

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta**

Ing. Veronika Bártová, Ph.D.

**Variabilita obsahových a vybraných funkčních vlastností hlízových bílkovin
brambor v rámci rodu *Solanum***

Habilitační práce

**České Budějovice
2019**

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovat svým kolegům a spoluautorům publikací, bez jejichž spolupráce by řada projektů nebyla realizována. Velké poděkování patří kolegům i studentům, kteří v průběhu posledních deseti let pracovali v laboratoři Chemie proteinů a svým přístupem, pracovitostí, optimismem a novými nápady přispěli k vytvoření příjemného a podnětného pracovního prostředí. Děkuji též grantovým agenturám za finanční podporu jednotlivých projektů a hlavním řešitelům těchto projektů za možnost se na těchto projektech podílet. V neposlední řadě patří obrovské poděkování mé rodině za poskytnutí zázemím, pochopení a velké dávky trpělivost, a to nejen v průběhu realizace této práce. Zvláště pak nejmenším členům rodiny je třeba poděkovat za velkou trpělivost, kterou se mnou mají.

Obsah

1. Dedikace	4
2. Tématické okruhy habilitační práce a související publikační výstupy.....	5
3. Úvod.....	7
4. Literární přehled.....	8
5. Komentář metodického řešení a publikovaných výsledků.....	22
5.1. Popis metodického řešení publikovaných výsledků.....	22
5.2. Komentář publikovaných výsledků k prvnímu okruhu habilitační práce.....	28
5.2.1. Variabilita vybraných biochemických charakteristik hlízových bílkovin v rámci kulturního druhu bramboru <i>Solanum tuberosum</i> L.....	28
5.2.2. Variabilita obsahových, biochemických a nutričních vlastností patatinu vybraných druhů rodu <i>Solanum</i>	31
5.3. Komentář publikovaných výsledků k druhému okruhu habilitační práce....	39
5.3.1. Variabilita zastoupení bílkovin a patatinové frakce v hlízách bramboru produkovaných v konvenčním a ekologickém systému pěstování.....	39
5.3.2. Odrůdová variabilita obsahových charakteristik patatinových bílkovin.....	42
5.3.3. Vliv vybraných pěstitelských faktorů na kumulaci bílkovin a patatinové frakce v hlízách odrůd určených pro zpracování	45
5.4. Komentář publikovaných výsledků k třetímu okruhu habilitační práce.....	48
5.4.1. Izolace hlízových bílkovin a hodnocení biochemických vlastností bílkovinných izolátů.....	50
5.4.2. Antifungální vlastnosti bílkovinných frakcí hlíz bramboru.....	56
6. Závěr.....	63
7. Seznam zkratk.....	66
8. Seznam použité literatury.....	67

1. Dedikace

Publikační výstupy a výsledky prezentované v habilitační práci vznikly za finančního přispění následujících projektů.

NAZV QF4030: „Izolace bílkovin brambor z odpadu při výrobě škrobu a sledování vlivu agroekologických faktorů na jejich kvantitativní a kvalitativní variabilitu“ (2004-2007); hlavní řešitel doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

NAZV 1B44011: „Vývoj a testování systému analytických metod pro praktickou charakterizaci odrůd brambor registrovaných v ČR“ (2004-2008), hlavní řešitel doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

NAZV QI91A069: „Hodnocení potenciálu proteinů planých genotypů brambor pro využití ve šlechtění bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a v biotechnologiích“ (2010-2013), hlavní řešitel doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

NAZV QI101A184: „Technologie pěstování brambor – nové postupy šetrné k životnímu prostředí“ (2010-2014); spoluřešitel za ZF JU doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.

NAZV QJ1610324: „Studium tradičních a nových zemědělských plodin jako zdrojů antioxidantů a dalších zdraví prospěšných látek a jejich využití při výrobě potravin“ (2016-2018); hlavní řešitel Ing. Pavel Smetana, Ph.D.

GAČR 521/03/P036: „Studium vlivu odrůdy na kvalitativní a kvantitativní variabilitu bílkovin patatinového komplexu v hlízách brambor (*Solanum tuberosum* L.)“ (2003-2005), hlavní řešitel doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

GAČR 522/09/1693: „Úloha antimikrobiálních peptidů v ochraně rostlin proti patogenům“ (2009 – 2013); spoluřešitel za ZF JU: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

GAJU 058/2013/Z: „Biologicky aktivní látky v potravinách a zemědělských surovinách“ (2013-2016); hlavní řešitel: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.

GAJU 112/2016/Z: „Významné biologicky a senzoricky aktivní látky v potravinách a zemědělských surovinách“ (2016-2018); hlavní řešitel: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.

MSM 6007665806: „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním (2005 – 2011); hlavní řešitel prof. Ing. Jan Frelich, CSc.

2. Tématické okruhy habilitační práce a související publikační výstupy

Variabilita vybraných biochemických a nutričních charakteristik hlízových bílkovin v rámci kulturního druhu bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a příbuzných druhů rodu *Solanum*

Bártová V., Bárta J., Brabcová A., Zdráhal Z., Horáčková V. (2015): Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species. *Journal of Food Composition and Analysis* 40: 78-85.

Lattová E., Brabcová A., **Bártová V.**, Potěšil D., Bárta J., Zdráhal Z. (2015): N-Glycome profiling of patatins from different potato species of *Solanum* genus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 3243-3250.

Bárta J., **Bártová V.**, Brabcová A., Diviš J., Horáčková V., Kamenová A., Zdráhal Z. (2015): Genotypový potenciál obsahu a kvality bílkovin v hlízách brambor, p. 21-64. In: Bárta J. (ed.): Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*. KURENT České Budějovice.

Bárta J., **Bártová V.**, Zdráhal Z., Šedo O. (2012a): Cultivar variability of patatin biochemical characteristics: table versus processing potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 4369-4378.

Vliv odrůdy a vybraných pěstitelských faktorů na kumulaci bílkovin v hlízách kulturního druhu bramboru *Solanum tuberosum* L.

Bártová V., Diviš J., Bárta J., Brabcová A., Švajnerová M. (2013): Variation of nitrogenous components in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers produced under organic and conventional crop management. *European Journal of Agronomy* 49: 20-31.

Bárta J., Diviš J., Švajner J., **Bártová V.** (2012b): Pěstování brambor pro produkci škrobu a bílkovin. Certifikovaná metodika pro praxi (osvědčení 194-2/KÚ/UKZUZ/2012), ZF JU v Českých Budějovicích, 33 p.

Bártová V., Bárta J., Diviš J., Švajner J., Peterka J. (2009): Crude protein content in tubers of starch processing potato cultivars in dependence on different agro-ecological conditions. *Journal of Central European Agriculture* 10: 57-66.

Bárta J., **Bártová V.** (2008): Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, and its occurrence as genotype effect: processing versus table potatoes. *Czech Journal of Food Sciences* 26: 347-359.

Praktické aspekty variability vybraných obsahových a funkčních vlastností hlízových bílkovin z pohledu jejich izolace a dalšího využití.

Bártová V., Bárta J., Jarošová M. (2019): Antifungal and antimicrobial potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber proteins and peptides and their applications. Submitted to *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Bártová V., Bárta J., Vlačihová A., Šedo O., Zdráhal Z., Konečná H., Stupková A., Švajner J. (2018): Proteomic characterization and antifungal activity of potato tuber proteins isolated from starch production waste under different temperature regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 10551-10560.

Bártová V., Bárta J. (2009): Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol and ferric chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9028-9034.

Bárta J., **Heřmanová V.**, Diviš J. (2008): Effect of low-molecular additives on precipitation of potato fruit juice proteins under different temperature regimes. *Journal of Food Process Engineering* 31: 533-547.

3. Úvod

V sedmdesátých letech minulého století byl vůči škrobárně Avebe Foxhol vytvořen veřejností tlak žádající změnu přístupu v nakládání s vedlejšími odpady, které vznikají při zpracování brambor na škrob. Jednalo se především o nakládání s hlízovou šťávou (PFJ, *potato fruit juice*), která byla bez dalšího využití vypouštěna do pobřežních vod. Vysoká biologická aktivita, která je dána zejména přítomností bílkovinné složky vedla pak k výraznému environmentálnímu zatížení okolí. Izolace bílkovinné složky z PFJ se tak stala nutností, ale zároveň byl tímto vytvořen nový bílkovinný produkt, který si brzy získal své odběratele. Izolací hlízových bílkovin se postupně začaly zabývat i ostatní škrobárny a např. škrobárenský provoz Emsland-Stärke GmbH v Německu již v roce 1979 uvádí produkci 3 tis. t hlízových bílkovin vedle 67 tis. t škrobu. Izolace hlízových bílkovin s sebou přinesla nutnost se touto skupinou látek detailně výzkumně zabývat, neboť znalost jejich biochemických vlastností je klíčová, jak z pohledu nastavení různých forem izolačního procesu, tak i z pohledu úspěšnosti produkovaného koncentrátu v konkurenci s ostatními bílkovinnými produkty na trhu. V rozmezí několika málo let bylo zahájeno několik směrů výzkumu hlízových bílkovin a za posledních přibližně 25 let byl publikován velký objem dat směřující k popisu zastoupení a biochemických vlastností jednotlivých frakcí hlízových bílkovin. Výzkum se zabýval a stále zabývá hodnocením různých možností izolace, a to jak celkových hlízových bílkovin, tak i zájmových bílkovinných frakcí; analýzou vlastností, které jsou cenné z hlediska praktického využití hlízových bílkovin, jakými jsou vlastnosti antioxidační, schopnost tvorby pěn, emulzí a gelů, enzymové a inhibiční aktivity, schopnost omezovat růst patogenních mikroorganismů, či další vlastnosti zajímavé nejen z pohledu potravinářských aplikací, ale také z pohledu využití hlízových bílkovin farmaceutickým a kosmetickým průmyslem, či pro jiné specifické aplikace. Relativně málo dostupné jsou informace týkající se vnitrodruhové i mezidruhové variability obsahu i vlastností hlízových bílkovin, stejně jako informace řešící vliv pěstitelské technologie a agroekologických faktorů na obsah a vlastnosti bílkovin v hlízách bramboru.

Informace prezentované v habilitační práci jsou průřezem výzkumné práce řešitelského kolektivu, který se dlouhodobě na pracovišti ZF JU v Českých Budějovicích zabývá studiem hlízových bílkovin brambor, a to z pohledu jejich ovlivnění pěstitelskými faktory, vlivem odrůdy na jejich biochemické vlastnosti, nebo variability vlastností v rámci kulturních, polokulturních i planých druhů rodu *Solanum*. V neposlední řadě byly také hledány možnosti izolace hlízových bílkovin z PFJ při zachování jejich nativních vlastností a byly definovány vlastnosti vzniklých bílkovinných izolátů.

4. Literární přehled

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) patří z hlediska objemu produkce po kukuřici, rýži a pšenici ke čtvrté nejvýznamnější plodině. Brambory nelze vzhledem k nízkému obsahu bílkovin (3,5 – 9 % v sušině) (Bárta et al., 2012; Bártová et al., 2013; Bártová et al., 2015) řadit mezi bílkovinné plodiny, přesto se vzhledem k jedinečným vlastnostem hlízových bílkovin i tato složka hlíz dostala do popředí zájmu. Osborne & Cambell již v roce 1896 izolovali z hlíz majoritní, globulinovou bílkovinu, kterou označili jako „tuberin“. Až o mnoho let později byl z hlíz bramboru izolován glykoprotein o přibližné hmotnosti 45 kDa, který zaujímal až 20 % celkových bílkovin a byl pojmenován jako „patatin“. Nový název patatin byl odvozen od slova „patata“, tradičního označení brambor jihoamerickými indiány, který byl převzat ze španělského výrazu pro brambory (Shewry, 2003). Patatin je bílkovina všeobecně uznávaná jako hlavní bílkovinná struktura hlíz bramboru, a to vedle skupiny inhibitorů proteas a tzv. ostatních bílkovin. Uvedené dělení vychází z analýz bílkovin s využitím elektroforetických technik, kdy např. při využití SDS-PAGE analýzy je zřetelné rozdělení hlízových bílkovin do třech hlavních skupin s odlišnou molekulovou hmotností – *i*) patatin (39-43 kDa); *ii*) skupina inhibitorů proteas (4-25 kDa) a *iii*) tzv. ostatní bílkoviny s převahou bílkovin s vysokou molekulovou hmotností (Bárta et al., 2012; Pots, 1999; Pouvreau, 2004; Rajapakse et al., 1991).

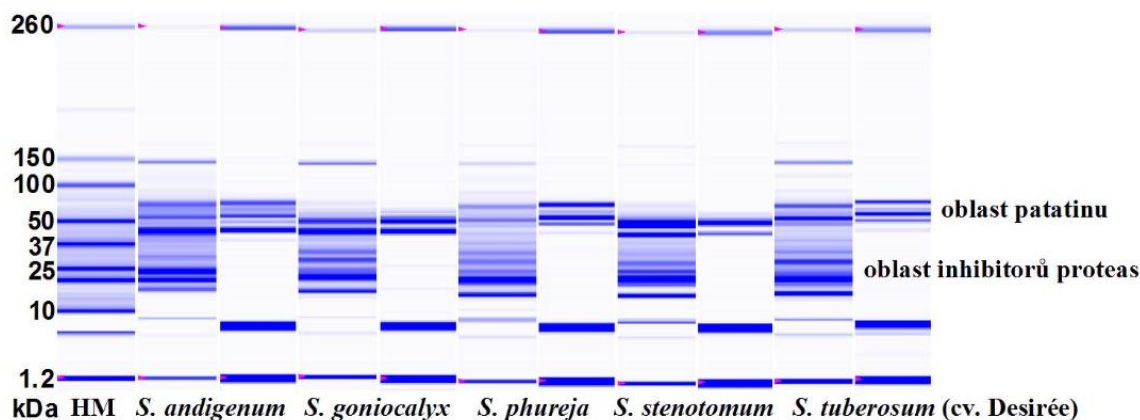
4.1. Patatin

Patatinové bílkoviny představují přibližně 20 % celkových hlízových bílkovin (Pots, 1999), ale byla zjištěna i jeho přítomnost v širším rozpětí, a sice od 1 až po 42 %, v závislosti na genotypu (Bárta & Bártová, 2008; Bárta et al., 2012, Bártová et al., 2015) či pěstitelské technologii produkce hlíz (Bártová et al., 2013). Patatin je charakterizován jako skupina imunologicky identických glykoproteinových isoform (Mignery et al., 1988; Park et al., 1983; Twell & Ooms, 1988) s molekulovou hmotností monomeru v rozsahu 40 - 43 kDa a hodnotou isoelektrického bodu v rozsahu 4,5 - 5,3 (Bárta et al., 2012; Pots, 1999).

Patatin je za běžných okolností u hlízotvorných druhů rodu *Solanum* syntetizován pouze ve vakuolách parenchymu hlíz (transkript multigenové rodiny I), ale může být v nízkých koncentracích detekován i v ostatních částech rostliny (transkript multigenové rodiny II) (Mignery et al., 1988, Stupar et al., 2006). Patatinové bílkoviny jsou pravděpodobně přítomny i u ostatních příbuzných kulturních, polokulturních i primitivních druhů patřících do rodu *Solanum*, jak je patrné z obrázku 1 (Bártová et al., 2015; Lattová et al., 2015; Racusen, 1988; Racusen, 1992; Rajapakse et al., 1991). V rámci druhu *S. tuberosum* i v rámci příbuzných druhů rodu *Solanum* je možné najít významnou variabilitu z hlediska vlastního zastoupení patatinu ve spektru hlízových bílkovin, tak i z pohledu hodnoty isoelektrického bodu, počtu detekovaných isoform, enzymové aktivity a struktury sacharidové části patatinu (Bárta et al., 2015; Bártová et al., 2015; Lattová et al., 2015). Při hodnocení 141 odrůd byly v oblasti patatinu pomocí SDS-PAGE analýzy detekovány 1 – 4 pruhy, reprezentující hmotnostní isoformy, v odlišném postavení a s odlišnou mírou intenzity projevu, což celkově umožnilo vytvoření až 11 kombinačních skupin a v propojení s dalšími znaky byl navržen systém identifikace odrůd s využitím variability spektra patatinu (Bárta et al., 2015; KOB, 2019). Obdobně vysoká variabilita byla zjištěna i na úrovni příbuzných druhů rodu *Solanum*, kdy ve skupině 24 druhů rodu *Solanum* byly nalezeny tři hlavní hmotnostní isoformy o molekulové hmotnosti 40,6 - 41,8 - 42,9 kDa (Bárta et al., 2015), stejně jako u souboru 20 odrůd kulturního druhu *S. tuberosum* (Bárta et al., 2012). Rozdíl mezi jednotlivými úrovněmi byl kolem 1,2 kDa, což přibližně odpovídá hmotnosti sacharidové jednotky patatinu (1169 Da) (Pots, 1999; Lattová et al., 2015).

Bauw et al. (2006) našli v hlízách odrůdy Kuras až 17 různých patatinových forem, obdobě Bárta et al. (2012) na základě 2D PAGE analýzy detekovali 18 - 23 hmotnostních a nábojových forem u hodnoceného souboru 20 odrůd. Uvedená variabilita patatinových bílkovin se přisuzuje odlišnému stupni glykosylace v kombinaci s dílčími záměnami v aminokyselinové sekvenci (Bárta et al., 2012; Pots, 1999). Struktura patatinu čítá 386 aminokyselin s variabilitou u 21 aminokyselin (Stiekema et al., 1988). Ve struktuře patatinu jsou uváděny dvě (Stiekema et al., 1988), tři (Sonnewald et al., 1989) nebo i pět (Welinder, Jørgensen, 2009) glykosylačních míst v závislosti na počtu asparaginů ve správném sekvenčním motivu. Teprve nedávno bylo zjištěno, že i struktura sacharidové jednotky je genotypově specifická (Lattová et al., 2015). Strukturální integrita patatinu je zachována do pH 6 a teploty 28°C (Pots, 1999), k „rozbalování“ molekuly a nevratnému poškození s výsledným vysrážením dochází k rozmezí teplot 55 - 65°C (Bártová et al., 2018; Pots, 1999).

