcí kyselých proteinů z hlíz brambor (*Solanum tuberosum* L.) pomocí chromatografických technik. Diplomová práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Lorenc F., Bárta J. (2017): Využití monolitických kolon při vysokorychlostní chromatografické separaci bramborových inhibitorů proteas. *Chemické listy* 111: 591-596.
- Lynch B., Simon R. R., van Otterdijk F. M., Emmen H. H., Giuseppin M. L. F., Kemme Kroonsber C. (2012): Subchronic toxicity evaluation of potato protein isolates. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 373-384.
- Macrae A. R., Visicchion J. E., Lanot A. (1998): Application of potato lipid acyl hydrolase for the synthesis of monoacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75: 1489-1494.

- Madadlou A., O'Sullivan S., Sheehan D. (2011): Fast protein liquid chromatography. *Methods in molecular biology*, 681: 439-447.
- 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: 3445-3453.
- Mickel C. E., Standish J. (1947): Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum* (Herbst). *University of Minnesota Agricultural Experiment Station Bulletin*, 178: 1-20.
- Miedema P., van Gelder W. M. J., Post J. (1976): Coagulable protein in potato: screening method and prospects for breeding. *Euphytica*, 25: 663-670
- Mullins E., Milbourne D., Petti C., Doyle-Prestwich B. M., Meade C. (2006): Potato in the age of biotechnology. *Trends in Plant Science*, 11: 254-260.
- 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.
- Park Y., Choi B. H., Kwak J. S., Kang C. W., Lim H. T., Cheong H. S., Hahn K. S. (2005): Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6491-6496.
- Pastuszezwska B., Tuśnio A., Taciak M., Mazurczyk W. (2009): Variability in the composition of potato protein concentrate produced in different starch factories—A preliminary survey. *Animal Feed Science and Technology*, 154: 260-264.
- Patick A. K., Potts K. E. (1998): Protease Inhibitors as Antiviral Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 614-627.
- Peyer C., Boney P., Staudacher E. (2004): Purification and characterization of β -xylosidase from potatoes (*Solanum tuberosum*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1672: 27–35.
- Pokorný J. (2001): Přehled fyziologie člověka I. díl. 3. vyd. Praha: Karolinum, Česká republika, ISBN 8024602288.
- Pots A. M. (1999): Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein. Dissertation. Wageningen: Wageningen University.
- Pots A. M., Gruppen H., Diepenbeek Van R., Lee Van Der J. J., Boekel Van M. A. J. S., Wijngaards G., Voragen A. G. J. (1999): The effect of storage of whole protein of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content, a study using capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 79: 1557-1564.

- Pouvreau L., Gruppen H, Van Koningsveld G. A., Van Den Broek L. A., Voragen A. G (2003): The most abundant protease inhibitor in potato tuber (cv. Elkana) is a serine protease inhibitor from the Kunitz family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5001-5005.
- Pouvreau, L. (2004): Occurrence and physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tuber. Dissertation. Wageningen: Wageningen University.
- Powers J. C., Asgian J. L., Ekici Ö. D., James K. E. (2002): Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. *Chemical Reviews*, 102: 4639-4750.
- Racusen D., Foote M. (1980): A major soluble glycoprotein of potato tubers. *Journal of Food Biochemistry* 4: 43-52.
- Rajendra S. R. C. K., Mason B., Udenigwe C. C. (2016): Peptidomics of Peptic Digest of Selected Potato Tuber Proteins: Post-Translational Modifications and Limited Cleavage Specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 2432-2437.
- Ralla K., Sohling U., Suck K., Kasper C., Ruf F., Scheper T. (2012): Separation of patatins and protease inhibitors from potato fruit juice with clay minerals as cation exchangers. *Journal of Separation Science*, 35: 1596–1602.
- Ramírez-Palomino P., Fernández-Romero J. M., Gómez-Hens A. (2014): Rapid chromatographic determination of caseins in milk with photometric and fluorimetric detection using a hydrophobic monolithic column, *Food Chemistry*: 142: 249-254.
- Rawlings N. D., Barrett A. J., Finn R. (2016): Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 44: D343-D350.
- Refstie S., Tiekstrab H. A. J. (2003): Potato protein concentrate with low content of solanidine glycoalkaloids in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 216: 283-298.
- Rohrer, M., Břusková, H., Hanáček, P., Reinöhl, V. a Procházka, S. (2011): Induction of viral and insects resistance in pea through transgenesis. In: *Mendelnet 2011 - Proceedings of International Ph.D. Students conference*, 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011. pp. 698-705, ISBN 978-80-7375-563-8
- 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*, 34: 303-311.

- Sanchez-Serrano J. J., Keil M., O'Connor A., Schell J., Willmitzer L. (1987): Wound-induced expression of a potato proteinase inhibitor II gene in transgenic tobacco plants. *The EMBO Journal* 6: 303-306.
- Santos A. L. S., Braga-Silva L. A., Silva B. A., Palmeira V. F., Valle R. S. Abi-chacra É. A., Oliveira V. S., Lins R. D., Kneipp L. F., Sodr  C. L. (2013): Aspartic Proteolytic Inhibitors Induce Cellular and Biochemical Alterations in Fungal Cells. In: Chakraborti S., Dhalla N. S. (2013): *Proteases in Health and Disease*. Springer New York. pp. 89-119, ISBN 978-1-4614-9233-7.
- Satheesh L. S., Murugan K. (2011): Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. *Indian Journal of Experimental Biology*, 49: 366-374.
- Shoenbeck 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*, 168: 693-700.
- Schmidt J. M., Greve-Poulsen M., Damgaard H., Sunds A. V., Zdráhal Z., Hammersh j M., Larsen L. B. (2017). A New Two-Step Chromatographic Procedure for Fractionation of Potato Proteins with Potato Fruit Juice and Spray-Dried Protein as Source Materials. *Food and Bioprocess Technology*, 10: 1946–195.
- Sitj -Arnau M., Molina M. A., Blanco-Aparicio C., Ferrer-Soler L., Lorenzo J., Avilés FX., Querol E., de Llorens R. (2005): Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker. *Cancer Letters*, 226: 169-184.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A.K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85.
- Sonnewald U., Studer D., Rocha-Sosa M., Willmitzer L. (1989): Immunocytochemical localization of patatin, the major glycoprotein in potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Planta*, 178: 176-183.
- 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 and Technology*, 237: 149-157.
- Szalonek M., Sierpien B., Rymaszewski W., Gieczewska K., Garstka M., Lichocka M., Sass L., Paul K, Vass I., Vankova R., Dobrev P., Szczesny P., Marczewski W., Krusiewicz K., Strzelczyk-Zyta D., Hennig J., Konopka-Postupolska D. (2015): Potato Annexin STANN1 Promotes Drought Tolerance and Mitigates Light Stress in Transgenic *Solanum tuberosum* L. *Plants*. *PLOS One*, 10(7): e0132683.

- Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horáčková V. (2007): Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy*, 101: 584-591.
- Šafařík I., Horská K., Martínéz L. M., Šafaříková M. (2010): Large scale magnetic separation of *Solanum tuberosum* tuber lectin using magnetic chitosan particles. *Biotechnology Letters*, 22: 941-945.
- Švec, F. (2004): Monolitické stacionární fáze pro HPLC, místo narození: Praha. *Chemické listy*, 98: 232-238.
- Taskila S., Ahokas M., Järvinen J., Toivanen J., Tanskanen J. P. (2017): Concentration and Separation of Active Proteins from Potato Industry Waste Based on Low-Temperature Evaporation and Ethanol Precipitation. *Scientifica (Cairo)*, 2017: 5120947.
- Tonón C., Daleo G., Oliva C. (2001): An acid beta-1,3 glucanase from potato tubers appears to be patatin. *Plant Physiology and Biochemistry*, 93: 849-854.
- Tripathi G. R. , Park J., Park Y., Hwang I., Park Y., Hahm K. S., Cheong H. (2006): Potide-G Derived from Potato (*Solanum tuberosum* L.) Is Active against Potato Virus YO (PVYO) Infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8437-8443.
- Turra D., Lorito M. (2011): Potato type I and II proteinase inhibitors: modulating plant physiology and host resistance. *Current Protein and Peptide Science*, 12: 374-385.
- Ussuf K. K., Laxmi N. H., Mitra R. (2001): Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science*, 80: 847-853.
- Valueva T. A., Revina T. A., Kladnitskaya G. V., Mosolov V. V. (1998): Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora*-infected potato tubers. *FEBS Letters*, 426: 131-134.
- Valueva T. A., Revina T. A., Mosolov V. V., Mentele R. (2000): Primary structure of potato kunitz-type serine proteinase inhibitor. *Biological Chemistry*, 381: 1215-1221.
- Vojta J., Musilová-Svobodová A., Franc M., Coufal P., Bosáková Z. (2014): Příprava a aplikace monolitických kolon jako moderních separačních medií. *Chemické listy*, 108: 127-134.
- Vokál B. et al. (2013): *Brambory*. 1. vyd. Praha: Profi Press, Česká republika, ISBN 978-80-86726-54-0.
- Waglay A., Karboune S. (2009): Potato Proteins: Functional Food Ingredients. In: Singh, J., Kaur, L. (eds.): *Advances in Potato Chemistry and Technology*, 2. vyd. Elsevier, Oxford, UK. pp. 1-26, ISBN 978-0-12-8000022-1.

Waglay A., Karboune S., Alli, I. (2014): Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties. *Food Chemistry*, 142: 373–382.

Waterhouse A. L. (2003): Determination of Total Phenolics. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. University of California, California, USA. I:11:11.1.

Weeda S. M., Kumar G. N. M., Knowles N. R. (2010): Correlative changes in proteases and protease inhibitors during mobilisation of protein from potato (*Solanum tuberosum*) seed tubers. *Functional Plant Biology*, 37: 32-42.

Zwijnenberg H. J., Kemperman A. J. B., Boerrigter M. E., Lotzb M., Dijksterhuisb J. F., Paulsen P. E., Koops G.-H. (2002): Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination* 144: 331-334.

Ostatní zdroje:

situační zprávy Ministerstva zemědělství (brambory - 2016, luskoviny - 2017), dostupné z:

http://eagri.cz/public/web/file/533336/SVZ_Brambory_12_2016.pdf

http://eagri.cz/public/web/file/581866/SVZ_Luskoviny_12_2017.pdf

databáze peptidas/proteas a jejich inhibitorů MEROPS

<https://www.ebi.ac.uk/merops/>

AVEBE - Solanic, Nizozemsko

<http://www.avebe.com/potato-protein/>

GE Healthcare, USA

https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1485499006767/litdoc18106043_20170127073639.pdf

Elementar, Německo

<http://www.elementar.de/en/products/nprotein-analysis/rapid-n-exceed.html>.