Obrázek 1: Variabilita oblastí patatinu a inhibitorů proteas u pěti druhů rodu *Solanum* detekovaná pomocí čipové elektroforézy



Pozn. pruhy detekované po analýze na čipové elektroforéze jsou označeny příslušným druhem – první pruh je výsledkem analýzy celkových hlízových bílkovin, druhý pruh je výsledkem analýzy izolované frakce patatinových bílkovin.

Vzhledem k vysokému zastoupení patatinu v hlízách je tato bílkovina primárně považována za bílkovinu se zásobní funkcí, ale bylo zjištěno i indukované zvýšení obsahu patatinu v reakci na poranění či patogenezí (Bártová et al., 2012; Sharma et al., 2004; Tonón et al., 2002). K teorii o možné účasti patatinu v obranných reakcích rostliny přispělo i zjištění enzymové aktivity patatinu. Jako první byla u patatinu popsána aktivita nespécifické **lipidacylhydrolasy** (LAH) umožňující hydrolytické štěpení především monoacylglycerolů a fosfolipidů, méně již galaktolipidů a zcela neaktivní je v hydrolyze di- a triacylglycerolů (Bárta et al., 2012; Bártová et al., 2009; Jimenez et al., 2002; Racusen, 1986). V souboru 20 odrůd *S. tuberosum* bylo nalezeno rozpětí LAH aktivity od 0,92 (odrůda Rosara) do 5,46 (odrůda Filea) $\mu\text{mol}/(\text{min mg})$ pro substrát *p*-nitofenylbutyrát (Bárta et al., 2012). Přesný mechanismus působení LAH aktivity vůči patogennímu organismus není znám. Strikland et al. (1995) předpokládají buď přímou inhibici narušením integrity buněčných stěn, či nepřímé působení, kdy vlivem LAH aktivity dochází k uvolnění mastných kyselin, které jsou následně oxidovány lipoxygenasami za vzniku cytotoxických produktů. Podíl lipoxygenas na obranném mechanismu rostliny bramboru byl již prokázán (Perla et al., 2014).

Patatin také vykazuje aktivitu **fosfolipasy A1 a A2** (PLA1 a PLA2), ale vzhledem k mnohonásobně vyšší aktivitě fosfolipasy A2 je patatin prezentován jako enzym s PLA2 aktivitou (Senda et al., 1996). Enzym katalyzuje hydrolýzu esterových vazeb mastných kyselin v pozici *sn*-2 u diacylfosfolipidů. Obdobně jako LAH aktivita i PLA2 aktivita patatinu má vztah k obranné fyziologii rostliny – byla potvrzena účast PLA2 na signální transdukci po kontaktu rostliny s elicitorem stěn hyf patogena *P. infestans* (Senda et al., 1998) a spolu s lipidperoxidasovými enzymy se podílí na produkci rishitinu, významném fytoalexinu brambor (Doke & Nishimura, 1988).

Patatin vykazuje také aktivitu **β -1,2-xylosidasy** (Peyer et al., 2004) a **β -1,3-glukanasy** (Tonón et al., 2001). β -1,3-glukanasová aktivita patatinu má zcela zřejmý vztah k obrannému mechanismu, neboť tyto rostlinné enzymy jsou řazeny k tzv. PR (*pathogenesis related*) bílkovinám se schopností vazby na buněčné stěny hub a jejich následnou degradací (Heřmanová et al., 2006). β -1,3-glukanasové isoformy izolované z odrůdy vykazující resistenci vůči *P. infestans* byly schopné přímé inhibice klíčení zoospór patogena (Tonón et al., 2002). Schopnost inhibice klíčení spór *P. infestans* patatinem resistantní odrůdy bylo potvrzeno i v práci Sharma et al. (2004).

Patatinová frakce hlízových bílkovin je považován za nutričně zlepšující složku, neboť index esenciálních aminokyselin byl stanoven mezi 86 (patatin izolovaný z průmyslové PFJ) až 112,5 (patatin druhu *S. goniocalyx*) % ve vztahu k FAO/WHO bílkovinnému standardu (Bártová et al., 2009; Bártová et al., 2015). Enzymové a strukturní vlastnosti patatinu dávají této bílkovině emulsifikační vlastnosti (Dalahaije et al., 2014; Schmidt et al., 2018); patatin disponuje schopností tvorby stabilních potravinářských pěn (Schmidt et al., 2018) a antioxidačními vlastnostmi (Elahi et al., 2017; Liu et al., 2003). Unikátní je možnost zesílení funkčních vlastností řízenou hydrolýzou patatinu – u patatinových štěpů byla zjištěna schopnost inhibovat angiotensin I konvertující enzym a působit antihypertenzně (Fu et al., 2017), stejně tak byla prokázána i vyšší antioxidační aktivita (nepublikovaná data kolektivu laboratoře „Chemie proeinu“ ZF JU) a předpokládá se i produkce peptidových sekvencí s antimikrobiální aktivitou (Fu et al., 2016).

4.2. Inhibitory proteas hlíz bramboru

Inhibitory proteas inhibují proteolytické enzymy mikroorganismů a hmyzu jako součást obranného mechanismu rostlin (Bártová et al., 2012; Heřmanová et al., 2006), ale zároveň regulují i proteolytické aktivity vlastních proteas a podílejí se tak na řízení fyziologických pochodů rostliny a mobilizaci bílkovin během klíčení hlíz (Weeda et al., 2010).

Inhibitory proteas hlíz bramboru (PPIs, *potato protease inhibitors*) byly vzhledem k svému antinutričnímu působení považovány spíše za problematickou složku hlíz a jejich výzkum byl delší čas opomíjen. Později byly u PPIs popsány funkční vlastnosti, které jim dávají potenciál uplatnění v širokém spektru aplikací. U PPIs byla popsána schopnost inhibice invazivního působení rakovinných buněk (Sever et al., 2002; Sitjà-Arnau et al., 2005); schopnost regulovat obsah cholecystokininu v krevní plazmě a tím regulovat příjem potravy (Ku et al., 2016); schopnost omezit aktivitu trávicích enzymů s možností využití tohoto při léčbě perianální dermatitidy u dětí (Ruseler van Embden, 2004); prokazatelně inhibují růst patogenních mikroorganismů (Jin et al., 2009; Kim et al., 2006; Kim et al., 2013; Ohh et al., 2010) a jsou významnou součástí obranného a regulačního mechanismu rostlin (Bártová et al., 2012; Bártová et al., 2019; Munger et al., 2018). Z hlediska potravinářských aplikací je výhodné, že PPIs jsou rozpustné v širokém spektru hodnot pH (Wagley et al., 2014), některé skupiny

vykazují překvapivou funkční termostabilitu (Bártová et al., 2018) a disponují pěnovými vlastnostmi (Schmidt et al. 2018).

PPIs vykazují ve srovnání s patatinovými bílkovinami vyšší heterogenitu. V práci Pouvreau et al. (2001) byl navržen systém klasifikace PPIs zohledňující strukturní a funkční podobnosti jednotlivých skupin – tzn. molekulová hmotnost, hodnota pI, zastoupení podjednotek, přítomnost disulfidických můstů a inhibiční aktivita vůči hlavním proteasám. Tento klasifikační systém je uveden v tabulce 1 a je dělen na sedm hlavních skupin, které představují zástupce inhibitorů metalloproteas, serinových, cysteinových a aspartátových proteas.

Tabulka 1: Základní vlastnosti inhibitorů proteas hlíz bramboru dle klasifikačního systému (zpracováno dle Pouvreau et al., 2001; převzato z Bártová et al., 2012).

Skupina	Molekulová hmotnost	Izoelektrický bod (pH)	Klasifikace	Inhibované enzymy
Bramborový inhibitor proteas I (PI-1; Potato inhibitor I)	7,7-7,9 kDa pentamer 8 isoformem	5,1-7,8	inhibitor serinových proteas	trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor proteas II (PI-2; Potato inhibitor II)	10,2 kDa dimer 7 isoformem	5,5-6,9	inhibitor serinových proteas	trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor cysteinových proteas (PCPI; Potato Cystein Protease Inhibitor)	20,1-22,8 kDa 6 inhibitorů	5,8-9,0	inhibitor cysteinových proteas	papain trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor aspartátových proteas (PAPI; Potato Aspartyl Protease Inhibitor)	19,9-22,0 kDa 6 inhibitorů	6,2-8,7	inhibitor aspartátových proteas	cathepsin D trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor Kunitzova typu (PKPI; Potato Kunitz Protease Inhibitor)	20,2 kDa 2 inhibitory	8,0-9,0	inhibitor serinových proteas	trypsin chymotrypsin
Ostatní inhibitory serinových proteas (OSPI; Other Serine Protease Inhibitor)	21,0 a 21,8 kDa 2 inhibitory	7,5-8,8	inhibitor serinových proteas	trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor karboxypeptidasy (PCI; Potato Carboxypeptidase Inhibitor)	4,3 kDa	/	inhibitor metalloproteas	karboxypeptidasa A

Převažující složkou PPIs jsou inhibitory serinových proteas zahrnující skupinu bramborového inhibitoru proteas I (PI-I) a bramborového inhibitoru II (PI-II) a inhibitory Kunitzova-typu (PKPI). Zvláště skupina PKPI zřejmě v hlízách brambor patří k nejrozsáhlejší. Na základě imunochemických analýz PKPI bylo zjištěno, že do skupiny inhibitorů proteas Kunitzova typu je možné řadit i bílkoviny z jiných skupin a celkově PKPI představují až 70 % všech přítomných inhibitorů (Pouvreau, 2004). Snaha o klasifikaci této rozsáhlé skupiny PPIs vedla k rozřídění na základě podobnosti sekvence aminokyselin do homogeních skupin A, B, a C (Heibges et al., 2003). Později byla popsána skupina K (izolovaná pouze z odrůdy Kuras) a skupina M (miraculinu podobný inhibitor) (Bauw et al., 2006).

U zástupců skupiny PKPI byla zjištěna výrazná antimikrobiální aktivita, a to i vůči významným patogenům typu *Candida albicans* (bílkovina s označením AFP-J) (Park et al., 2005); *Staphylococcus aureus* či *Listeria monocytogenes* (bílkovina s označením Potide G) (Kim et

al., 2005). Inhibiční aktivita vůči rostlinným i jiným patogenům byla popsána i u dalších zástupců PPIs – např. se jedná o schopnosti bílkovin skupiny PI-I a PI-II inhibovat růst fytopatogenních hub rodu *Fusarium* (Bártová et al., 2018) či inhibici klíčení spór patogena *Phytophthora infestans* inhibitorem serinových proteas s označením PSPI-21 (Revina et al., 2008).

V bílkovinách hlíz zaujímají inhibitory proteas 20 - 50 % (Pouvreau, 2004). Smíšený charakter konstitutivní a indukované exprese této skupiny bílkovin vytváří prostor pro rozsáhlejší variability obsahu i zastoupení jednotlivých skupin PPIs v závislosti na genotypu a pěstitelské technologii produkce hlíz, avšak informací o této problematice je velice málo. Bárta et al. (2015) uvádějí rozsah zastoupení od 46 - 80 % v rámci studovaných genotypů a pěstitelských zásahů. Přímý vliv odrůdy na kumulaci inhibitorů proteas dosáhl až 57 % a odrůda byla hodnocena jako klíčový faktor z pohledu zastoupení inhibitorů proteas v hlízách bramboru. Narasimhamoorthy et al. (2013) studovali vliv termínu sklizně na obsah PI-II. Koncentrace tohoto inhibitoru se postupně zvyšovala a maximálních hodnot (v průměru 2 mg/g sušiny) bylo dosaženo při sklizni v plné zralosti hlíz.

Ve srovnání s patatinem vykazují PPIs výraznější odolnost vůči vyšším teplotám, zvláště pak některé skupiny. Strukturální stabilita skupiny PCPI se uvádí do teploty 60°C; při teplotě nad 70°C dochází k nevratným změnám ve struktuře bílkovin a jejich vysrážení (Pouvreau et al., 2005a). Isoformy PSPI vykazují stabilitu do 55°C; nevratné změny a agregace nastává při zvýšení teploty nad 65°C (Pouvreau et al., 2005b). PI-II vykazují funkční stabilitu do 80°C (Bártová et al., 2018) a zcela výjimečná stabilita, a to až do 90°C, byla zjištěna u PCI (Pouvreau, 2004).

4.3. Izolace hlízových bílkoviny a funkční vlastnosti bílkovinných koncentrátů

Komerční koncentráty hlízových bílkovin se obvykle produkují izolací bílkovin z tzv. hlízové vody (*potato fruit juice*, PFJ), která představuje vedlejší a v podstatě i odpadní produkt zpracování brambor na škrob. V tabulce 2 je uvedeno průměrné složení hlízové vody, které však může v zastoupení obsahových složek kolísat v rámci ročníků, zpracovatelské technologie i období zpracování brambor během kampaně. Tento předpoklad byl potvrzen během kampaně 2006 odběrem vzorků PFJ ve škrobárně LyckebyAmylex a.s. (Bárta et al., 2007) a následně i během kampaně 2017 ve stejném škrobárenském provozu (závěrečná zpráva projektu „Spolupráce na zlepšování využití hlízové šťávy pro výrobu krmiv). Při odběru vzorků v třídních intervalech byl průměrný obsah sušiny v roce 2006 na úrovni 4,9 % a v roce 2017 byla tato hodnota 5,6 %. V roce 2006 zastoupení bílkovin v sušině PFJ kolísalo od 18,2 do 31,7 % s průměrnou hodnotou 22,9 %; v roce 2017 byla stanovena obdobná variabilita s rozsahem od 19,7 do 40,4 % s průměrnou hodnotou obsahu bílkovin v sušině PFJ 28,2 %. PFJ obsahuje především snadno rozpustné bílkoviny – tzn. albuminovou a globulinovou frakci. Bílkoviny patatinového komplexu zaujímaly v obsahu bílkovin PFJ v roce 2006 v průměru 38 %, inhibitory proteas 45 % a ostatní bílkoviny tvořily 16 % přítomných bílkovin (Bárta et al., 2007).

Tabulka 2: Průměrné složení hlízové vody (Koningsveld, 2001; Løkra & Straetkvern, 2009).

Složka	% sušiny
Bílkovina (N x 6,25)	26,8
Peptidy (N x 6,25)	4,4
Aminokyseliny a amidy (N x 5.13)	9,6
Ostatní dusíkaté komponenty	1,8
Cukry	15,8
Lipidy	2,2
Organické kyseliny	13,2
Kyselina chlorogenová	0,4
Kyselina kofeinová	0,1
Draslík	11,2
Fosfor	1,0
Ostatní komponenty	10,1

Zvolený postup izolace bílkovin z PFJ je určující z hlediska objemu izolovaných bílkovin a zachování jejich funkčních vlastností, což výsledně rozhoduje o možnostech využití takového bílkovinného koncentrátu. Zvolíme-li podmínky izolace “šetrnější“ k bílkovinám, pak výtěžnost izolačního postupu je obvykle nižší, ale izolované bílkoviny si z velké části zachovávají své funkční vlastnosti a jsou využitelné např. i v potravinářství, či jiných oborech. Naopak volba intenzivnější formy izolace bílkovin (nejčastěji úprava pH a tepelná koagulace) zaručují vysokou výtěžnost bílkovin s narušenými funkčními vlastnostmi a získané koncentráty bílkovin jsou určeny převážně pro krmivářský průmysl, neboť mají vysokou koncentraci bílkovin se zachovanou nutriční hodnotou, ale eliminovanou aktivitou inhibitorů proteas (Kärenlampi & White, 2009; Løkra & Straetkvern, 2009). Volba metody produkce koncentrátů hlízových bílkovin rozhoduje i o ceně finálního výrobku - např. cena izolátu hlízových bílkovin pro krmivářský průmysl obvykle bývá v rozsahu 0,5 - 1 EUR za kg, zatímco u hlízových bílkovin určených pro potravinářské aplikace se cena pohybuje v rozsahu 7 – 10 EUR za kg (Løkra & Straetkvern, 2009).

V průmyslovém měřítku jsou v podstatě reálné tři základní skupiny metod izolace bílkovin – metody precipitační, membránové a chromatografické (Løkra & Straetkvern, 2009). Převládající metoda izolace bílkovin z PFJ je kombinací isoelektrické a tepelné koagulace (Bárta et al., 2015). Hodnota pH PFJ je snížena na úroveň pH 4,8 - 5,2 s následným zahřátím na vysokou teplotu (např. injekcí páry). Denaturace vede k rychlému vysrážení převážné části bílkovin (výtěžnost obvykle přesahuje 90 %). Výsledkem je produkt denaturovaných bílkovin s minimální mírou rozpustnosti, neaktivní frakcí inhibitorů proteas, vyšším obsahem steroidních glykoalkaloidů (až 1600 mg/kg), který má uplatnění především pro krmné účely (Bártová et al., 2009). Uvedená technologie je v různých modifikacích využívána většinou škrobárenských provozů – vlastní provedení se může lišit teplotou náhřevu, zakoncentrováním PFJ před izolací, použitím tlaku pro zvýšení denaturační účinnosti apod.. Od roku 2017 je technologie izolace bílkovin z hlízové vody pomocí jejich tepelné koagulace využívána i v ČR v rámci škrobárenského provozu Lyckeby Amylex a.s..