Bioriginal, Kanada

https://www.bioriginal.nl/wp-content/uploads/2016/10/SS_Solathin.pdf

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AQ - dílčí frakce inhibitorů proteas získané po separaci na koloně UNO Q6 u odrůdy Adéla

AS - dílčí frakce inhibitorů proteas získané po separaci na koloně UNO S6 u odrůdy Adéla

ABTS test (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*) - metoda testování antioxidačních aktivit založená na potenciálu zkoumaných látek zhaset kationtový radikál ABTS⁺

EAAI (*Essential amino acid index*) - index esenciálních aminokyselin je průměr relativních obsahů esenciálních (případně poloesenciálních) aminokyselin v proteinech ve vztahu k obsahu aminokyselin v proteinech vaječného bílku

FAO (*Food and Agricultural Organisation*) - Organizace pro výživu a zemědělství

MS (*Mass spectrometry*) - hmotnostní spektrometrie je metoda umožňující určení hmotnosti částic, případně chemického složení a struktury analyzované látky; principem je dělení a následné detekce ionizovaných částic podle poměru jejich náboje a hmotnosti

PR proteiny (*Pathogenesis-related proteins*) - proteiny spojené s patogenezí jsou širokou skupinou rostlinných proteinů, které jsou exprimovány při napadení patogenem

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) - elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného je biochemická metoda využívaná pro separaci proteinů; jedná se o denaturační variantu PAGE rozdělující proteiny především podle jejich molekulové hmotnosti

PIs (*Protease inhibitors*) - inhibitory proteas jsou jednou ze dvou majoritních skupin hlízových proteinů, podílí se na obraně rostliny proti negativním biotickým a abiotickým stresovým faktorům a plní také funkci zásobních proteinů

STA (*Solanum tuberosum agglutinin*) - bramborový lektin je jedna ze skupin ostatních hlízových proteinů, STA má schopnost aglutinovat červené krvinky a také schopnost vazby na chitin a poškozovat larvy hmyzu

ČSÚ - Český statistický úřad

PFJ (*Potato fruit juice*) - bramborová hlízová voda je bramborová šťáva zbavená škrobu; ve škrobárenském průmyslu se jedná o vedlejší produkt při výrobě škrobu dále využívaný jako hnojivo nebo pro izolaci hlízových bílkovin

DEAE (*Diethylaminoethyl cellulose*) - pozitivně nabitý měnič iontů využívaný v iontové výměnné chromatografii pro purifikaci proteinů a nukleových kyselin

MEROPS - databáze proteolytických/peptidolytických enzymů a proteinů/peptidů, které je inhibují

EGF (*Epidermal growth factor*) - je protein, který po vazbě na svůj receptor EGFR stimuluje dělení, diferenciaci a přežití buněk

EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) - protein ze skupiny kináz, který je receptorem EGF, ve společném komplexu indukují dělení a diferenciací buněk; porucha signalizace ve spojení se špatnou funkcí EGFR je spojena se vznikem lidských chorob jako například Alzheimerova choroba nebo nádorovým bujením

AVEBE - Nizozemský škrobárenský komplex soustředující se kromě výroby bramborového škrobu také na produkci hlízových proteinů pro krmivářský, ale v současnosti také v rámci dceřiné společnosti Solanic pro potravinářský a kosmetický průmysl

FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) - Vysokorychlostní kapalinová chromatografie je metoda kapalinové chromatografie upravená pro separaci proteinů a jejich směsí; na rozdíl od HPLC využívá nižších tlaků, tím pádem je šetrnější pro separaci biopolymerů

SEC/GPC (*Size exclusion chromatography/Gel permeation chromatography*) - Gelová chromatografie patří mezi metody kolonové chromatografie separující látky podle jejich velikosti; stacionární fáze je nejčastěji tvořena neionizovaným přírodním nebo syntetickým gelem

IEX (*Ion exchange chromatography*) - iontově výměnná chromatografie rozděluje látky podle jejich celkového náboje

TPP (*Total polyphenols*) - celkový obsah polyfenolů

ConA (*Concanavalin A*) - luštěninový lektin využívaný jako součást media při afinitní chromatografii pro purifikaci glykosylovaných makromolekul

BCA (*Bicinchoninic acid*) - Bicinchoninová kyselina je využívána k určení koncentrace proteinů na základě barevné reakce (purpurové zbarvení) způsobené interakcí s peptidovou vazbou a následné měření absorbance ($\lambda = 562 \text{ nm}$) pomocí spektrofotometrie

AC (*Affinity chromatography*) - afinitní chromatografie spočívá v separaci na základě biospecifických interakcí mezi ligandem a separovanou látkou

HIC (*Hydrophobic interaction chromatography*) - chromatografie hydrofobních interakcí odděluje proteiny na základě rozdílů v jejich povrchové hydrofobicitě/hydrofilii k ligandům stacionární fáze

TAA (*Total antioxidant activity*) - parametr kvantifikující kapacitu vzorku biologického materiálu eliminovat kyslíkové radikály

TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) - antioxidační kapacita vzorku ekvivalentní definovanému množství syntetického derivátu Troloxu - ve vodě rozpustnému analogu vitamínu E.

FRAP (*Ferric reducing antioxidant potential*) - metoda spektrofotometrického měření ($\lambda=593$ nm) antioxidační aktivity založená na schopnosti antioxidantů ve vzorku redukce železitých komplexů doprovázející vznik železnatých, modře zbarvených produktů

ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*) - fluorescenční metoda založená na měření eliminace kyslíkových radikálů pomocí antioxidantů ve vzorku

RP-HPLC (*Reverse phase - High performance liquid chromatography*) - varianta HPLC při které má stacionární fáze nepolární charakter a mobilní fáze je polární; jedná se o nejpoužívanější metodu HPLC v praxi

EQ - dílčí frakce inhibitorů proteas získané po separaci na koloně UNO Q6 u odrůdy Eurostarch

ES - dílčí frakce inhibitorů proteas získané po separaci na koloně UNO S6 u odrůdy Eurostarch

10. PŘÍLOHY

Příloha 1: Vybrané parametry hlíz použitých pro přípravu PFJ

Odrůda	Počet hlíz	Čistá hmotnost souboru hlíz [kg]	Průměrná hmotnost jedné hlízy [g]
<i>Adéla</i>	53	7,1	133
<i>Eurostarch</i>	21	6,1	290
<i>Laura</i>	73	7,1	97
<i>Ornella</i>	56	6,8	122
<i>Sibu</i>	21	7,1	338