Avebe Foxhol prostřednictvím své dceřiné společnosti Solanic izoluje od roku 2007 nativní bílkoviny (izoláty s označením Solanic), které jsou z PFJ získávány adsorpční vícemodální chromatografickou separací. Přesný postup je předmětem patentové ochrany a není znám. Izoláty se liší zastoupením hlavních frakcí a tedy i svými funkčními vlastnostmi – HMW Solanic obsahuje s převahou patatinové bílkoviny; LMW Solanic obsahuje s převahou frakci inhibitorů proteas (Bárta et al., 2015; Guiseppin et al., 2013).

Ostatní uvedené metody jsou uplatňovány spíše v laboratorním měřítku pro účely dalšího výzkumu samozřejmě s potenciálem jejich možného budoucího využití v průmyslové izolaci

hlízových bílkovin. Tabulka 3 prezentuje dosud publikované možnosti izolace hlízových bílkovin včetně shrnutí jejich silných a slabých stránek.

Tabulka 3: Možnosti izolace bílkovin z hlízové vody brambor (zpracováno a doplněno dle Bárta et al., 2015)

Metody izolace hlízových bílkovin	Charakteristika metody	Citace
Metody srážecí (precipitační)		
Tepelná koagulace	+ velká výtěžnost, eliminace aktivity termolabilních inhibitorů proteas, možnost selektivní izolace termostabilních bílkovin - nerozpustnost, ztráta funkčních vlastností	Koningsveld et al., 2001 Kärenlampi & White, 2009 Bártová & Bárta, 2009 Bártová et al., 2018
Změna pH	+ jednoduchá metoda - ztráta funkčních vlastností, nutnost neutralizace	Knorr, 1980 Bárta et al., 2008
Ionty kovů	+ při použití trojmocných kovů vysoká výtěžnost, rozpustnost, zachování funkčních vlastností - obtížnost odstraňování iontů kovů z bílkovinných komplexů	Koningsveld, 2001 Bárta et al., 2008 Bártová & Bárta, 2009 Wagley et al., 2014
Iontová síla (vysolování)	+ vysoká rozpustnost, zachování funkčních vlastností, vysoká výtěžnost - obtížnost odsolení, velká spotřeba soli	Koningsveld, 2001 Wagley et al., 2014
Organická rozpouštědla	+ při srážení za nízkých teplot – vyhovující rozpustnost, zachování funkčních vlastností - riziko denaturace při nedodržení teplotního optima, ekonomická náročnost	Bárta et al., 2008 Koningsveld, 2001
Carboxymethylcelulóza	+ vysoká účinnost, navázání na polysacharid zlepšuje pěnovost - nízké pH reakce poškozuje funkční vlastnosti některých bílkovin, nutný přesný poměr bílkovina/polysacharid	Gonzalez et al., 1991 Vikelouda & Kiosseoglou, 2004
Metody chromatografické		
Kapalinová chromatografie s různou náplní kolon (obvykle iontovýměnná, gelová permeační nebo afinitní chromatografie)	+ zachování funkčních vlastností, selektivní separace frakcí, vysoká účinnost - nákladné, vhodné spíše pro laboratorní aplikace	Bárta et al., 2013 Bártová & Bárta, 2009 Pouvreau, 2004
Adsorbční chromatografie na expandovaném a pohyblivém loži	+ zachování funkčních vlastností, selektivní separace frakcí, vysoká účinnost - provozně náročnější a nákladnější technologie	Andersson et al., 2008 Løkra et al., 2008 Løkra et al., 2009 Straekvern & Schwarz, 2012 Ralla et al., 2012 Zeng et al., 2013 Jin et al., 2018
Metody membránové		
Ultrafiltrace, MWCO 5-150 kDa	+ zachování funkčních vlastností, metoda využitelná i v průmyslovém měřítku - nízká životnost membrán a jejich cena	Zwijnenberg et al., 2002 Debastani et al., 2017
Ostatní metody		
Pěnová separace	+ provozně nenáročná technologie - riziko denaturace bílkovin	Liu et al., 2013

4.4. Funkční vlastnosti hlízových bílkovin a potenciál jejich uplatnění

Funkční vlastnosti izolátů hlízových bílkovin jsou výsledkem zvoleného postupu izolace a zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí, které jsou nositeli zájmových funkčních vlastností.

4.4.1. Nutriční kvalita hlízových bílkovin bramboru

Převažující postup izolace hlízových bílkovin je jejich tepelná koagulace po předchozím snížení hodnoty pH, čímž vzniká koncentrát denaturovaných bílkovin s vysokou koncentrací izolovaných bílkovin (více než 90 %). Patatinové bílkoviny a část inhibitorů proteas, které jsou přítomné v tomto typu bílkovinného koncentrátu, jsou v denaturovaném stavu a ztratily své enzymové či inhibiční aktivity. Koncentrát s velmi nízkou rozpustností bílkovin je lehce béžové barvy s obsahem steroidních alkaloidů až 2000 mg.kg⁻¹ sušiny koncentrátu (Bártová & Bárta, 2009; Løkra & Straetkvern, 2009). Denaturovaný stav bílkovin předurčuje jejich využití v krmivářství, kde se tyto bílkoviny využívají zejména pro výživu mláďat (selat, kuřat), ve výživě prasnic, prasat ve výkrmu a jako tzv. „petfood“ (krmivo pro psy a kočky) (Bárta et al., 2015). U tohoto koncentrátu jsou s ohledem na jeho využití klíčové zejména jeho nutriční parametry a obsah antinutričních látek. Nutriční parametry tepelného koagulátu hlízových bílkovin jsou uvedeny v tabulce 4. Vzorek analyzovaného, tepelně připraveného koncentrátu obsahoval 85 % bílkovin a 1600 mg.kg⁻¹ celkových glykoalkaloidů v sušině koncentrátu. Analyzované koncentráty byly z hlediska nutriční hodnoty srovnatelné a byl potvrzen majoritní podíl patatinu v nutriční hodnotě hlízových bílkovin (Bártová & Bárta, 2009).

Tabulka 4: Analýza aminokyselinového složení PFJ, tepelného koagulátu a dalších izolátů hlízových bílkovin (převzato a upraveno z Bártová & Bárta, 2009).

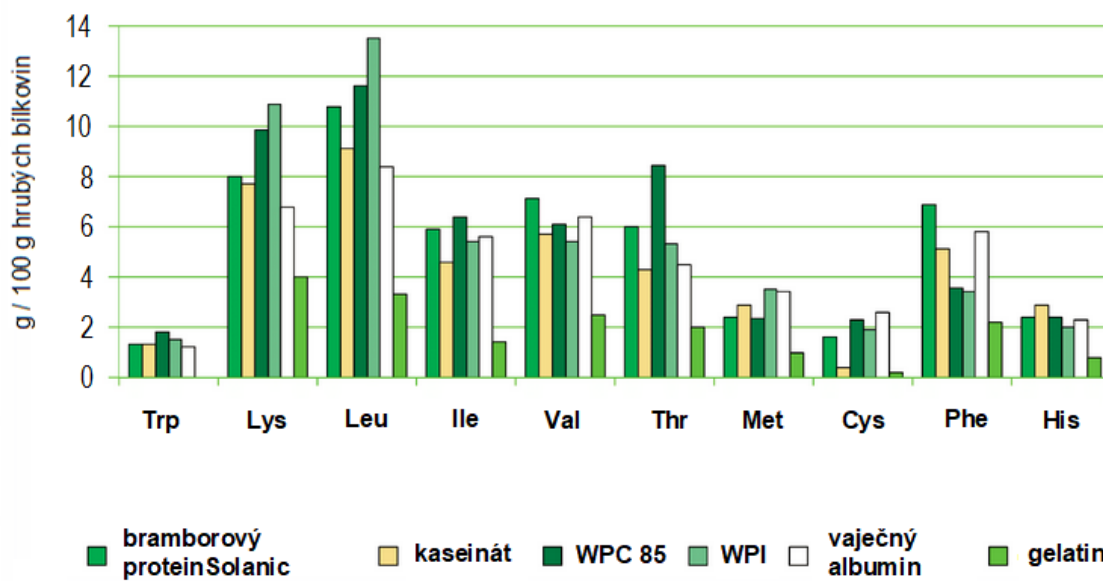
Sledovaný parametr	PFJ	Tepelný koagulát	Etanolový izolát	FeCl ₃ izolát	Patatin
Celkový obsah aminokyselin g/kg sušiny	406,6	837,9	789,1	691,8	564,8
Celkový obsah esenciálních aminokyselin g/kg sušiny	174,0	417,6	487,3	343,6	292,7
Průměrná hodnota aminokyselinového skóre	79,5	93,8	93,9	94,4	111,2
Aminokyselinové skóre limitující aminokyseliny (%)	37,7	45,5	45,9	45,2	34,0
	cystein methionin	cystein methionin	cystein methionin	cystein methionin	cystein methionin
Index esenciálních aminokyselin (%)*	70,6	83,3	81,7	82,7	86,1

* Index esenciálních aminokyselin vztažen k celovaječnému obsahu

Zavedení izolace nativních bílkovin vytvořilo na trhu nový typ produktů, které jsou určené pro přímou lidskou výživu (od roku 2008 v Evropě, od 2009 v USA) (Bárta et al., 2015) nebo jako surovina pro další zpracování v rámci potravinářských aplikací. Často jsou využívány pro specifické aplikace s dovětkem „veganský“, „bez obsahu glutenu“, „bez alergenů“ jako plnohodnotná náhrada živočišných bílkovin. I u těchto produktů je významná jejich nutriční hodnota. Porovnání obsahu esenciálních aminokyselin u nativního koncentrátu hlízových

bílkovin firmy Solanic je znázorněno na obrázku 2. Z uvedených dat vyplývá srovnatelný obsah esenciálních aminokyselin v koncentráte hlízových bílkovin s hodnocenými nejvýznamnějšími představiteli živočišných bílkovin, které jsou běžně používány v potravinářských aplikacích – např. vaječnou bílkovinou, kaseinátem či syrovátkovou bílkovinou (Giuseppin, 2014).

Obrázek 2: Porovnání zastoupení esenciálních aminokyselin bílkovinného izolátu a různých typů bílkovin živočišného původu (Giuseppin, 2014).



Pozn.: WPI: koncentrát syrovátkových bílkovin (*whey protein isolate*); WPC 85: koncentrát bílkovin s 85% obsahem syrovátkových bílkovin

4.4.2. Ostatní funkční vlastnosti hlízových bílkovin bramboru

Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, jednotlivé složky hlízových bílkovin jsou nositeli řady funkčních vlastností. Některé tyto vlastnosti jsou dnes již využívány (zejména v potravinářských aplikacích), jiné byly popsány v rámci výzkumných studií a jejich využití je tedy spíše teoretické s možným budoucím přesahem do praktického využití. Funkční vlastnosti nejvýznamnějších složek bílkovin jsou shrnuty v následující tabulce 5.

Vedle funkčních vlastností hlavních složek (patatinu a inhibitorů proteas), které jsou v tabulce především prezentovány, je nutné zmínit také funkční vlastnosti nativní formy celobílkovinného izolátu. Výsledné funkční vlastnosti jsou dány zastoupením klíčových komponent a mírou poškození jejich nativního stavu v průběhu izolačního procesu. U celobílkovinného izolátu se uvádí především schopnost vazby tuku a vody a lze jej tedy využít např. v masných výrobcích jako náhradu sójové či pšeničné složky (Bárta et al., 2015), případně je možné izolát využít k celkovému nahrazení živočišných bílkovin, či k produkci veganských a vegetariánských variant různých typů potravin. Např. firma Avebe uvedla na trh premix s obsahem hlízových bílkovin a škrobu k výrobě krémového veganského sýra na pizzu plně nahrazující „klasický“ výrobek obsahující živočišné bílkoviny (Avebe, 2019; Bergsma, 2019). V těchto i jiných typech výrobků je ale též využívána pěnová a emulgační aktivita hlízových

bílkovin, jejich nutriční hodnota, rozpustnost a další vlastnosti vytvářející unikátní výsledek. U celkových hlízových izolátů bylo např. i úspěšně využito antimikrobiální aktivity jednotlivých složek a byly použity při výkrmu broilerů (Ohh et al., 2010) a prasat (Jin et al. 2009) k potlačení patogenních bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella gallinarum* a *Escherichia coli*), či k povrchovému ošetření citrusů k potlačení houbových patogenů *Penicillium digitatum* a *Geotrichum candidum* (Rodríguez et al., 2015). Bílkovinné izoláty mají tedy i potenciál být ekvivalentem antibiotických či pesticidních látek (Bártová et al., 2019).

V omezené míře jsou dostupné informace týkající se variability funkčních vlastností v rámci genotypu a působení agroekologických faktorů. Zmapovány jsou agroekologické faktory ovlivňující zastoupení celkových bílkovin a jejich nutriční kvalitu (viz následující kapitola) (Bárta & Bártová, 2007; Bárta et al., 2015; Bártová et al., 2009; Bártová et al., 2013; Bártová et al., 20015; Galdón et al., 2010; Pęksa et al., 2013). Naopak informace o vlivu genotypu, či vnějších podmínek na pěňivé, emulgační, antioxidační či antimikrobiální vlastnosti hlízových bílkovin jsou nedostupné a lze pouze usuzovat z faktorů, které se podílejí na rozmanitosti zastoupení a variabilitě biochemických vlastností jednotlivých bílkovinných frakcí, jež jsou nositeli funkčních vlastností koncentrátů hlízových bílkovin.

Tabulka 5: Funkční vlastnosti hlízových bílkovin a potenciál jejich využití v různých aplikačních oblastech.

Bílkovina a její funkční vlastnosti	Možnosti využití	Citace
<i>Patatinové bílkoviny</i>		
LAH a fosfolipasová aktivita patatinu	syntéza monoacylglycerolů	Macrae et al., 1998 Davis & Macrae, 2001
	emulgační vlastnosti – produkce nebo stabilizace emulzí	Løkra et al, 2008, 2009 Romero et al., 2011
	uvolnění krátkých řetězců mastných kyselin mléčného tuku - zlepšení sensorických vlastností sýrů	Spelbrink et al., 2015
Antioxidační aktivita (patatin a patatinové štěpy)	stabilizace olejů a dalších látek vůči oxidaci	Liu et al., 2003
Pěnové schopnosti	stabilizace potravinářských pěn, nahrazení či omezení kaseinátů, vaječné bílkoviny a dalších bílkovin živočišného původu – produkce veganských a nealergizujících potravin	Bárta et al., 2015 Lomolino et al., 2015 Schmidt et al., 2018
Schopnost tvorby gelů	gely a pěnové gely pro potravinářské užití, produkce bioaktivních, biodegradabilních a požitelných obalů potravin – tzn. obaly nové generace	Creusot et al., 2011
Vazba na třísloviny	náhrada alergizujících bílkovin využívaných k číření (krášlení) vína	Gambutti et al., 2012 Gambute et al., 2016
Produkce peptidových štěpů se schopností inhibovat angiotensin I konvertující enzym a renin	příprava peptidových štěpů pro léčbu hypertenze	Fu et al., 2017
<i>Inhibitory proteas</i>		
Pěnové schopnosti	izolát inhibitorů proteas vykazuje 5-10x vyšší pěnovou aktivitu než patatin – využití obdobné jako u patatinu	Schmidt et al., 2018
Inhibice proteolytických enzymů	kontrola degradace bílkovin – řízený proces fermentace nebo produkce hydrolyzátů	Bárta et al., 2015
	antiobesitologické působení	Ku et al., 2016
Antifungální a antimikrobiální aktivita	široké možnosti využití: konzervace a stabilizace potravin farmaceutický průmysl – doplnění či náhrada antibiotických látek	Bártová et al., 2012 Bártová et al., 2019

4.5. Vliv genotypu a vybraných podmínek produkce hlíz na obsah a funkční vlastnosti hlízových bílkovin

Obsah dusíkatých látek neboli hrubých bílkovin (N x 6,25) je obvykle uváděn přibližně 2 % čerstvé hmoty hlíz, tedy kolem 10 % sušiny (Bárta & Bártová, 2007; Bárta & Bártová, 2008; Bárta et al., 2015; Bártová et al., 2015; Leonel et al., 2017; Pęksa et al., 2013; Pęksa et al., 2018). Podíl bílkovin v obsahu dusíkatých látek kolísá v závislosti na genotypu a podmínkách produkce ve značném rozpětí, a to přibližně od 30 do 70 % (Bártová et al., 2015; Bártová et al., 2012; Pęksa et al., 2018). Nebílkovinné dusíkaté látky jsou členěny na volné aminokyseliny, amidy asparaginu a glutaminu a ostatní dusíkaté látky (Bárta & Bártová, 2007). Patatin v obsahu bílkovin zaujímá v průměru 30 % a inhibitory proteas 60 %, ale obě tyto bílkovinné složky opět s významnou genotypovou variabilitou obsahu i relativní abundance (Bárta & Bártová, 2008; Bárta et al., 2015; Bártová et al., 2013; Bártová et al., 2015).

Potřeba sledovat obsah bílkovin, jejich nutriční hodnotu, případně též zastoupení patatinu a inhibitorů proteas v hlízových bílkovinách má několik důvodů. Bílkoviny brambor i přes jejich nízký obsah v hlízách, jsou vzhledem ke spotřebě brambor významnou složkou ve výživě. Trend nárůstu spotřeby brambor v Asii a Africe, který byl zaznamenán v posledních letech (Zaheer & Akhtar, 2016; Tesfaye, 2016), tento význam ještě umocňuje. Druhým důvodem je izolace bílkovin z PFJ, kdy výtěžnost izolačního postupu je dána nejen vlastním postupem izolace, ale i obsahem bílkovin v hlízách. V ČR neprobíhají šlechtitelské programy mající za cíl zvýšit obsah bílkovin v hlízách ani jedné ze skupiny odrůd a obsah bílkovin není běžně u odrůd brambor hodnocen (Bárta et al., 2015). V zahraničí se šlechtěním odrůd bramboru na zvýšený obsah bílkovin a produkci odrůd určených k souběžné izolaci bílkovin i škrobu zabývá např. šlechtitelská stanice Averis Seed (dceřiná společnost firmy Avebe) (Averis Seed, 2019).

Vedle standardního postupu hledání šlechtitelských zdrojů s vysokým obsahem bílkovin mezi dosavadními odrůdami, případně mezi příbuznými druhy rodu *Solanum*, byla publikována i možnost zvýšení obsahu bílkovin v hlízách bramboru s využitím genetické manipulace – exprese genů *AmA1* (albumin semen amarantu) v transgenních rostlinách bramboru zvýšilo obsah hlízových bílkovin až o 60 % (Chakraborty et al., 2010).

V ČR je z pohledu genotypové variability obsahu hlízových bílkovin dostupná práce Domkářové (2001), ve které byly publikovány výsledky hodnocení obsahu dusíkatých látek na kolekci 1530 odrůd brambor. Odrůdy s vysokým obsahem dusíkatých látek (nad 2,51 %) převažovaly ve skupině odrůd s delší vegetační dobou.

Analýza bílkovin a bílkovinných frakcí na souboru 5 odrůd druhu *S. tuberosum* a 24 příbuzných druhů rodu *Solanum* byla publikována v práci Bárta et al. (2015). Obsah bílkovin v sušině hlíz byl zaznamenán v rozsahu od 3,4 (*S. bulbocastanum*) do 9,2 (*S. sucrense*) %. Vysoký obsah bílkovin (nad 7 % v sušině hlíz) byl zaznamenán u *S. tuberosum* cv. Superior, *S. andigenum*, *S. acaule*, *S. sparsipilum* a *S. sucrense*. Variabilita zastoupení patatinu v obsahu hlízových bílkovin byla v rozsahu od 9 (*S. pinnatisectum*) do 41,4 (*S. verrucosum*) %; zastoupení inhibitorů proteas bylo v rozsahu od 52,1 (*S. incamaoyense*) do 80,8 (*S. berthautii*) %. Zatímco u odrůd kulturního druhu *S. tuberosum* byla zaznamenána vyšší hodnota relativní abundance patatinu v porovnání se skupinou planých druhů, v případě inhibitorů proteas byl trend opačný.

V rámci souboru 40 odrůd (rovnoměrně zastoupeny odrůdy konzumní a odrůdy určené pro zpracování na škrob) byl rozsah obsahu bílkovin od 4,0 (cv. Kuras) do 6,5 (cv. Tomensa) % a zastoupení bílkovin v obsahu dusíkatých látek se pohyboval od 37 do 70 %. Odrůdy určené pro zpracování na škrob měly vyšší průměrné zastoupení bílkovin v obsahu dusíkatých látek (58 %). Patatin tvořil v průměru 26 % hlízových bílkovin u odrůd určených pro zpracování na škrob

a 21,6 % u odrůd určených pro konzum. Nejnižší hodnota byla u odrůdy Bionta (7,2 %), nejvyšší pak u odrůd Tomensa a Vaneda (31,2 %) (Bárta & Bártová, 2008). Podíl odrůdy na variabilitě obsahu bílkovinného dusíku je obvykle uváděn okolo 30 - 40 % (Bárta & Bártová, 2007; Bárta & Bártová, 2008; Bárta et al., 2015; Lachman et al., 2005).

Vedle odrůdy jsou ostatní faktory ovlivňující obsah a složení dusíkatých látek určující převážně ve vzájemných interakcích (Bárta et al., 2015; Lachman et al., 2005). K nejčastěji studovaným faktorům patří N hnojení, vliv stanoviště, ročníku a pěstitelské technologie. Z publikovaných výsledků vyplývá, že rostoucí dávky dusíku zvyšují obsah bílkovinných i nebílkovinných dusíkatých látek, ale obsah nebílkovinných dusíkatých látek roste rychleji a se zvyšující se dávkou dusíku dochází k poklesu zastoupení bílkovin v celkovém obsahu dusíkatých látek. (Bárta a Bártová, 2007; Mitrus et al., 2003). Stejně tak má zvyšující se dávka N hnojení spíše negativní vliv na zastoupení patatinových bílkovin. Ale i v tomto případě se projevuje variabilita odrůd v kumulaci bílkovin – v rámci polního pokusu, který sledoval vliv běžné dávky N hnojení (100 kg N/ha) a výrazně zvýšené dávky N (200 kg N/ha) byl negativní vliv na zastoupení bílkovin v obsahu dusíkatých látek u výrazně zvýšené dávky N zaznamenán u všech odrůd s výjimkou odrůdy Tomensa, u které vyšší dávka N hnojení naopak zvyšovala zastoupení bílkovin v obsahu dusíkatých látek (Bárta et al., 2015).

Zvýšená dostupnost fosforu v půdě zvyšuje zastoupení škrobu, ale snižuje zastoupení bílkovin, avšak i tento vztah je modifikován odrůdou – v práci Leonel et al. (2017) vztah platil pro všechny odrůdy s výjimkou odrůdy Agata.

Hlízy produkované na stanovišti s nižší nadmořskou výškou obvykle kumulují vyšší obsah bílkovin (Lachman et al., 2005), ale z pohledu výnosu škrobu a bílkovin poskytují lepší podmínky stanoviště s vyšší nadmořskou výškou. Vyšší úhrn srážek na stanovišti negativně ovlivňuje obsah škrobu, ale z pohledu obsahu a výnosu bílkovin byl zjištěn pozitivní vztah (Bárta et al., 2015). Diskutovanou otázkou je též vliv technologie produkce hlíz. Lachman et al. (2005) a Maggio et al. (2008) uvádějí vyšší obsah bílkovin u hlíz produkovaných ekologickým systémem. Naopak data publikované v práci Bártová et al. (2013) uvádějí mírně nižší obsah bílkovin i zastoupení patatinu v hlízách pocházejících z ekologického systému pěstování, ale v porovnání s konvenčním způsobem nebyly zjištěné hodnoty statisticky průkazné. Snižené zastoupení dusíkatých látek v hlízách ekologické produkce je prezentováno také v práci Hajšlová et al. (2005).

4.5.1. Nutriční hodnota hlízových bílkovin z pohledu odrůdy a pěstitelské technologie

Z hlediska nutriční hodnoty jsou hlízové bílkoviny na základě jejich indexu esenciálních aminokyselin (EAAI) řazeny k nejkvalitnějším rostlinným bílkovinám. Bramborová bílkovina je cenná zejména vysokým obsahem lysinu, který je limitující ve většině obilných bílkovin. Jako limitující jsou pro hlízové bílkoviny uváděny sirté aminokyseliny (Bártová & Bárta, 2009; Bártová et al., 2015; Eppendorfer & Eggum, 1994) valin, isoleucin (Mitrus et al., 2003) a leucine (Eppendorfer & Eggum, 1994; Mitrus et al., 2003; Pęksa et al., 2018). Naopak Galdón et al. (2010) na základě analýzy 10 odrůd uvádí velmi vysoké chemické skóre (nad 230 %) pro aromatické aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin) a pro aminokyselinu treonin. Zároveň uvádí vysoké chemické skóre pro větvené aminokyseliny isoleucin, leucin a valin. Sirté aminokyseliny byly limitující pro všechny analyzované odrůdy s výjimkou odrůdy Boralla, u které byla naopak limitující aminokyselinou lysin.

Pravděpodobným nositelem nutriční hodnoty hlízových bílkovin je patatinová složka s detekovanou hodnotou EAAI až 93 % (patatin izolovaný z průmyslové PFJ) (Bártová a Bárta,

2009). Lze tedy odvodit, že faktory ovlivňující zastoupení patatinové frakce jsou určující i pro nutriční hodnotu hlízových bílkovin jako celku. Jak bylo již v předchozích částech uvedeno, hodnoty zastoupení patatinové frakce jsou dány především genotypem a pravděpodobně i z tohoto důvodu jsou literární údaje nutriční kvality hlíz bramboru uváděny s rozsáhlou variabilitou. Literárně udávaná hodnota chemického skóre esenciálních aminokyselin přítomných v hlízách bramboru je uváděna v rámci hodnocených odrůd v širokém rozpětí od 26 až po 129 % vztaženo k FAO/WHO standardu (Galdón et al., 2010; Mitrus et al., 2003; Pęksa et al., 2013; Pęksa et al., 2018). Aminokyselinové skóre izolovaného patatinu bylo publikováno v rozsahu od 93 (*S. phureja*) do 112,5 % (*S. goniocalyx*) a u všech izolátů patatinu byl limitující obsah cysteinu a methioninu (Bártová et al., 2015), bohužel jiné informace týkající se genotypové variability nutriční hodnoty purifikovaného patatinu nebyly publikovány.

Kromě odrůdy je nutriční kvalita hlízových bílkovin modifikována i dalšími agroekologickými faktory. Rostoucí dávka aplikovaného dusíku má za následek pokles nutriční kvality hlízových bílkovin, neboť dochází k nárůstu balastních, neesenciálních aminokyselin (především asparagové a glutamové kyselina a jejich amidů) v neprospěch zastoupení esenciálních aminokyselin (Eppendorfer & Eggum, 1994; Mitrus et al., 2003). Navýšení obsahu asparagové a glutamové kyseliny bylo pozorováno i při nedostatečné zásobě sirných iontů v půdě – schopnost konverze takto „předzásobených“ dusíkatých látek v esenciální aminokyseliny byl disharmonií ve výživě omezen, což se projevilo výrazným poklesem již tak limitujících aminokyselin (cystein, methionin, lysin, leucin) (Eppendorfer & Eggum, 1994).

5. Komentář metodického řešení a publikovaných výsledků

Habilitační práce je rozdělena do třech tématických okruhů ve snaze charakterizovat:

1) Variabilitu vybraných biochemických a nutričních charakteristik hlízových bílkovin v rámci kulturního druhu bramboru *Solanum tuberosum* L. a příbuzných druhů rodu *Solanum*.

Bártová V., Bárta J., Brabcová A., Zdráhal Z., Horáčková V. (2015): Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species. *Journal of Food Composition and Analysis* 40: 78-85.

Lattová E., Brabcová A., **Bártová V.**, Potěšil D., Bárta J., Zdráhal Z. (2015): N-Glycome profiling of patatins from different potato species of *Solanum* genus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 3243-3250.

Bárta J., **Bártová V.**, Brabcová A., Diviš J., Horáčková V., Kamenová A., Zdráhal Z. (2015): Genotypový potenciál obsahu a kvality bílkovin v hlízách brambor, p. 21-64. In: Bárta J. (ed.): Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*. KURENT České Budějovice.

Bárta J., **Bártová V.**, Zdráhal Z., Šedo O. (2012a): Cultivar variability of patatin biochemical characteristics: table versus processing potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 4369-4378.

2) Vliv pěstitelských faktorů na kumulaci bílkovin a patatinové frakce v hlízách kulturního druhu bramboru *Solanum tuberosum* L..

Bártová V., Diviš J., Bárta J., Brabcová A., Švajnerová M. (2013): Variation of nitrogenous components in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers produced under organic and conventional crop management. *The European Journal of Agronomy* 49: 20-31.

Bárta J., Diviš J., Švajner J., **Bártová V.** (2012c): Pěstování brambor pro produkci škrobu a bílkovin. Certifikovaná metodika pro praxi (osvědčení 194-2/KÚ/UKZUZ/2012), ZF JU v Českých Budějovicích, 33 p.

Bártová V., Bárta J., Diviš J., Švajner J., Peterka J. (2009): Crude protein content in tubers of starch processing potato cultivars in dependence on different agro-ecological conditions. *Journal of Central European Agriculture* 10: 57-66.

Bárta J., **Bártová V.** (2008): Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, and its occurrence as genotype effect: processing versus table potatoes. *Czech Journal of Food Sciences* 26: 347-359.

3) Praktické aspekty variability vybraných obsahových a funkčních vlastností hlízových bílkovin z pohledu jejich izolace a dalšího využití.

Bártová V., Bárta J., Jarošová M. (2019): Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications: A mini-review. Under review in *Applied Microbiology and Biotechnology*

Bártová V., Bárta J., Vlačihová A., Šedo O., Zdráhal Z., Konečná H., Stupková A., Švajner J. (2018): Proteomic characterization and antifungal activity of potato tuber proteins isolated from starch production waste under different temperatures regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 10551-10560.

Bártová V., Bárta J. (2009): Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol and ferric chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (19): 9028-9034.

Bárta J., **Heřmanová V.**, Diviš J. (2008): Effect of low-molecular additives on precipitation of potato fruit juice proteins under different temperature regimes. *Journal of Food Process Engineering* 31(4): 533-547.

Metodická, výsledková i komentující část zjednodušeně shrnují hlavní metodické postupy a výsledky dosažené v rámci deseti let řešení problematiky dotýkající se obsahových a funkčních charakteristik hlízových bílkovin a jejich individuálních frakcí. Popis uvedených metod i prezentace výsledků vycházejí z publikací, které v rámci řešení uvedené problematiky byly již zveřejněny a jsou vždy uvedeny na začátku příslušné kapitoly. Detailnější informace týkající se metodiky získání rostlinného materiálu, analýz, získaných výsledků i jejich diskuze, je možné nalézt v souvisejících publikacích, které jsou v plném znění součástí příloh habilitační práce.

5.1. Popis metodického řešení publikovaných výsledků

Uvedené popisy metod jsou stručným shrnutím postupu získání rostlinného materiálu a analýz, které byly realizovány v rámci jednotlivých publikačních výsledků. Detailní postupy pak lze nalézt v souvisejících publikačních výstupech – Bárta & Bártová (2008); Bárta et al. (2008, 2012a, 2012b, 2012c, 2015); Bártová & Bárta (2009); Bártová et al. (2009, 2013, 2015, 2018, 2019) a Látová et al. (2015).

5.1.1. Produkce hlíz pro hodnocení odrůdové variability obsahových charakteristik a variability biochemických vlastností patatinu

V rámci řešené problematiky byl založen maloparcelkový pokus na stanovišti České Budějovice v letech 2003-2005 (výstup Bárta & Bártová, 2008; Bárta et al., 2012a). Pokus zahrnoval odrůdy konzumních odrůd (Adéla, **Adora**, **Agria**, **Bionta**, Bolesta, Cicero, Cinja, Colette, Dali, **Filea**, **Impala**, **Karin**, **Laura**, Ditta, **Marabel**, Milva, Rosara, **Rosella**, Santé, **Symfonia**) a odrůdy určené pro zpracování na škrob (**Asterix**, Delikat, **Fresco**, Innovator, **Javor**, Krumlov, **Kuras**, **Merkur**, Morene, **Ornella**, Pacov, Producent, Saturna, **Sibu**, Tábor, Tegal, **Tomensa**, **Vaneda**, Vladan, **Westamyl**). Tučně vyznačené odrůdy (20 odrůd) byly

použity pro izolaci patatinových bílkovin a stanovení variability jejich biochemických vlastností (výstup Bárta et al., 2012a). Podmínky produkce pro všechny odrůdy byly shodné: podzimní hnojení chlěvským hnojem ($35 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$); před výsadbou aplikace $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$, $35 \text{ kg P}\cdot\text{ha}^{-1}$ a $60 \text{ kg K}\cdot\text{ha}^{-1}$; spon $30 \times 75 \text{ cm}$, velikost parcely $6,75 \text{ m}^2$; tři opakování; mechanická kultivace porostů; chemická ochrana vůči plísni bramboru a mandelince bramborové dle aktuální potřeby; sklizeň ruční. Obsahové charakteristiky dusíkatých látek byly analyzovány na úrovni sušiny získaných hlíz (Bárta & Bártová, 2008).

5.1.2. Produkce hlíz pro hodnocení druhové variability obsahových charakteristik bílkovin a variability biochemických vlastností patatinu v rámci rodu *Solanum*

Hodnoceny byly tři skupiny genotypů rodu *Solanum*: i) kontrolní skupina pěti odrůd druhu *S. tuberosum*, ii) druhy pěstitelsky využívané v zemi původu (polokulturní druhy), iii) genotypy planých druhů (výstup Bárta et al., 2015). Hlízový materiál určený k analýzám byl produkován ve skleníkových podmínkách na pracovišti VÚB Havlíčkův Brod. V případě potřeby většího množství hlíz (analýza obsahu aminokyselin) byl hlízový materiál namnožen ve skleníkových podmínkách na ZF JU v Č. Budějovicích (výstup Bártová et al., 2015).

Listy genotypových položek byly použity ke stanovení či ověření ploidity pomocí průtokové cytometrie (stanoveno ve spolupráci s Botanickým ústavem AV ČR, Průhonice) (výstup Bárta et al., 2015).

Genotypy rodu *Solanum* byly analyzovány na úrovni sušiny hlíz (kvantifikace dusíkatých látek a bílkovin) a část hlízového materiálu byla odšťavena a hlízová šťáva použita k izolaci patatinu pro jeho další charakterizaci (výstup Bárta et al., 2015; Lattová et al., 2015).