Příloha 2: Složení pufrů pro dvoustupňovou chromatografickou proteinovou purifikaci aniontovým měničem Iontosorb DEAE

komponenta	DEAE startovací	DEAE eluční	DEAE uchovávací
	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 [ml]	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 NaCl [ml]	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 NaCl + 20% etanol [ml]
1 M Tris-HCl, pH 7.4	25	25	25
5 M NaCl	0	100	0
20% etanol	0	0	200
dH ₂ O	975	875	775
celkem	1000 ml	1000 ml	1000 ml

Příloha 3: Složení pufrů pro dvoustupňovou chromatografickou proteinovou purifikaci pomocí Con A Sepharose 4B

komponenta	Con A startovací	Con A eluční
	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 M NaCl [ml]	25 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 M NaCl + 100 mM α -methyl-D- glukosid
1 M Tris-HCl	25	100
5 M NaCl	100	100
1 M α -methyl-D-glukosid	0	100
dH ₂ O	875	775
celkem	1000 ml	1000 ml

Příloha 4: Složení pufřů využívaných k regeneraci a uchovávání gravitační kolony Con A Sepharose 4B Amersham

komponenta	Regenerační pufr	Regenerační pufr	Uchovávací pufr
	50 mM Na-acetát, pH 4.5 + 0,5 M NaCl + 1 mM MnCl ₂ + 1 mM CaCl ₂ + 1 mM MgCl ₂	50 mM Tris-HCl, pH 8.5 + 0,5 M NaCl + 1 mM MnCl ₂ + 1 mM CaCl ₂ + 1 mM MgCl ₂	100 mM Na-acetát, pH 6.0 + 1 M NaCl + 1 mM Mn Cl ₂ + 1 mM CaCl ₂ + 1 mM MgCl ₂ + 20% etanol
	[ml]	[ml]	[ml]
1 M Na-acetát, pH 6.0	0	0	70
1 M Na-acetát, pH 4.5	35	0	0
1 M Tris-HCl, pH 8.5	0	35	0
5 M NaCl	70	70	140
1 M MnCl ₂	0.7	0.7	0.7
1 M CaCl ₂	0.7	0.7	0.7
1 M MgCl ₂	0.7	0.7	0.7
d H ₂ O	592.9	592.9	487.9
celkem	700 ml	700 ml	700 ml

Příloha 5: Přehled pracovních kroků na gravitační koloně DEAE 52-Cellulose Servacel (100/150 ml)

krok	název	popis	poznámky
1.	II. ekvilibrace kolony a kontrola pH	500/750 ml startovacího pufru- 25 mM Tris-HCl, pH 7.4	<ul style="list-style-type: none"> celý proces probíhá v ledničce při teplotě cca 6°C
2.	nanesení vzorku s upraveným pH	40 ml PFJ s upraveným pH (1M Tris-HCl nebo 1M HCl) se nanese na kolonu pipetou	<ul style="list-style-type: none"> část propadu lze zachytávat do dóz s označením „B“
3.	promývání kolony- vymytí navázaných složek	Minimálně 500/750 ml + 500/ ml startovacího pufru 25 mM Tris-HCl, pH 7.4	<ul style="list-style-type: none"> prvních 2x100 ml se zachytává k frakci „B“
4.	isokratická eluce navázaných složek	Naneseno 50/75 ml elučního pufru, který se nesbírá 2x100 ml elučního pufru (sbíráno) 25 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0,5 M NaCl	<ul style="list-style-type: none"> eluát se zachytává do dóz s označením „C“ pro kontrolu se odeberou vzorky 500 µl na ELFO jedná se o vzorek, který se bude nanášet na kolonu s náplní ConA
5.	regenerace kolony	200-300 ml 2M NaOH	
6.	I. ekvilibrace kolony	1000/1500 ml startovacího pufru 25 mM Tris-HCl, pH 7.4	<ul style="list-style-type: none"> ekvilibrace se provádí tak dlouho, až je pH výtoku pod kolonami opět na hodnotě 7.4

1.-6.

Příloha 6: Přehled pracovních kroků na gravitační koloně Con A Sepharose 4B Amersham (100 ml)

krok	název	popis	poznámky
1.	I. ekvilibrace kolony a kontrola pH	358 ml startovacího pufru 25mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 M NaCl	
2.	II. ekvilibrace kolony a kontrola pH	500 ml startovacího pufru 25mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 M NaCl	
3.	nanesení vzorku s upraveným pH	72 ml vzorku s upraveným pH (1M HCl na pH 7.4) se nanese na kolonu pipetou	<ul style="list-style-type: none"> • při nanesení vzorku zavřít kohout kolony na 10 minut a medium se vzorkem řádně, ale pomalu (!!!) promíchat skleněnou (!!!) tyčinkou • sbírá se do dóz s označením „D“
4.	I. promývání kolony-vymytí nenavázaných složek	143 ml startovacího pufru 25mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 M NaCl	<ul style="list-style-type: none"> • sbírá se do dóz s označením „D“
5.	II. promývání kolony-vymytí nenavázaných složek	358 ml startovacího pufru 25mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 M NaCl	<ul style="list-style-type: none"> • nechá se volně protéct
6.	isokratická eluce navázaných složek	3x143 ml elučního pufru 25 ml 25mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.5 M NaCl	<ul style="list-style-type: none"> • při 1. aplikaci objemu elučního pufru zavřít kohout kolony na 10 minut a medium se vzorkem řádně, ale pomalu (!!!) promíchat skleněnou (!!!) tyčinkou • sbírá se do dóz s označení „E“
7.	regenerace kolony		
7.1	1. regenerace	286 ml bazického pufru 50 mM Tris-HCl, pH 8.5+0.5 M NaCl	<ul style="list-style-type: none"> • promíchat medium
	1. regenerace	286 ml kyselého pufru 50 mM Na-acetát, pH 4.5+0.5 M NaCl	<ul style="list-style-type: none"> • promíchat medium
7.2	2. regenerace	286 ml bazického pufru 50 mM Tris-HCl, pH 8.5+0.5 M NaCl	<ul style="list-style-type: none"> • promíchat medium
	2. regenerace	286 ml kyselého pufru 50 mM Na-acetát, pH 4.5+0.5 M NaCl	<ul style="list-style-type: none"> • promíchat medium
7.3	3. regenerace	286 ml bazického pufru 50 mM Tris-HCl, pH 8.5+0.5 M NaCl	<ul style="list-style-type: none"> • promíchat medium
	3. regenerace	286 ml kyselého pufru 50 mM Na-acetát, pH 4.5+0.5 M NaCl	<ul style="list-style-type: none"> • promíchat medium