5.1.3. Produkce hlíz pro hodnocení vlivu pěstitelských podmínek a odlišné dávky N hnojení na obsah bílkovin v hlízách bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

V rámci řešené problematiky byl založen maloparcelkový pokus na třech stanovištích s odlišnými agroekologickými podmínkami – České Budějovice (380 m n. m.), Volyně (460 m n. m.) a Lukavec (620 m n. m.). V polním pokusu bylo zahrnuto sedm odrůd určených pro výrobu škrobu (Rebel, Westamyl, Ornella, Amylon, Kuras, Sibü), probíhal v ročnících 2004 – 2007 a byl testován vliv výrazně odlišné dávky N hnojení (100 a $200 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) na obsah škrobu a bílkovin v hlízách, výnos škrobu a bílkovin z plochy a relativní abundanci patatinu. Podmínky produkce pro všechny odrůdy byly shodné: podzimní hnojení chlěvským hnojem ($40 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$); před výsadbou aplikace 100 nebo $200 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$, $35 \text{ kg P}\cdot\text{ha}^{-1}$ a $60 \text{ kg K}\cdot\text{ha}^{-1}$; spon $30 \times 75 \text{ cm}$, velikost parcely $6,75 \text{ m}^2$, tři opakování. Chemická ochrana vůči plísni bramboru a mandelince bramborové byla dle aktuální potřeby; sklizeň ruční (výstup Bárta et al., 2012c; Bártová et al., 2009)

5.1.4. Produkce hlíz pro hodnocení vlivu konvenční a organické technologie produkce hlíz na variabilitu obsahu bílkovin a patatinu v hlízách bramboru (*Solanum tuberosum* L.)

Maloparcelkový polní pokus byl založen v letech 2006 – 2008 na stanovištích Volyně (460 m n. m.) a Lukavec (610 m n. m.). Na obou stanovištích byl pokus veden v konvenčním i ekologickém režimu. V pokusu byly zahrnuty konzumní odrůdy s různou délkou vegetační doby (Bionta, Karin, Marabel, Rosara, Satina). Podmínky produkce hlíz: podzimní hnojení chlévským hnojem (40 t.ha⁻¹) shodně pro konvenční i ekologickou produkci hlíz; konvenční produkce - před výsadbou aplikace 100 kg N.ha⁻¹, 35 kg P.ha⁻¹ a 60 kg K.ha⁻¹; u obou systémů produkce spon 30 x 75 cm, velikost parcely 6,75 m², tři opakování. Chemická ochrana vůči plísni bramboru a mandelince bramborové byla dle aktuální potřeby prováděna v konvenční technologii; sklizeň ruční (výstup Bártová et al., 2013).

5.1.5. Analýza sušiny hlíz

Obsah sušiny byl stanoven gravimetricky, mrazovým vysušením (-50°C, 0,520mBar, 72 h) hlízového materiálu do konstantní sušiny.

Obsah škrobu byl stanoven na základě určení měrné hmotnosti na speciální váze dle patentu Hošpes-Pecoldova.

Obsah dusíkatých látek byl v sušině hlíz stanoven přepočtem detekovaného obsahu dusíku (N x 6,25). Obsah dusíku byl stanoven na elementárním analyzátoru s využitím Dumasovy metody.

Obsah bílkovin byl stanoven spektrofotometricky prostřednictvím BCA metody po extrakci sušiny (0,0625M Tris-HCl, pH 6,8 + 2% SDS) dle metodiky Bárta et al. (2008).

Odhad relativní abundance patatinu (oblast 39 - 43 kDa) či inhibitorů proteas (oblast 8 - 31 kDa) v sušině byl stanoven buď obrazovou analýzou (software Bio 1D++) gelů získaných elektroforézou analýzou extrahovaných vzorků v systému SDS-PAGE (výstup Bárta & Bártová, 2008; Bártová & Bárta, 2009) nebo pomocí čipové elektroforézy Experion po předchozí denaturační extrakci vzorku (výstup Bárta et al., 2012a; Bárta et al., 2015; Bártová et al., 2013; Bártová et al., 2015). Obsah patatinu a inhibitorů proteas v sušině byl vypočten ze zjištěných hodnot relativní abundance patatinu a obsahu bílkovin.

Obsah steroidních glykoalkaloidů byl v sušině hlíz či bílkovinných izolátů stanoven metodou HPLC-MS/MS (výstup Bártová et al., 2013; Bártová et al., 2018; Bártová & Bárta, 2009).

Stanovení obsahu aminokyselin bylo provedeno v akreditované laboratoři Tagrea a.s. metodou ionexové chromatografie s následnou derivatizací ninhydridem po předchozí kyselé hydrolyze vzorku. Obsah aminokyselin byl stanoven na úrovni sušiny, bílkovinného izolátu a izolované frakce patatinu (výstup Bártová et al., 2015).

5.1.6. Izolace celkových hlízových bílkovin a stanovení vlastností bílkovinných koncentrátů

Bílkovinný koncentrát druhů *S. tuberosum* cv. Desirée, *S. andigenum*, *S. goniocalyx*, *S. phureja* a *S. stenotomum* pro následnou analýzu aminokyselinového složení byl připraven vysrážením

bílkovin z PFJ příslušných druhů přidáním NaHSO₃ (90% nasycení roztoku PFJ) a následným odsolením izolátu prostřednictvím gelové chromatografie (Sephadex G-25) (výstup Bártová et al., 2015).

Příprava bílkovinných koncentrátů pomocí nízkomolekulárních látek byla realizována vysrážením bílkovin z hlízové šťávy odrůdy Tomensa. Izolace probíhala ve dvou teplotních režimech 0 a 22°C. K vysrážení byla použita činidla: *i*) HCl, H₂SO₄, octová a citronová kyselina – bílkoviny byly izolovány úpravou pH PFJ na hodnotu pH 3,5; *ii*) organická činidla etanol, metanol, aceton a 2-propanol – bílkoviny byly izolovány při finální koncentraci 20 % v/v příslušného činidla v objemu PFJ a *iii*) kovy solí FeSO₄, FeCl₃ a ZnCl₂ – bílkoviny byly izolovány při finální koncentraci 15 mM (w/v) příslušné soli v hlízové šťávě. Při použití organických činidel a solí kovů byla před vlastním srážením upravena reakce PFJ na hodnotu pH 5,0. Rozpustný (100 mM fosfátový pufr, pH 7,0) i nerozpustný podíl byl podroben analýze obsahu N; rozpustný podíl bílkovin byl charakterizován s využitím elektroforetické analýzy v systému SDS-PAGE (výstup Bárta et al., 2008).

Příprava bílkovinných koncentrátů pro hodnocení variability biochemických vlastností v závislosti na izolačním procesu byla realizována vysrážením bílkovin z průmyslové PFJ pomocí etanolu (4°C; 1 – 6,4 M v/v nasycení PFJ etanolem), FeCl₃ (4°C, 1 – 20 mM w/v FeCl₃ v PFJ) a tepelnou koagulací po předchozí úpravě reakce PFJ na hodnotu 5,0. U získaných izolátů byla analyzována zpětná rozpustnost (100 mM fosfátový pufr, pH 7,0); rozpustný podíl bílkovin byl charakterizován s využitím elektroforetické analýzy v systému SDS-PAGE, bylo provedeno stanovení obsahu N prostřednictvím elementárního analyzátoru, stanovení obsahu draslíku, sodíku, vápníku a hořčíku (atomová absorpční spektrometrie, laboratoř AGRO-LA s.r.o), obsahu glykoalkaloidů (stanoven metodou HPLC-MS/MS) a bylo stanoveno zastoupení aminokyselin (provedeno v akreditované laboratoři Tagrea a.s. metodou ionexové chromatografie s následnou derivatizací ninhydridem po kyselé hydrolyze vzorku (výstup Bártová & Bárta, 2009).

5.1.7. Izolace hlízových bílkovin pro stanovení jejich antifungální aktivity

Termostabilní frakce hlízových bílkovin byla izolována z průmyslové hlízové šťávy, která byla po předchozí úpravě reakce na hodnotu pH 5,0 ošetřena teplotami 40, 60, 80 a 100°C. Vysrážené bílkoviny byly odděleny centrifugací a rozpustný podíl bílkovin s termostabilitou v uvedených teplotních režimech byl následně analyzován. U těchto bílkovin byla realizována elektroforetická analýza v systému peptidového SDS-PAGE, byl stanoven obsah celkového N (elementární analyzátor), obsah bílkovin byl analyzován BCA metodou, stanoven obsah draslíku (atomová absorpční spektrometrie) a cukrů (spektrofotometrická analýza) - obojí v laboratoři AGRO-LA s.r.o.. Dále byl analyzován u získaných bílkovinných izolátů obsah steroidních glykoalkaloidů metodou HPLC-MS/MS a byla měřena spektra cirkulárního dichroismu (ECD spektra, pracoviště) pro stanovení strukturní stability izolovaných bílkovin, spektrofotometricky byla stanovena aktivita inhibitorů trypsinu dle metodiky Pouvreau (2004). Nejvýznamnější část analýz termostabilní frakce bílkovin zahrnovala 2D PAGE analýzu s následnou identifikací detekovaných spotů prostřednictvím MALDI-TOF MS/MS analýzy (pracoviště CEITEC MUNI) a stanovení antifungální aktivity izolovaných bílkovinných frakcí metodou jamkové difuze vůči vybrané skupině rostlinných patogenů rodu *Fusarium*. Koncentrace bílkovin aplikovaná k patogenům byla 1, 5 a 10 mg.ml⁻¹ (výstup Bártová et al., 2018).

5.1.8. Izolace patatinové frakce hlízových bílkovin

Patatin byl izolován z PFJ získané z odrůdově či druhově příslušných hlíz (výstup Bárta et al., 2012a; Bárta et al., 2015; Bártová et al., 2015; Lattová et al., 2015) nebo z PFJ produkované škrobárenským provozem Lyckeby Amylex a.s. (výstup Bártová & Bárta, 2009). Chromatografická izolace patatinu na gravitačních kolonách probíhala v třístupňovém systému dle metodiky Bárta et al. (2013). Odrůdově specifická PFJ po úpravě pH na hodnotu 7,4 byla aplikována na kolonu s obsahem inotovýměnného média (DEAE celulóza) - po promytí kolony a eluci zachycené frakce, byla zachycená frakce opět po úpravě reakce na hodnotu pH 7,4 nanášena na kolonu s afinitní náplní (Konkanavalin A Agarosa), zachycená frakce byla po její eluci odsolena prostřednictvím gelové chromatografie (Sephadex G-25).

5.1.9. Analýzy izolované frakce patatinových bílkovin

K ověření izolačního postupu a stanovení charakteru patatinových spekter byla použita čipová elektroforéza Experion po předchozí denaturační extrakci vzorku dle metodiky Bárta et al. (2009).

Identifikace patatinových vzorků, stanovení přesné molekulové hmotnosti a zastoupení jednotlivých hmotnostních forem v rámci odrůd byla uskutečněna pomocí MALDI MS/MS analýzy (pracoviště CEITEC MUNI) (výstup Bárta et al., 2012a, 2015; Bártová et al., 2015).

Detekce zastoupení glykanů v rámci druhově odlišných vzorků patatinu bylo provedeno MALDI-TOF MS/MS analýzou pro předchozí deglykosilaci patatinových vzorků pomocí *N*-glykosidasy A s následnou derivatizací *N*-glykanů pomocí PHN (analýza probíhala na pracovišti CEITEC MUNI) (výstup Lattová et al., 2015).

Variabilita nativního spektra izolovaných vzorků patatinu byla stanovena s využitím nativní PAGE analýzy. Nativní PAGE patatinu byla realizována v systému kontinuálního uspořádání gelů s následnou detekcí patatinových isoform pomocí Coomassie Brilliant Blue nebo detekcí jejich lipdacylhydrolasové (LAH) aktivity na gelu dle metodiky Bárta et al. (2012b).

Isoelektrická fokusace pro detekci nábojových isoform izolovaného patatinu probíhala v gelovém systému s gradientem pH 4 - 6 s využitím elektroforetického systému Mini 111 Cell.

První rozměr 2D PAGE analýzy se uskutečnil na 7 cm stripech s imobilizovaným pH gradientem 4 - 7; druhý rozměr probíhal v diskontinuálním uspořádání na 10 % gelech. Bílkovinné spoty byly detekovány barvením v roztoku s obsahem Coomassie Brilliant Blue.

Specifická LAH aktivita vůči substrátu *p*-nitrofenylbutyrát byla kvantifikována spektrofotometricky (výstup Bárta et al., 2012a, 2015, Bártová & Bárta, 2008).

5.1.10. Statistické zpracování dat

Data byla zpracována statistickým programem „Statistika“. Data byla zpracována jednofaktorovou či vícefaktorovou analýzou rozptylu (ANOVA), testem diference středních hodnot (Tukey HSD test), analýzou komponent či byly aplikovány korelační a regresní analýzy.

5.2. Komentář publikovaných výsledků k prvnímu okruhu habilitační práce

5.2.1. Variabilita vybraných biochemických charakteristik hlízových bílkovin v rámci kulturního druhu bramboru *Solanum tuberosum* L.

- I) Bárta J., **Bártová V.**, Zdráhal Z., Šedo O. (2012a): Cultivar variability of patatin biochemical characteristics: table versus processing potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 4369-4378

V práci (Bárta et al., 2012a) byl izolován patatin z PFJ deseti odrůd, s rovnoměrným zastupením odrůd konzumních a odrůd určených pro zpracování účely, za účelem detailnějšího zmapování odrůdové variability vybraných biochemických vlastností patatinu. Studie zahrnuje stanovení přesné molekulové hmotnosti patatinových forem a jejich přítomnost v rámci hodnoceného souboru odrůd, byl stanoven počet patatinových isoformů s detekovatelnou LAH aktivitou, byl stanoven rozsah hodnot izoelektrických bodů stanovených pro jednotlivé odrůdy a v rámci 2D PAGE analýzy odrůdově příslušných vzorků patatinu byla stanoven počet detekovatelných spotů (Tabulka 6 a Obrázek 3). Prezentované výsledky zahrnovaly také kvantifikaci obsahu bílkovin, relativní abundance patatinu a kvantifikaci specifické LAH aktivity.

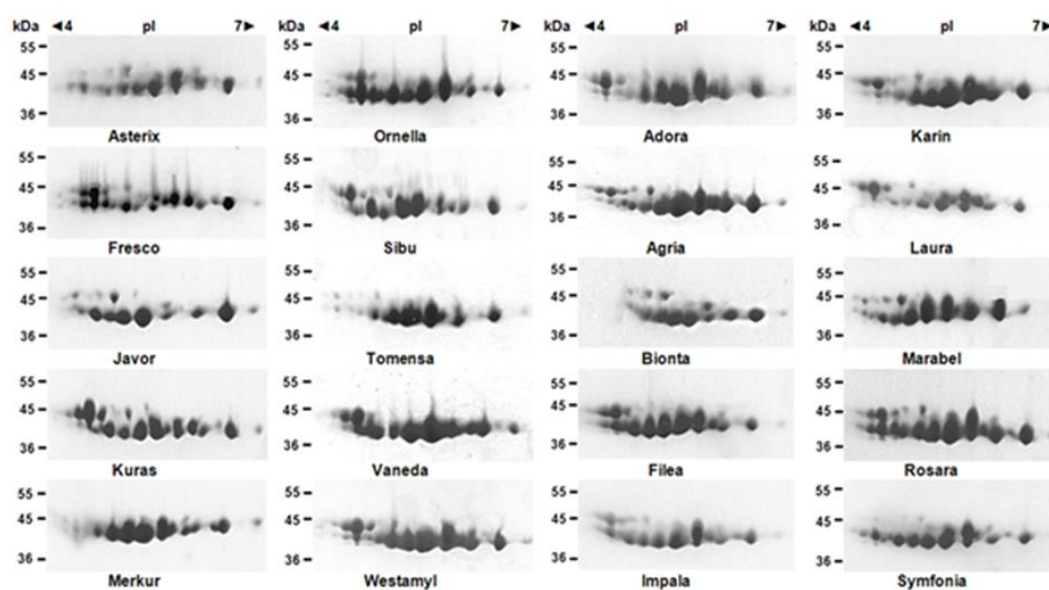
V hodnoceném souboru odrůd se obsah bílkovin v sušině hlíz pohyboval v rozmezí od 3,85 (cv. Bionta) do 6,23 (cv. Marabel) % u skupiny konzumních odrůd a od 3,98 (cv. Fresco) do 7,39 (cv. Javor) % ve skupině odrůd určených pro zpracování. Relativní abundance patatinu v sušině hlíz byla stanovena v rozsahu od 5,4 (cv. Bionta) do 35,4 (cv. Ornella) %.

Molekulová hmotnost detekovaných isoformů patatinu byla v rámci hodnoceného souboru odrůd v rozmezí od 40513 do 42988 Da (Tabulka 6). U všech odrůd byla detekována první hmotnostní stupeň patatinu s molekulovou hmotností mezi 40513 a 40666 Da. Druhá úroveň molekulové hmotnosti (41702 až 41884 Da) byla nalezena u patatinu všech hodnocených odrůd s výjimkou odrůdy Javor, u níž byla zjištěna pouze první hmotnostní úroveň, a to 40539 Da. Obdobě i třetí forma patatinu s molekulovou hmotností v rozmezí od 42884 do 42988 Da nebyla detekována u všech odrůd, jak je zřejmé z tabulky 6. Tři základní úrovně hmotností isoformů patatinu byly charakterizovány na základě jejich průměrné hmotnosti – tzn. 40590, 41798 a 42930 Da. Přibližný rozdíl 1,2 kDa mezi jednotlivými hmotnostními úrovněmi, který odpovídá hmotnosti sacharidové části patatinu (Lattová et al., 2015), podpořil již dříve vyslovenou hypotézu o zásadním podílu rozdílné míry glykosylace na variabilitě hmotnostních úrovní patatinu (Pots, 1999).