Příloha 7: Postup chromatografické separace - odsolení

<i>krok</i>	<i>ml</i>	<i>operace</i>	<i>pumpa: pufr</i>	<i>podíl pufru</i>	<i>objem/průtok</i>
1	0,00	sběr frakcí od 5 ml do 30,2 ml, po 2 ml na 1 frakci			
2	0,00	Isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 5 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
3	5,00	nulování baseliny	QuadTec detektor		
4	5,00	naložení vzorku na kolonu	vzorek		Objem: 5,20 ml
			statická smyčka	Automatický nástřikový ventil	Průtok: 4 ml/min
5	10,20	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 20 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
0	30,20	konec separace			

Příloha 8: Postup chromatografické separace UNO S6

<i>krok</i>	<i>ml</i>	<i>operace</i>	<i>pumpa: pufr</i>	<i>podíl pufru</i>	<i>objem/průtok</i>
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 nástřikový 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			

Příloha 9: Postup chromatografické separace UNO Q6

<i>krok</i>	<i>ml</i>	<i>operace</i>	<i>pumpa: pufr</i>	<i>podíl pufru</i>	<i>objem/průtok</i>
1	0,00	sběr frakcí od 5 ml do 98,5 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			

Příloha 10: Postup chromatografické separace CHT5-I

<i>krok</i>	<i>ml</i>	<i>operace</i>	<i>pumpa: pufr</i>	<i>podíl pufru</i>	<i>objem/průtok</i>
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: 0,40 ml
			statická smyčka	Automatický nástřikový ventil	Průtok: 4 ml/min
5	4,40	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 16 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
6	20,40	lineární gradient	A: startovací	100→50 %	Objem: 8 ml
			B: eluční	0→50 %	Průtok: 4 ml/min
7	28,40	isokratický tok	A: startovací	50 %	Objem: 16 ml
			B: eluční	50 %	Průtok: 4 ml/min
8	44,40	isokratický tok	A: startovací	50→0 %	Objem: 50 ml
			B: eluční	50→100 %	Průtok: 4 ml/min
9	94,40	isokratický tok	A: startovací	0 %	Objem: 25 ml
			B: eluční	100 %	Průtok: 4 ml/min
10	119,40	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 35 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 4 ml/min
	154,40	konec separace			

Příloha 11: Postup chromatografické separace ENrich SEC 650

<i>krok</i>	<i>ml</i>	<i>operace</i>	<i>pumpa: pufr</i>	<i>podíl pufru</i>	<i>objem/průtok</i>
	0,00	frakce nebyly sbírány			
1	0,00	nulování baseliny	QuadTec detektor		
2	0,00	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 1 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 1 ml/min
3	1,00	naložení vzorku na kolonu	vzorek		Objem: 0,20 ml
			statická smyčka	Automatický nástřikový ventil	Průtok: 1 ml/min
4	1,20	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 40 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 1 ml/min
0	41,20	konec separace			

Příloha 12: Postup chromatografické separace na kolonách Butyl HP a Phenyl FF

<i>krok</i>	<i>Ml</i>	<i>operace</i>	<i>pumpa: pufr</i>	<i>podíl pufru</i>	<i>objem/průtok</i>
	0,00	frakce nebyly sbírány			
1	0,00	isokratický tok	A: startovací	100 %	Objem: 10 ml
			B: eluční	0 %	Průtok: 1 ml/min
2	10,00	lineární gradient	A: startovací	100→0 %	Objem: 15 ml
			B: eluční	0→100 %	Průtok: 1 ml/min
3	25.00	isokratický tok	A: startovací	0 %	Objem: 5 ml
			B: eluční	100 %	Průtok: 1 ml/min
0	30.00	konec separace			

Příloha 13: Složení jednotlivých pufřů a komponentů pro barvení, odbarvení a fixaci pro SDS-PAGE elektroforézu

Složení komponentů tvořící gel pro SDS-PAGE elektroforézu

Persíran amonný = 15% roztok, příprava - 0,75 g persíranu amonného + 5 ml H₂O

AC/BIS – Acrylamid (30%), 37,5:1, /AppliChem/

Puřr A: 36,3 g Tris/100 ml, pH= 8,8 - upravit HCl

Puřr B: 6 g Tris/100 ml, pH= 6,8 - upravit HCl

Složení vkládacího puřru (*loading buffer*) pro SDS-PAGE

500 μ l + před použitím přídát 170 μ l BME

Složení vanového puřru pro SDS-PAGE

192 mM glycin + 25 mM Tris + 0,1% SDS

tj. do 1 litru = 144 g glycinu + 30,3 g Tris + 10 g SDS

Složení komponentů pro barvení gelů, odbarvení a fixaci

Barvicí roztok (Coomassie Brilliant Blue)