Tabulka 6: Analýza odrůdové variability vybrané skupiny biochemických charakteristik patatinu (převzato a upraveno dle Bárta et al., 2012a).

Odrůda	MALDI TOF MS analýza hmotnostní isoforem			Počet pruhů s LAH aktivitou	Isoelektrická fokusace		2D PAGE počet spotů
	pík I	pík II	pík III		počet pruhů	rozsah pI	
konzum							
Adora	40594	41824	42917	2	10	4,5 – 5,01	19
Agria	40597	41794		3	12	4,50 – 5,09	19
Bionta	40575	41702		2	11	4,51 – 5,14	17
Filea	40655	41814	42975	2	9	4,48 – 4,91	19
Impala	40557	41796	42886	4	11	4,47 – 4,90	17
Karin	40666	41849	42913	3	10	4,49 – 4,92	18
Laura	40563	41802	42942	2	10	4,45 – 4,85	18
Marabel	40600	41822		3	11	4,50 – 4,99	20
Rosara	40571	41804		3	7	4,52 – 4,99	23
Symfonia	40585	41804		3	10	4,49 – 4,83	18
škrob							
Asterix	40579	41819		3	12	4,55 – 5,07	19
Fresco	40639	41884	42988	4	7	4,49 – 4,79	21
Javor	40539			3	9	4,58 – 4,82	18
Kuras	40557	41768	42930	4	14	4,49 – 4,81	21
Merkur	40655	41791		3	9	4,57 – 4,79	19
Ornella	40513	41798	42953	2	7	4,53 – 4,82	21
Sibu	40601	41799	42950	3	13	4,48 – 4,79	21
Tomensa	40551	41751		2	7	4,61 – 4,84	22
Vaneda	40617	41745	42884	3	10	4,49 – 4,85	19
Westamyl	40579	41791	42891	3	12	4,48 – 5,03	23

Obrázek 3: Odrůdová variabilita 2D PAGE profilů odrůdově příslušných izolátů patatinu (převzato a upraveno dle Bárta et al., 2012a).



Modifikace elektroforetické analýzy byly použity k hodnocení variability nábojových isoform patatinu a isoform, které disponují LAH aktivitou. Odrůdově specifické izoláty patatinu byly separované v systému nativní PAGE s následnou detekcí patatinových isoform roztokem s obsahem barviva Coomassie Blue. U stejných izolátů byla paralelně po ukončení separace detekována LAH aktivita patatinových isoform. Ve skupině konzumních odrůd bylo roztokem Coomassie Blue detekováno od 2 do 3 pruhů a ve skupině odrůd určených k produkci škrobu od 1 do 4 pruhů. Většina takto detekovaných pruhů se shodovala s pozicí pruhů patatinu se zjištěnou LAH aktivitou. Vysoká úroveň odrůdové variability byla zaznamenána na základě analýzy nábojových isoform prostřednictvím IEF a 2D PAGE. V rámci hodnoceného souboru odrůd bylo u patatinových izolátů zjištěno 7 – 14 nábojových isoform s pI v rozsahu pH od 4,45 do 5,14. Obdobně našli vysokou variabilitu nábojových isoform i ostatní autoři, a to i přesto, že často šlo o hodnocení mešího souboru genotypů - např. Racusen & Foote (1980) našel 6 - 10 nábojových isoform, Park et al. (1983) popsal 12 - 15 „patatinových druhů“ a Pots (1999) pak 6 pruhů s hodnotou pI v oblasti pH 4,1 až 5,2.

Kombinace rozmanitosti hmotnostních a nábojových isoform vytvořila základ pro detekci vysoké míry variability patatinových izolátů v rámci 2D PAGE analýzy. Obrazový záznam analýzy je prezentován na obrázku 3. Na základě detekce bílkovinných „spotů“ barvou Coomassie Blue bylo nalezeno 17 až 23 spotů v rámci celého souboru odrůd. Porovnáme-li zjištěné údaje s ostatními autory, pak Bauw et al., (2006) u odrůdy Desiree našel 9 isoform a Lehesranta et al. (2005) 17 isoform u odrůdy Kuras. Avšak v publikaci Bárta et al. (2012a) je variabilita patatinu poprvé dokumentována na velmi rozsáhlém souboru odrůd.

LAH aktivita patatinových izolátů se vůči substrátu *p*-nitrofenylbutyrát pohybovala v rozsahu od 0,92 (cv. Rosara) po 5,46 (cv. Filea) $\mu\text{mol}/(\text{min}.\text{mg})^{-1}$. Vysoká hodnota LAH aktivity (nad 4,0 $\mu\text{mol}/(\text{min}.\text{mg})^{-1}$) byla zaznamenána u odrůd Agria, Filea, Marabel, Symfonia a Merkur. LAH aktivita byla vyšší u konzumních odrůd - v průměru činila 3,33 $\mu\text{mol}/(\text{min}.\text{mg})^{-1}$ oproti odrůdám určeným pro zpracování na škrob s průměrnou LAH aktivitou 2,22 $\mu\text{mol}/(\text{min}.\text{mg})^{-1}$. LAH aktivita patatinu je klíčová pro emulgační vlastnosti hlízových bílkovin a zmapování odrůdové variability tohoto ukazatele přináší nové možnosti ve výběru odrůd pro získávání bílkovinných izolátů s optimální hodnotou funkčních vlastností.

Práce Bárta et al. (2012a) představuje unikátní soubor dat, neboť přinesla poprvé informace o variabilitě biochemických vlastností patatinu na rozsáhlém souboru odrůd. Práce dalších autorů, které na uvedené publikace navázaly, měly i z tohoto důvodu široký záběr řešící např. metody molekulární biologie ve šlechtění brambor na obsah bílkovin v hlízách (např. Klaassen et al., 2019), popis genotypové variability obsahových a funkčních vlastností hlízových bílkovin (např. Mouzo et al., 2018a; Mouzo et al., 2018b; Mello de et al., 2016), izolaci bílkovinných frakcí a jejich funkčních vlastností (např. Schmidt et al., 2018; Taskila et al., 2017), popis vlivu agroekologických faktorů na kumulaci obsahových látek v hlízách bramboru (např. Leonel et al., 2017) či modifikaci struktury a funkčních vlastností patatinu (např. Fu et al., 2016).

5.2.2. Variabilita obsahových, biochemických a nutričních vlastností patatinu vybraných druhů rodu *Solanum*

- II) Bárta J., **Bártová V.**, Brabcová A., Diviš J., Horáčková V., Kamenová A., Zdráhal Z. (2015): Genotypový potenciál obsahu a kvality bílkovin v hlízách brambor, p. 21-64. In: Bárta J. (ed.): Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*. KURENT České Budějovice.
- III) Lattová E., Brabcová A., **Bártová V.**, Potěšil D., Bárta J., Zdráhal Z. (2015): N-Glycome profiling of patatins from different potato species of *Solanum* genus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 3243-3250.
- IV) **Bártová V.**, Bárta J., Brabcová A., Zdráhal Z., Horáčková V. (2015): Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species. *Journal of Food Composition and Analysis* 40: 78-85.

Druhová variabilita kumulace hlízových bílkovin a vybrané skupiny charakteristik patatinových bílkovin byla studována na souboru genotypů, který zahrnoval kontrolní skupinu 5 odrůd kulturního druhu *S. tuberosum* (odrůdy konzumní i odrůdy určené ke zpracování); dále zahrnoval skupinu 4 druhů, které jsou pěstovány v zemi původního výskytu jako místní kulturní druhy (zde označeny jako polokulturní druhy) a skupinu 19 genotypů planých druhů. Seznam uvedených genotypů, hodnoty ploidie a EBM hodnota jsou uvedeny v tabulce 7.

Nejvyšší obsah dusíkatých látek v obsahu sušiny (v průměru 16,56 %) byl zaznamenán u skupiny planých genotypů, avšak tato skupina zároveň vykázala v průměru nejnižší obsah bílkovin v sušině, a to na úrovni 5,45 %. Vyrovnané hodnoty obsahu bílkovin v sušině hlíz byly zaznamenány u polokulturních druhů a odrůd kulturního druhu *S. tuberosum* (Tabulka 7). V těchto skupinách byl také menší rozptyl nalezených hodnot – např. ve skupině odrůd kulturního druhu *S. tuberosum* se jednalo o rozptyl obsahu bílkovin od 4,24 (cv. Kuras) do 8,10 (cv. Superior) % v porovnání s rozsáhlou variabilitou ve skupině planých genotypů (3,42 u druhu *S. bulbocastanum* až 9,18 % u druhu *S. sucrense*). Za genotypy s vysokým obsahem bílkovin (nad 7 % v obsahu sušiny) lze v rámci hodnoceného souboru genotypů považovat *S. tuberosum* cv. Superior, *S. andigenum* genotyp 07S0300066, *S. acuaule* a *S. sucrense*.

Relativní abundance patatinu a inhibitorů proteas a následně i obsahové charakteristiky těchto dvou skupin bílkovin vykázaly obdobnou míru variability v rámci hodnocených skupin genotypů (Tabulka 7). Skupina odrůd druhu *S. tuberosum* a skupina polokulturních druhů měly srovnatelnou průměrnou hodnotu relativní abundance patatinu i obsahu patatinu v sušině hlíz brambor. Nejnižší hodnota relativní abundance patatinu byla nalezena u skupiny planých forem, kde dosáhla úrovně 26,8 % a obdobně byla v této skupině detekována také nejnižší hodnota obsahu patatinu v sušině hlíz, a to na úrovni 0,39 % v porovnání s 0,44 % u skupiny odrůd *S. tuberosum* a téměř shodné hodnoty 0,43 % obsahu patatinu u skupiny polokulturních druhů. Skupina planých druhů je zřejmě zajímavým zdrojem velké variability obsahových charakteristik patatinu, neboť rozsah relativní abundance patatinu se pohyboval od 9,0 (*S. pinnatisectum*) až po 41,4 (*S. verrucosum*) %. V obdobně širokém rozpětí se následně pohybovala i hodnota obsahu patatinu. V závislosti na obsahu bílkovin byl obsah patatinu v sušině hlíz stanoven v rozsahu od 0,13 % (*S. bulbocastanum*) do 0,83 (*S. acaule*) %. U druhu

S. acaule byla zaznamenána kombinace vysoké hodnoty relativní abundance patatinu a obsahu bílkovin v sušině hlíz.

Druhou sledovanou komponentou hlízových bílkovin je skupina inhibitorů proteas. Tato skupina bílkovin byla naopak výrazněji zastoupena ve skupině planých druhů, a to s průměrnou hodnotou relativní abundance 66,76 % a obsahem 0,96 % v obsahu bílkovin. Vysoký obsah inhibitorů proteas v sušině hlíz (1,05 %), ale s nižšími hodnotami relativní abundance (64,6 %) byly zaznamenány v případě skupiny polokulturních druhů. Vysoká relativní abundance inhibitorů proteas (nad 80 % v obsahu bílkovin) byla zaznamenána u druhu *S. berthaultii*, ale vzhledem k odlišnostem v koncentraci bílkovin mezi jednotlivými druhy, byl nejvyšší obsah inhibitorů proteas v sušině hlíz nalezen u druhu *S. sucrense* (1,60 %).

Z dostupné literatury je frakce patatinu uváděna nejčastěji s rozpětím relativní abundance 20 – 40 % (Shewry, 2003), ale naše výsledky (Bárta & Bártová, 2008; Bárta et al., 2012a) naznačují u odrůd kulturního druhu *S. tuberosum* mnohem širší rozpětí a v případě souboru genotypů zahrnující i plané druhy byla rozsáhlá variabilita dat očekávána. Informace týkající se zastoupení patatinu nebo dokonce skupiny inhibitorů proteas jsou velmi omezené až žádné. Racusen (1988) na souboru 25 genotypů zaznamenal zastoupení patatinu v obsahu bílkovin v rozsahu 12 – 35 %; méně než 5 % zastoupení patatinu v obsahu bílkovin bylo v práci Racusen (1988) zaznamenáno u druhů *S. cardiophyllum* a *S. lesteri*.

Vedle obsahových charakteristik hlízových bílkovin byly hodnoceny i kvalitativní parametry, a to zejména na úrovni patatinu. Následná data (Tabulka 8) prezentují přítomnost individuálních hmotností forem patatinu s detekcí přesné molekulové hmotnosti pomocí MALDI-TOF MS analýzy. Dále je zde prezentována specifická lipidacylhydrolasová (LAH) aktivita patatinu vůči substrátu *p*-nitrofenylbutyrátu. LAH aktivita patatinu se v rámci hodnoceného souboru pohybovala v širokém rozpětí hodnot od 2,67 do 22,74 $\mu\text{mol (min.mg)}^{-1}$. Nejnižší uvedená hodnota byla detekována u patatinu izolovaného z hlíz druhu *S. tuberosum* (cv. Desirée), nejvyšší pak u druhu *S. bulbocastanum*. Paradoxně byly obsahové charakteristiky patatinu nižší u skupiny planých druhů, avšak specifická LAH aktivita byla zde nejvyšší a v průměru hodnoceného souboru činila 10,36 $\mu\text{mol (min.mg)}^{-1}$ v porovnání se skupinou odrůd kulturního druhu *S. tuberosum* (v průměru 7,85 $\mu\text{mol (min.mg)}^{-1}$) a polokulturních druhů (v průměru 7,96 $\mu\text{mol (min.mg)}^{-1}$). Vysoká hodnota LAH byla kromě druhu *S. bulbocastanum* zaznamenána také u druhu *S. fendleri*. Odrůda Desirée s nejnižší LAH aktivitou postrádá patatinovou isoformu prvního glykosylačního stupně, stejně jako druh *S. vernei* s též slabou LAH aktivitou.

Do jaké míry absence určitého typu hmotnostní isoformy souvisí s výslednou enzymovou aktivitou patatinu zůstává otázkou. Např. druh *S. pinnatisectum* isoformu prvního glykosylačního stupně též postrádá, přesto LAH aktivita je téměř dvojnásobná oproti aktivitě detekované u druhu *S. vernei*. V hodnoceném souboru genotypů byla první hmotnostní isoforma detekována u 24 z 29 genotypů. Méně zastoupená byla druhá hmotnostní isoforma (zastoupená u 17 genotypů) a nejméně třetí hmotnostní úroveň, zastoupená pouze u 8 genotypů.

Tabulka 7: Obsah bílkovin, patatinu a inhibitorů proteas v hlízách hodnocených genotypů brambor (převzato a upraveno dle Bárta et al., 2015).

Druh	Ploidita/ EBN	Obsah bílkovin (% sušiny)	Relativní abundance patatinu (%)	Obsah patatinu (% sušiny)	Relativní abundance inhibitorů proteas (%)	Obsah inhibitorů proteas (%)
Odrůdy druhu <i>S. tuberosum</i>						
Desirée	4x/4	6,06 ^{fg}	14.4	0,18 ⁿ	75,4	0,91 ^{jk}
Kuras	4x/4	4,24 ^m	27.4	0,35 ^{ik}	70,0	0,87 ^l
Russet Burbank	4x/4	5,76 ^{ghi}	37.7	0,46 ^f	56,3	0,68 ^r
Superior	4x/4	8,10 ^b	34.2	0,49 ^e	58,1	0,83 ^{mn}
Westamyl	4x/4	6,30 ^{ef}	38.8	0,74 ^b	54,4	1,01 ^h
průměr	/	6.09	30.5	0,44	62,8	0,86
Genotypy polokulturních druhů						
<i>S. andigenum</i> 07S0300066	4x/4	9,09 ^a	21,5	0,43 ^g	73,4	1,46 ^c
<i>S. andigenum</i> 07S0300235	4x/4	5,59 ^{ij}	29,3	0,42 ^{gh}	64,9	0,91 ^{jk}
<i>S. goniocalyx</i>	2x/4	4,57 ^{kl}	33.23	0,32 ^l	56,8	0,56 ^s
<i>S. phureja</i>	2x/2	6,73 ^d	21.6	0,33 ^{kl}	65,3	1,12 ^e
<i>S. stenotomum</i>	2x/2	6,55 ^{de}	32.7	0,65 ^c	62,6	1,19 ^d
průměr	/	6.51	28.3	0,43	64,6	1,05
Genotypy planých druhů						
<i>S. acaule</i>	4x/2	8,23 ^b	33.3	0,83 ^a	59,9	1,46 ^c
<i>S. berthaultii</i>	2x/2	5,47 ^j	14.1	0,17 ⁿ	80,8	0,95 ⁱ
<i>S. bulbocastanum</i>	2x/1	3,42 ^o	18.7	0,13 ^o	75,3	0,51 ^t
<i>S. chacoense</i>	2x/2	4,64 ^{kl}	30.1	0,48 ^{ef}	65,4	1,07 ^f
<i>S. fendleri</i>	4x/2	4,47 ^{lm}	33.6	0,35 ^{jk}	60,4	0,58 ^s
<i>S. guerreroense</i>	6x/4	4,83 ^k	17.1	0,18 ⁿ	80,7	0,84 ^m
<i>S. incamaoyense</i>	2x/2	4,42 ^{lm}	38.9	0,37 ^{ij}	52,1	0,51 ^t
<i>S. leptophyes</i>	2x/2	6,37 ^e	38.2	0,64 ^c	60,9	1,01 ^h
<i>S. microdontum</i>	2x/2	5,62 ^{hij}	25,0	0,35 ^{jk}	70,2	0,92 ^j
<i>S. mochiquense</i>	2x/1	5,80 ^{ghi}	25.4	0,25 ^m	68,9	0,77 ^p
<i>S. pinnatisectum</i>	2x/1	5,58 ^{ij}	9.1	0,17 ⁿ	76,2	1,51 ^b
<i>S. polyadenium</i>	2x/1	5,41 ^j	24.7	0,32 ^l	65,7	0,77 ^p
<i>S. polytrichon</i>	4x/2	5,87 ^{ghi}	28.4	0,40 ^{hi}	64,5	0,89 ^k
<i>S. sparsipilum</i>	2x/2	7,20 ^c	32.5	0,65 ^c	59,6	1,18 ^d
<i>S. stoloniferum</i>	4x/2	4,58 ^{kl}	20.6	0,22 ^m	72,6	0,81 ^{no}
<i>S. sucrense</i>	4x/4(2)	9,18 ^a	28.4	0,60 ^d	66,4	1,60 ^a
<i>S. vernei</i>	2x/2	5,45 ^j	25,0	0,36 ^{jk}	68,5	1,04 ^g
<i>S. verrucosum</i>	2x/2	5,90 ^{gh}	41.4	0,63 ^c	53,3	0,81 ^o
<i>S. youngasense</i>	2x/2	3,86 ⁿ	24.8	0,38 ^{ij}	67,0	1,08 ^f
průměr		5.45	26.80	0,39	66,76	0,96

Pozn.: EBN – číslo vyjadřující potenciál genotypu pro tvorbu mezidruhových hybridů – zpracováno dle Hawkes (1994); VÚRV (2015) a Bárta et al. (2015); odlišná písmena značí statisticky průkazný rozdíl mezi hodnotami na hladině významnosti $P < 0,05$ (Tukey HSD test).

Tabulka 8: Variabilita molekulové hmotnosti isoform patatinu a analýza specifické lipidacylhydrolasové aktivity při použití substrátu *p*-nitrofenylbutyrátu (převzato a upraveno dle Bárta et al., 2015).

Druh	Počet detekovaných píků	Molekulová hmotnost			Aktivita lipidacylhydrolasy $\mu\text{mol (min.mg)}^{-1}$
		pík 1	pík 2	pík 3	
Odrůdy druhu <i>S. tuberosum</i>					
Desirée	2	/	41811	42973	2,67 ^t
Kuras	1	40626	/	/	12,31 ^f
Russet Burbank	2	40688	41892	/	7,62 ^{mn}
Superior	3	40699	41877	42986	9,12 ^{ijk}
Westamyl	3	40656	41868	42963	7,51 ^{mn}
průměr	/	/	/	/	7,85
Genotypy polokulturních druhů					
<i>S. andigenum</i> 07S0300066	3	40707	41979	43097	6,01 ^{opq}
<i>S. andigenum</i> 07S0300235	3	40715	41918	43067	7,67 ^{mn}
<i>S. goniocalyx</i>	2	40653	41907	/	9,58 ^{hi}
<i>S. phureja</i>	2	/	41915	43172	3,46 ^s
<i>S. stenotomum</i>	2	40633	42188	/	13,07 ^e
průměr	/	/	/	/	7,96
Genotypy planých druhů					
<i>S. acaule</i>	2	40743	42029	/	/
<i>S. berthaultii</i>	1	/	/	43094	/
<i>S. bulbocastanum</i>	3	40588	42054	43033	22,74 ^a
<i>S. chacoense</i>	1	40829	/	/	11,21 ^g
<i>S. fendleri</i>	1	41071	/	/	15,34 ^c
<i>S. guerreroense</i>	1	40743	/	/	6,32 ^{op}
<i>S. incamaoyense</i>	2	40822	42018	/	8,60 ^{iklm}
<i>S. leptophyes</i>	1	40789	/	/	10,73 ^g
<i>S. microdontum</i>	1	40678	/	/	16,35 ^b
<i>S. mochiquense</i>	2	41177	41891	/	10,77 ^g
<i>S. pinnatisectum</i>	1	/	41707	/	8,08 ^{lmn}
<i>S. polyadenium</i>	1	41178	/	/	5,4 ^{pq}
<i>S. polytrychon</i>	1	40881	/	/	10,95 ^g
<i>S. sparsipilum</i>	1	40795	/	/	9,05 ^{ikl}
<i>S. stoloniferum</i>	2	40860	42085	/	7,56 ^{mn}
<i>S. sucrense</i>	2	40779	42096	/	13,79 ^d
<i>S. vernei</i>	1	/	42237	/	4,66 ^r
<i>S. verrucosum</i>	1	40932	/	/	4,62 ^r
<i>S. youngasense</i>	1	40816	/	/	9,92 ^{hi}
průměr	/	/	/	/	10,36

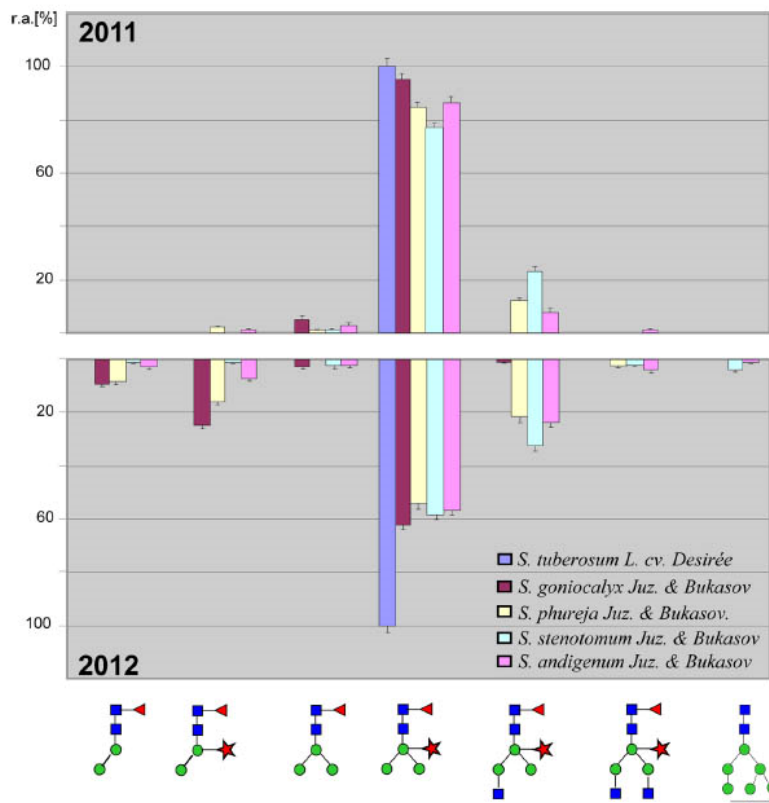
Pozn.: odlišná písmena značí statisticky průkazný rozdíl mezi hodnotami na hladině významnosti $P < 0,05$ (Tukey HSD test)

Glykosylace bílkovin je obvykle dávána do souvislosti se strukturální stabilitou bílkovin (Gomord & Faye, 2004), avšak v případě patatinu nejsou v tuto chvíli dostupné informace o vztahu glykosylační úrovně patatinu k jeho stabilitě, enzymovým aktivitám či fyziologické roli v rostlině. Glykosylační struktura a počet glykosylací jsou faktory, které je nutné brát v potaz i z hlediska alergicity patatinu, neboť právě patatin byl vyhodnocen jako hlavní alergen brambor a předpokládá se, že nositelem této alergicity je sacharidická část molekuly (Majamaa et al., 2001). I z tohoto důvodu se navazující studie (Lattová et al., 2015) zabývala zmapováním genotypové variability struktury sacharidové části patatinu. Obrázek 4 naznačuje strukturální změny v sacharidové části bílkovinné makromolekuly v závislosti na ročníku sběru rostlinného materiálu, ale především v závislosti na hodnoceném genotypu. Patatin byl pro danou studii izolován ze sběrů 2011 a 2012 a jednalo se o 5 druhů – kontrolní druh *S. tuberosum* cv. Desirée, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum* a *S. andigenum*.

N-glykanová struktura patatinu izolovaného již dříve z odrůdy Kuras byla prezentována jako $\text{Man}_3(\text{Xyl})\text{-GlcNAc-GlcNAc}(\text{Fuc})$ (Welinder & Jørgensen, 2009) a uvedená struktura byla popsána i v práci Lattová et al., (2015) jako majoritní – tento oligosacharid byl stanoven u patatinových vzorků druhu *S. tuberosum* cv. Desirée a druhu *S. goniocalyx*. Struktura *N*-glykanové části patatinu druhu *S. phureja* vykazovala přítomnost spíše kratších oligosacharidů $\text{Man}_2\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}$ a $\text{Man}_2(\text{Xyl})\text{GlcNAcFuc}$. Naopak struktura izolovaná z patatinů druhů *S. stenotomum* a *S. andigenum* obsahovala rozvětvené GlcNAc a jedná se o strukturu $\text{GlcNAc}_{1-2}\text{Man}_3(\text{Xyl})\text{GlcNAc}_2\text{Fuc}$.

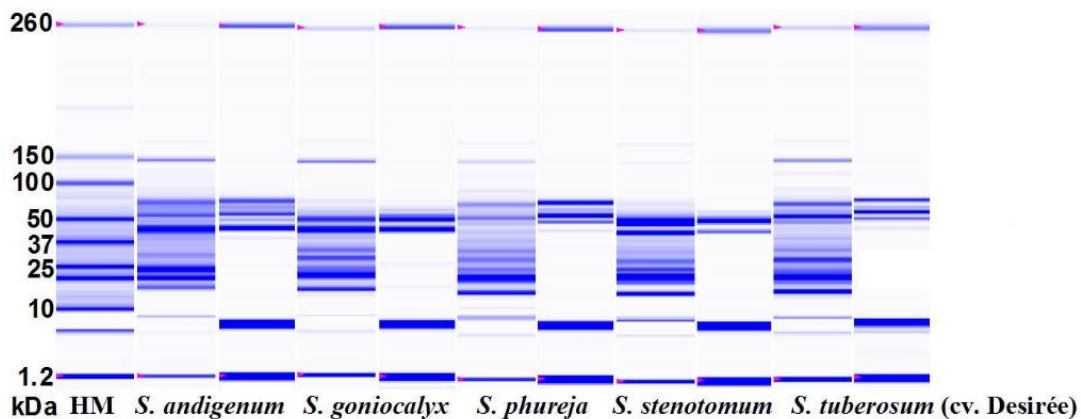
Hmotnost sacharidové části patatinu je 1169 Da (Lattová et al., 2015; Sonnewald et al., 1989; Welinder & Jørgensen, 2009), přesto z tabulky 8 vyplývá, že rozdíly hmotností jednotlivých isoformů patatinu ne vždy odpovídají takto definované hmotnosti sacharidové části a výsledný rozdíl mezi jednotlivými glykosylačními stupni je pravděpodobně kromě počtu glykosylací dán i bodovými záměnami aminokyselin v primární struktuře a zřejmě i změnami ve struktuře sacharidové jednotky, čímž se vytváří genotypově unikátní struktura patatinu. Míra vlivu této variability na funkční vlastnosti patatinu však zůstává nejasná a bezesporu by měla být cílem dalšího výzkumu.

Obrázek 4: Scématická ilustrace výskytu *N*-glykanů detekovaných MALDI MS analýzou u patatinových bílkovin zvolených druhů rodu *Solanum* (převzato a upraveno dle Lattová et al., 2015).



Pozn.: izoláty patatinu z hlíz získaných v roce 2011 a 2012; relativní zastoupení glykanů kalkulováno na základě intenzity MS signálu, vysvětlení symbolů: ▲ fukosa; ■ *N*-acetylglukosamin; ● manosa; ★ xylosa

Obrázek 5: Celobílkovinný a patatinových profil druhů rodu *Solanum* určených k analýze nutriční hodnoty bílkovinných komponent (převzato a upraveno dle Bártová et al., 2015).



Pozn.: vzorky po analýze na čipové elektroforéze jsou označeny příslušným druhem – první pruh je výsledkem analýzy celkových hlízových bílkovin, druhý pruh představuje izolovanou frakce patatinových bílkovin.

Pět druhů rodu *Solanum* (*S. tuberosum* cv. Desirée, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum*) bylo analyzováno z hlediska variability jejich nutriční hodnoty, která byla hodnocena jako zastoupení esenciálních aminokyselin (Tabulka 9). Hodnocení probíhalo na úrovni sušiny hlíz, bílkovinného izolátu a purifikovaného patatinu příslušných druhů. Velice nízký obsah patatinu byl v rámci hodnocených druhů zaznamenán u druhu *S. phureja* (0,9 % sušiny hlíz) a naopak nejvyšší u druhu *S. andigenum* (3,3 % sušiny hlíz). Obrázek 5 představuje úspěšný postup purifikace patatinových bílkovin z hlízové šťávy jednotlivých druhů. Na základě MALDI TOF analýzy byly zaznamenány podobné profily u druhů *S. goniocalyx* a *S. stenotomum* (nalezeny 2 píky s hmotností ~40 a ~41-42 kDa). Vzájemně podobné profily vykazovaly i druhy *S. phureja* a *S. tuberosum* cv. Desirée.

Nutriční hodnota sušiny byla ovlivněna druhovou variabilitou obsahu neesenciálních aminokyselin, a to zejména kyseliny asparagové, glutamové a jejich amidů. Překvapivě nejvyšší zastoupení těchto balastních aminokyselin bylo zaznamenáno u kulturního druhu *S. tuberosum* cv. Desirée a druhu *S. andigenum*, což ve výsledku vedlo k nízké hodnotě aminokyselinového skóre (AAS) a indexu esenciálních aminokyselin (EAAI) u těchto dvou druhů. U druhu *S. andigenum* k nízké hodnotě EAAI (76,9 % standardu FAO/WHO pro dospělého člověka) přispěla i nízká koncentrace methioninu; u druhu *S. tuberosum* pak nízká koncentrace cysteinu.

Vzhledem ke skutečnosti, že řada balastních aminokyselin se v sušině hlíz vyskutekuje volně, byla zvolena také analýza bílkovinných izolátů, kde se předpokládala eliminace volných neesenciálních aminokyselin a získání reálnějšího obrazu nutriční hodnoty hlízových bílkovin. K výraznému snížení obsahu kyseliny asparagové a glutamové skutečně došlo u všech druhů; u druhů *S. andigenum* a *S. tuberosum* cv. Desirée byl pokles nejvýraznější. Tento posun se projevil změnou hodnot AAS i EAAI u bílkovinných izolátů při srovnání s hodnotami původní sušiny. Nejvyšší hodnoty AAS (117,9 % standardu FAO/WHO pro dospělého člověka) a EAAI (110,1 % standardu FAO/WHO pro dospělého člověka) byly zaznamenány u druhu *S. andigenum*.

Dle dříve prezentovaných výsledků (Bártová & Bárta, 2009) byl vysloven předpoklad výrazného podílu patatinu na nutriční hodnotě bílkovin. I z tohoto důvodu bylo přistoupeno k purifikaci patatinu z PFJ jednotlivých druhů. Získanými výsledky lze uvedený předpoklad považovat za potvrzený, neboť hodnota EAAI patatinů se pohybovala od 93 % u druhu *S. phureja* do 112,5 % u druhu *S. goniocalyx* vztaheno ke standardu FAO/WHO pro dospělého člověka; u všech vzorků patatinu byl také již dříve prezentovaný Bártová & Bárta (2009) limitující efekt obou sirných aminokyselin.

Data uvedená pracích Lattová et al. (2015) a Bártová et al. (2015) opět představují unikátní soubor dat, která byla k dané problematice publikována poprvé. V následných pracích ostatních autorů byla data využita k řešení problematiky nutriční hodnoty výrobků z brambor (např. Jin et al., 2017; Quispe-Mendoza et al., 2018) či jiných rostlinných zdrojů a vzájemné porovnání jejich nutriční hodnoty (např. Huang et al., 2019; Yang et al., 2018). Datat se uplatnila také při řešení problematiky šlechtění kulturního bramboru (např. Mouzo et al., 2018a; Narvaez-Cuenca et al., 2018), či byly aplikovány metodických postupů uvedené v citovaných pracích (např. Li et al., 2016).

Tabulka 9: Variabilita nutriční hodnoty hlízových bílkovin na úrovni homogenizované sušiny, celobílkovinného izolátu a patatinových bílkovin zvolených druhů rodu *Solanum* (převzato a upraveno dle Bártová et al., 2015).

Nutriční hodnota	<i>S. andigenum</i>	<i>S. goniocalyx</i>	<i>S. phureja</i>	<i>S. stenotomum</i>	<i>S. tuberosum</i> cv. Desirée
Homogenizovaná sušina hlíz					
Průměrná hodnota	80,7 ^a	87,1 ^b	101,1 ^c	91,2 ^b	76,7 ^a
AAS (%)					
AAS hodnota	60,0 ^b	61,4 ^b	70,7 ^c	68,4 ^c	46,4 ^a
limitující	leucin	leucin	leucin	leucin	leucin
aminokyseliny (%)					
EAAI (%)	76,9 ^b	82,9 ^c	94,3 ^e	87,5 ^d	72,2 ^a
Koncentrát hlízových bílkovin					
Průměrná hodnota	117,9 ^c	104,0 ^{ab}	103,1 ^a	109,1 ^b	109,6 ^b
AAS (%)					
AAS hodnota	63,7 ^{bc}	66,5 ^c	62,2 ^b	64,6 ^{bc}	50,0 ^a
limitující	cystein	isoleucin	isoleucin	cystein	cystein
aminokyseliny (%)	methionin			methionin	methionin
EAAI (%)	110,1 ^c	97,6 ^{ab}	96,5 ^a	103,0 ^b	101,4 ^{ab}
Izolovaný patatin					
Průměrná hodnota	110 ^b	125 ^c	100 ^a	109,9 ^b	103 ^a
AAS (%)					
AAS hodnota	47,2 ^b	45,7 ^{ab}	44,3 ^a	44,3 ^a	51,1 ^c
limitující	cystein	cystein	cystein	cystein	cystein
aminokyseliny (%)	methionin	methionin	methionin	methionin	methionin
EAAI (%)	102,2 ^b	112,5 ^c	93,0 ^a	102,2 ^b	97,0 ^a

Pozn.: AAS (%) – aminokyselinové skóre (*Amino Acid Score*); EAAI (%) – Index esenciálních aminokyselin (*Essential Amino Acid Index*); hodnoty AAS (%) a EAAI (%) jsou vztaženy k aminokyselinovému složení bílkovinného standardu FAO/WHO pro dospělého jedince (FAO/WHO, 1991); odlišná písmena značí statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$

5.3. Komentář publikovaných výsledků k druhému okruhu habilitační práce

5.3.1. Variabilita zastoupení bílkovin a patatinové frakce v hlízách bramboru produkovaných v konvenčním a ekologickém systému pěstování

- I) **Bártová V., Diviš J., Bárta J., Brabcová A., Švajnerová M. (2013):** Variation of nitrogenous components in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers produced under organic and conventional crop management. *The European Journal of Agronomy* 49: 20-31.