1g CCB + 500 ml metanolu – rozpustit CCB + 100 ml k. octové + 400 ml H₂O

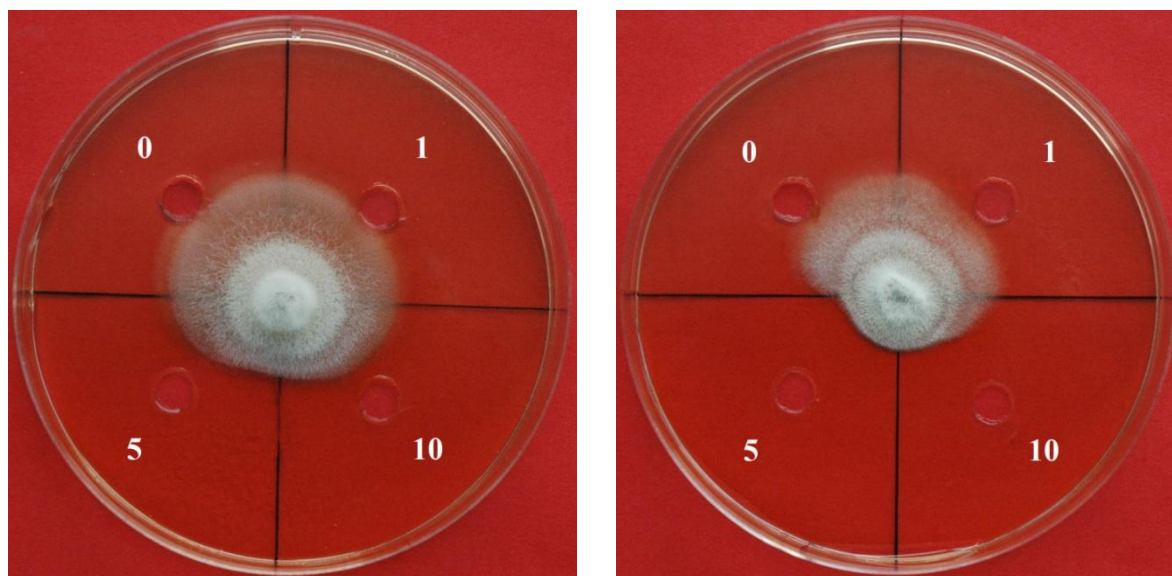
Odbarvovací roztok:

250 ml etanolu + 100 ml k. octové + 650 ml H₂O

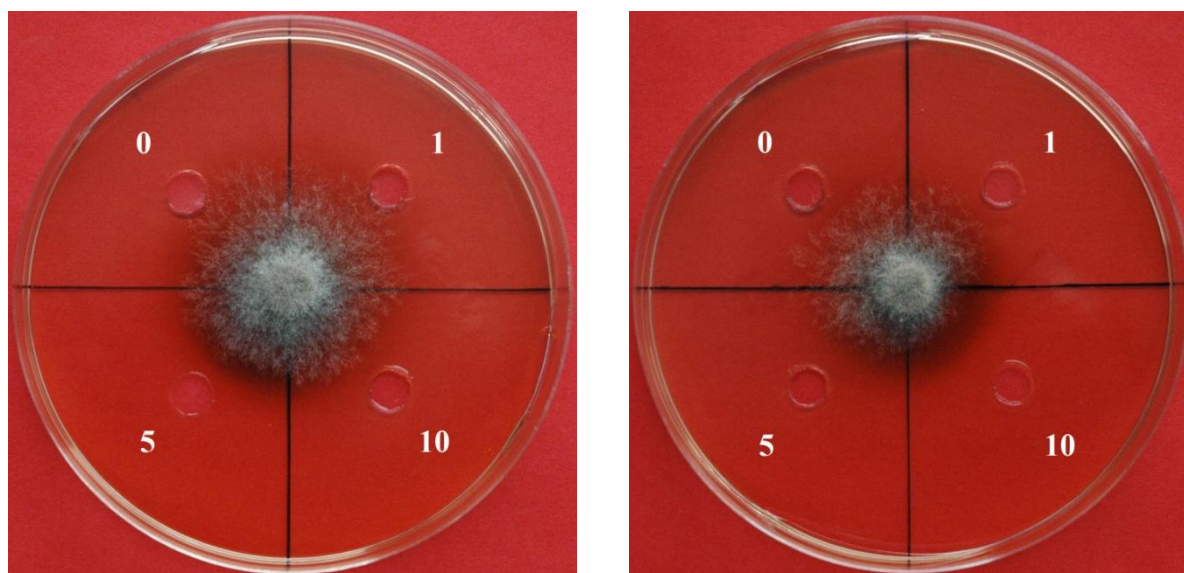
Fixační roztok:

450 ml etanolu + 30 ml glycerolu + 500 ml H₂O

Příloha 14: Ukázka působení bramborových PIs proti růstu fytopatogenních hub *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani*



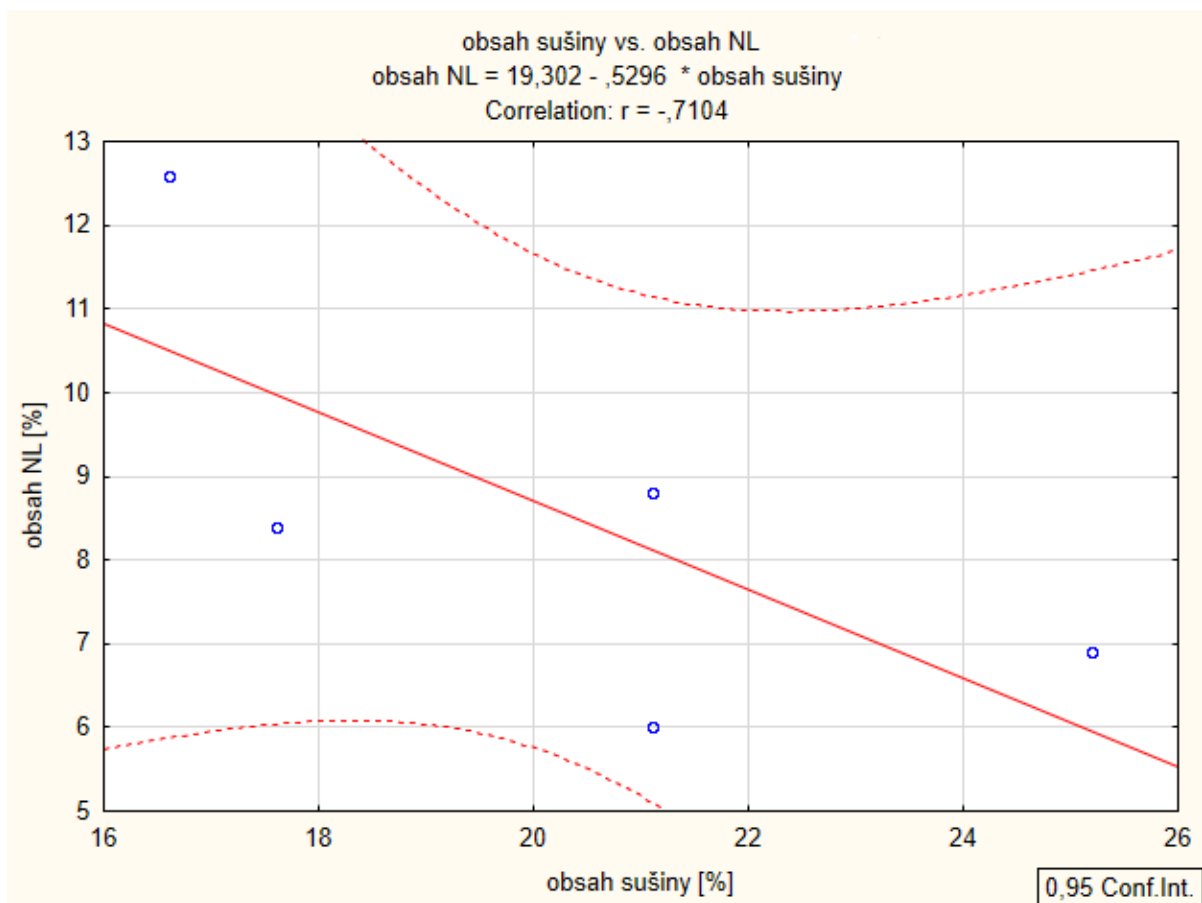
ukázka antifungálního působení proti patogenu *Fusarium solani*: vlevo - frakce Adéla UNO S 11-15, vpravo - Adéla UNO S 21-25



ukázka antifungálního působení proti patogenu *Rhizoctonia solani*: vlevo - frakce Adéla frakce B, vpravo - Adéla UNO S 11-15

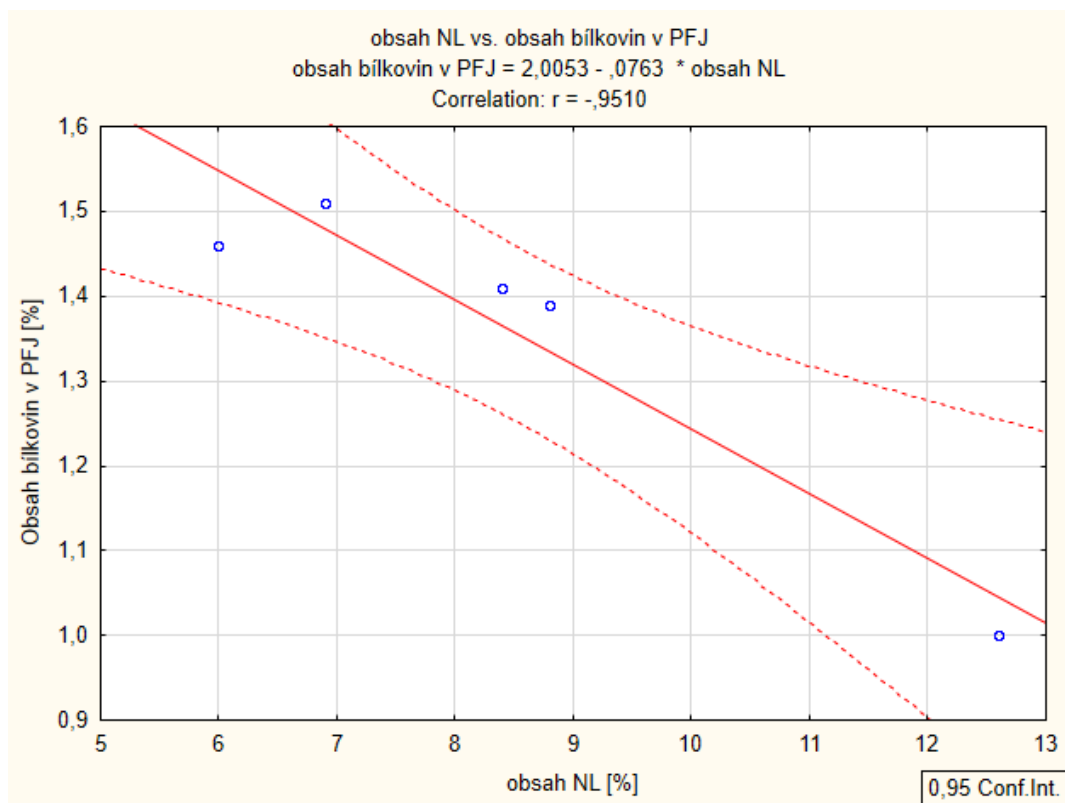
0, 1, 5, 10 - koncentrace proteinového roztoku [mg/ml]

Příloha 15: Grafické znázornění korelace mezi obsahem sušiny a dusíkatých látek



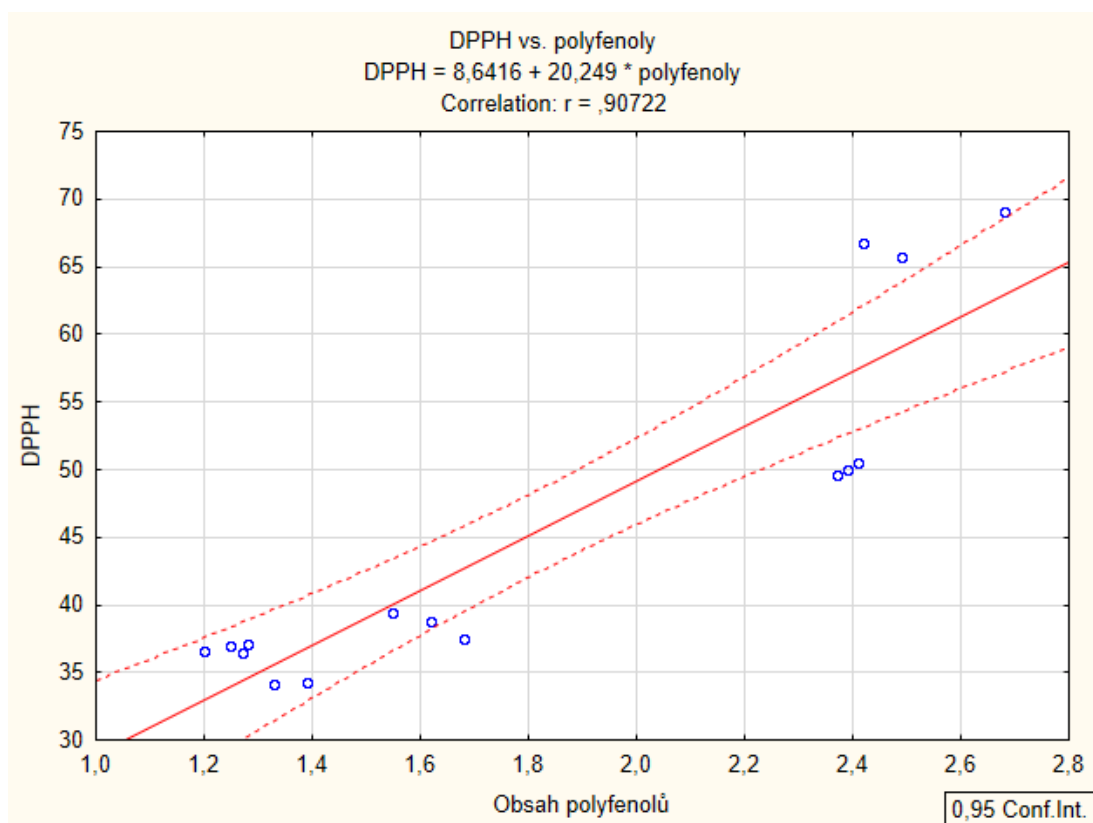
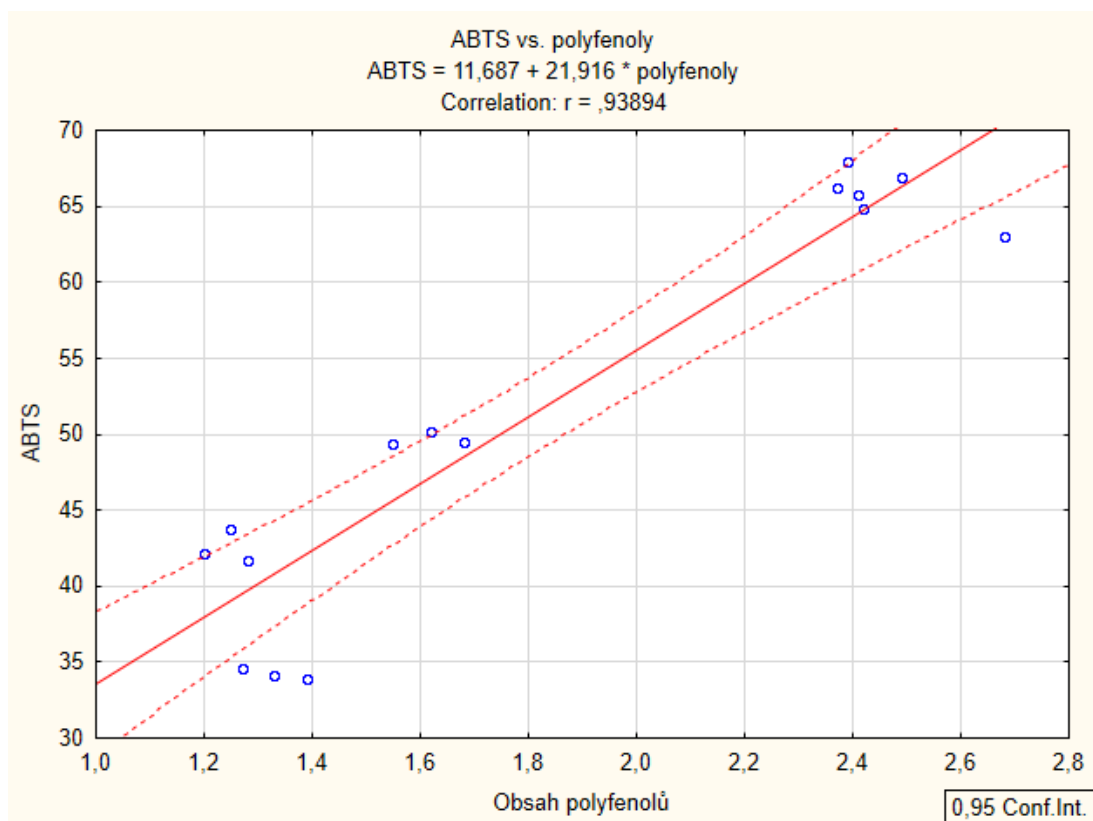
Conf.Int. = konfidenční interval

Příloha 16: Grafické znázornění korelace mezi obsahem dusíkatých látek a obsahem proteinů v PFJ



Conf.Int. = konfidenční interval

Příloha 17: Grafické znázornění lineární regrese závislosti mezi obsahem polyfenolů a antioxidačními aktivitami obsahem proteinů v PFJ



Conf.Int. = konfidenční interval