V průběhu let 2006 až 2008 byly na stanovištích s odlišnou nadmořskou výškou (Volyně 460 m a Lukavec 610 m) vedeny polní pokusy v ekologickém i konvenčním režimu, jejichž cílem bylo zmapovat vliv stanoviště, ročníku, odrůdy a technologie produkce na tvorbu výnosu, kvalitu a variabilitu obsahu i složení dusíkatých látek. Vedle základní charakteristiky obsahu dusíkatých látek v sušině, bylo hodnoceno též obsahové zastoupení glykoalkaloidních látek, dusičnanů, bílkovin a relativní abundance patatinu (Tabulka 10).

Tabulka 10: Vliv pěstitelské technologie, stanoviště, ročníku a odrůdy na variabilitu obsahu dusíkatých látek, bílkovin a patatinu (převzato a upraveno dle Bártová et al., 2013).

Ukazatel	Dusíkaté látky (% sušiny)	Obsah bílkovin (% sušiny)	Zastoupení bílkovin v obsahu dusíkatých látek (%)	Relativní abundance patatinu (%)	Obsah patatinu (% sušiny)
Pěstitelská technologie					
Ekologická	9,2 ^a	4,1 ^a	45,6 ^a	26,3 ^a	1,11 ^a
Konvenční	9,7 ^b	4,3 ^a	44,2 ^a	26,9 ^a	1,19 ^a
Ročník					
2006	9,9 ^b	4,0 ^a	39,8 ^a	27,5 ^a	1,13 ^a
2007	9,2 ^a	4,1 ^{ab}	45,5 ^b	26,2 ^a	1,12 ^a
2008	9,2 ^a	4,5 ^b	49,4 ^b	26,1 ^a	1,19 ^a
Stanoviště					
Volyně	9,3 ^a	4,1 ^a	44,5 ^a	27,4 ^a	1,15 ^a
Lukavec	9,6 ^a	4,3 ^a	45,6 ^a	25,7 ^a	1,14 ^a
Odrůda					
Bionta	8,0 ^a	3,4 ^a	43,2 ^{ab}	13,9 ^a	0,46 ^a
Karin	9,6 ^b	4,4 ^b	46,5 ^b	29,6 ^c	1,31 ^c
Marabel	10,1 ^b	4,7 ^b	46,7 ^b	36,8 ^d	1,74 ^d
Rosara	11,1 ^c	4,1 ^b	38,0 ^a	18,1 ^b	0,75 ^b
Satina	8,5 ^a	4,3 ^b	50,3 ^b	34,8 ^d	1,48 ^c
Průměr	9,4	4,2	44,9	26,6	1,15

Pozn.: odlišná písmena značí statisticky průkazný rozdíl na hladině významnosti $P < 0,05$ (Fisher LSD test).

Ročníky 2006 a 2007 byly z pohledu sumy srážek a teplot vyrovnané; nejnižší přísun srážek za období vegetace byl zaznamenán v roce 2008, a to na obou stanovištích. Dle očekávání byl výnos hlíz nižší u ekologické produkce (20,2 t.ha⁻¹) oproti konvenční produkci (33,8 t.ha⁻¹); výnos produkovaný v ekologickém systému zahrnoval vyšší podíl menší hlíz a tedy i nižší zastoupení tržního prodílu hlíz (Bártová et al., 2013).

Statisticky průkazné rozdíly mezi ekologickou a konvenční produkcí byly zaznamenány v případě obsahu dusičnanů, celkových dusíkatých látek a obsahu solaninu. Literárně je udáván vyšší obsah dusičnanů a celkových dusíkatých látek v konvenční produkci hlíz (Hajšlová et al., 2005; Lehesranta et al., 2007), což bylo potvrzeno i v naší studii Bártová et al. (2013). Avšak předpokládaný vyšší obsah glykoalkaloidů v případě ekologické produkce, který byl dříve prezentován jinými autory (Hajšlová et al., 2005), se v naší studii nepotvrdil a zjištěné odrůdové rozdíly v obsahu glykoalkaloidů byly významnější než rozdíly dané způsobem pěstování.

Obsahové charakteristiky dusíkatých látek, bílkovin a patatinu jsou uvedeny v tabulce 10. Literární zdroje se obvykle shodují na vyšší kumulaci dusíkatých látek v sušině hlíz produkovaných konvenčním systémem (Lehesranta et al., 2007), a to logicky z důvodu vyšší dostupnosti N výživy v půdě. K obdobným závěrům vedla i naše studie (Bártová et al., 2013). Informace týkající se vlivu pěstitelské technologie na obsah bílkovin a zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí nejsou jednoznačné nebo chybějí zcela. Järvan & Edesi (2009) a Lachman et al. (2005) našli vyšší zastoupení bílkovin v sušině hlíz ekologické produkce; často je tento závěr dáván i do souvislosti s vyšším podílem menších hlíz a vyšší kumulací sušiny v hlízách z ekologické produkce. V naší studii byl obsah bílkovin lehce vyšší v případě konvenční produkce – uvedený rozdíl nebyl statisticky průkazný a opět se jako majoritní projevil vliv odrůdy a ročníku (při společné interakci až 37 % vlivu v případě konvenční produkce), a to zejména v případě konvenční produkce. V případě ekologické produkce hlíz byla kumulace bílkovin ovlivněna zejména vzájemnými interakcemi všech sledovaných faktorů a kombinovaný vliv odrůdy, ročníku a stanoviště dosáhl až 38 %. Rozdílné výsledky obsahu bílkovin v hlízách produkovaných konvenčním či ekologickým způsobem, které jsou uváděny různými autory, jsou výsledkem výběru odrůd pro realizaci polních pokusů v konkrétních podmínkách. Rozsah obsahu bílkovin v sušině hlíz se pohyboval v rámci pokusu prezentovaném v naší práci v širokém rozsahu od 1,5 (Bionta, 2006, konvenční produkce, Lukavec) do 6,5 % (Marabel, 2007, konvenční produkce, Volyně).

Literárně nejsou dostupné informace týkající variability obsahových charakteristik patatinu v reakci na odlišné podmínky produkce. Lehesranta et al. (2007) zjistil, že u hodnocené odrůdy Santé na základě 2D PAGE analýzy došlo ke snížení abundance jedné isoformy patatinu v režimu ekologické produkce, ale na úrovni patatinu jako celku nedošlo k signifikantní změně abundance. V pokusu Bártová et al. (2013) se variabilita relativní abundance a obsahu patatinu pohybovala v rámci hodnocených odrůd v širokém rozpětí (Tabulka 10) a byl zjištěn lehce vyšší obsah patatinu v konvenční produkci, a to 1,19 % patatinu v obsahu sušiny hlíz oproti 1,11 % v ekologické produkci. Statisticky významný efekt pěstitelské technologie na obsah a relativní abundance patatinu nebyl pozorován. Analýza variance pak zřetelně prokázala odrůdu, jako nevýznamnější faktor ovlivňující obsahové charakteristiky patatinu.

Obrázek 6: Odrůdová stabilita hodnocených charakteristik obsahových látek hlíz v konvenční a ekologické produkci (převzato a upraveno dle Bártová et al., 2013).

Ekologický systém produkce	Konvenční systém produkce
cv. Bionta plocha grafu: 119.7Aa	cv. Bionta plocha grafu: 118.9Aa
cv. Karin plocha grafu: 273.1Cb	cv. Karin plocha grafu: 221.9Ca
cv. Marabel plocha grafu: 267.1Ca	cv. Marabel plocha grafu: 348.8Eb
cv. Rosara plocha grafu: 145.1Ba	cv. Rosara plocha grafu: 154.2Ba
cv. Satina plocha grafu: 270.7Ca	cv. Satina plocha grafu: 287.5Da

Pozn.: odlišná velká písmena indikují statisticky průkazný rozdíl mezi odrůdami a odlišná malá písmena indikují rozdíl mezi pěstitelskou technologií ($P \leq 0.05$); DM – sušina (%); PC – obsah bílkovin; P/NM – zastoupení bílkovin v obsahu dusíkatých látek (%); PaRa – relativní abundance patatinu (%); PaC – obsah patatinu (% sušiny).

Význam výběru odrůdy z pohledu složení i obsahu bílkovin je viditelný i z obrázku 6, který znázorňuje stabilitu odrůd v rámci konvenční a ekologické produkce z hlediska komplexního hodnocených charakteristik bílkovinné složky hlíz. Vhodnost výběru odrůdy z pohledu sledovaných produkčních charakteristik je zde vyjádřena jako dosažená plocha obrazce. Pouze odrůdy Bionta a Karin dosáhly při souhrnném hodnocení vyšší hodnoty plochy obrazce v ekologické produkci, ale jen u rané odrůdy Karin byl tento rozdíl statisticky průkazný a u této odrůdy byla zjištěna v ekologické produkci i nejvyšší plochy obrazce a lze tedy konstatovat, že se z pohledu hodnocených charakteristi jedná o odrůdu vhodnou do ekologické technologie produkce brambor. Druhou nejstabilnější odrůdou v hodnocených parametrech byla odrůda Marabel.

Data prezentovaná v publikaci Bártová et al. (2013) přinášejí komplex dat, která nelze nalézt v jiné publikaci, a to především s ohledem na hodnocení kumulace patatinových bílkovin v sušině hlíz v reakci na technologii produkce. V navazujících publikacích (6 citací ostatními autory) byly tyto informace využity např. pro publikační výstupy zabývající se produkcí brambor v systému konvenčního a ekologického zemědělství (např. El-Sayed et al., 2015; Pawelzik & Kurt, 2014) či v pracích řešící dopad pěstitelské technologie, zvolené výživy či druhové a odrůdové variability na obsahové látky hlíz (např. Makarewicz et al., 2017; Rojas-Padilla & Vasquez-Villalobo, 2016).

5.3.2. Odrůdová variabilita obsahových charakteristik patatinových bílkovin

- II) Bárta J., Bártová V. (2008): Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, and its occurrence as genotype effect: processing versus table potatoes. *Czech Journal of Food Sciences* 26: 347-359.

V rámci tříletého polního pokusu byl hodnocen soubor 40 odrůd brambor (rovnoměrně zastoupené odrůdy konzumní i odrůdy určené pro zpracování na škrob) z pohledu kvantitativních charakteristik patatinových bílkovin hlíz. Tyto charakteristiky zahrnovaly odhad relativní abundance patatinu v rámci hlízových bílkovin a jeho obsah v sušině hlíz, jak je definováno v tabulce 11. V prezentované práci Bárta & Bártová (2008) byl také hodnocen vztah mezi těmito charakteristikami a dalšími sledovanými parametry (Tabulka 12).

Relativní abundance patatinu v bílkovinách hlíz odrůd určených pro zpracování na škrob byla statisticky průkazně rozdílná ($P < 0,001$) v porovnání s relativní abundancí patatinu v bílkovinách hlíz konzumních odrůd. U odrůd určených pro zpracování na škrob tento ukazatel v průměru dosáhl 25,08 %, zatímco u konzumních odrůd byla relativní abundance patatinu 21,59 %. Během tří let sledování se relativní abundance patatinu pohybovala v celém hodnoceném souboru odrůd v rozpětí od 0,33 (cv. Bionta, 2005) do 33,85 % (cv. Tomensa, 2005). Obsah patatinu v sušině hlíz byl opět vyšší u odrůd určených pro zpracování na škrob, a to 1,28 % oproti 1,03 % u konzumních odrůd. Rozdíl byl opět statisticky průkazný. Rozsah hodnot obsahu patatinu byl od 0,01 (cv. Bionta, 2005) do 2,19 % (cv. Tomensa, 2005). Vysoké hodnoty průměrné relativní abundance patatinu (nad 30 %) bylo dosaženo u odrůd Tomensa a Vaneda; u odrůdy Tomensa bylo dosaženo i nejvyšší průměrné hodnoty obsahu patatinu, a to 2,03 % obsahu sušiny.

Průměrná hodnota obsahu bílkovin v sušině hlíz se pohybovala v rozsahu od 4,01 (cv. Kuras) do 6,50 % (cv. Tomensa). Konzumní odrůdy dosáhly vyšší hodnoty kumulace dusíkatých látek (průměr odrůd 9,90 % sušiny hlíz), ale více bílkovin bylo kumulováno v hlízách určených k produkci škrobu (v průměru 8,54 % sušiny). Relativní zastoupení bílkovin v obsahu dusíkatých látek bylo tedy příznivější u brambor určených pro zpracování na škrob, kde tato hodnota dosáhla 58 %, v porovnání se 48 % u konzumních odrůd.

Tabulka 11: Průměrné hodnoty odrůdové variability relativní abundance a obsahu patatinu v průměru hodnocených ročníků 2003-2005 (převzato a upraveno dle Bárta & Bártová, 2008).

Odrůda škrob	Odrůdy konzumních brambor			Odrůda konzum	Odrůdy brambor pro zpracování		
	vegetační doba	relativní abundance patatinu	obsah patatinu (% sušiny)		vegetační doba	relativní abundance patatinu	obsah patatinu (% sušiny)
Asterix	3	25,07 ^e	1,14 ^{ihg}	Adéla	7	10,77 ^l	0,56 ^j
Delikat	7	26,83 ^c	1,38 ^d	Adora	9	24,28 ^{bcd}	1,16 ^d
Fresco	9	24,98 ^e	1,07 ^{ijk}	Agria	5-4	24,70 ^{bc}	1,14 ^{de}
Innovator	6	24,86 ^e	1,30 ^{de}	Bionta	2	7,16 ^m	0,31 ^k
Javor	4	21,16 ^g	1,24 ^{ef}	Bolesta	5-4	24,84 ^b	1,32 ^{ab}
Krumlov	3	26,66 ^c	1,22 ^{efg}	Cicero	7	23,86 ^{de}	1,07 ^{fg}
Kuras	2	19,94 ^h	0,81 ^l	Cinja	7	23,45 ^{ef}	1,04 ^{fg}
Merkur	2	26,41 ^{cd}	1,17 ^{fgh}	Colette	8	24,06 ^{bcd}	1,15 ^d
Morene	2-3	24,68 ^e	1,20 ^{fg}	Dali	7	23,83 ^{de}	1,14 ^{de}
Ornella	3	29,61 ^b	1,65 ^{bc}	Filea	6-7	26,29 ^a	1,28 ^{bc}
Pacov	3	22,14 ^f	1,03 ^k	Impala	8	22,67 ^f	1,08 ^{efg}
Producent	2	29,49 ^b	1,60 ^c	Karin	7	17,84 ^k	0,85 ⁱ
Saturna	4-5	22,21 ^f	1,05 ^{jk}	Laura	5	22,00 ^g	1,10 ^{def}
Sibu	2	25,54 ^{de}	1,17 ^{fgh}	Ditta	5	20,09 ⁱ	0,86 ⁱ
Tábor	3	22,71 ^f	1,04 ^{jk}	Marabel	7-8	24,03 ^{cde}	1,38 ^a
Tegal	7	29,73 ^{ba}	1,71 ^b	Milva	5-4	22,88 ^f	1,14 ^{de}
Tomensa	6	31,24 ^a	2,03 ^a	Rosara	8	21,15 ^h	0,91 ^{ih}
Vaneda	7	21,29 ^a	1,64 ^{bc}	Rosella	5-4	24,64 ^{bc}	1,02 ^g
Vladan	6	24,69 ^e	1,11 ^{hij}	Santé	6	19,20 ^j	0,93 ^h
Westamyl	4	26,79 ^c	1,24 ^{ef}	Symfonia	4-5	24,17 ^{bcd}	1,24 ^c
Průměr	/	25,80	1,29	Průměr	/	21,59	1,03

Poznámky: odlišná písmena značí statisticky průkazný rozdíl mezi hodnotami na hladině významnosti $P < 0,05$ (Tukey HSD test); klasifikace odrůd dle délky vegetační doby: 1 – odrůdy nejranější; 9 – odrůdy nejpozdější

V rámci hodnoceného souboru odrůd byla zjištěna nejsilnější pozitivní korelace mezi obsahem patatinu a obsahem bílkovin, a to na úrovni obou hodnocených souborů odrůd (souhrně $r = 0,756$; $P < 0,001$). Dále je v tabulce 12 prezentován zjištěný pozitivní korelační vztah mezi obsahovými charakteristikami patatinu a obsahem celkových dusíkatých látek a obsahem sušiny. Literárně byl zmapován pozitivní vztah mezi délkou vegetační doby, obsahem sušiny a obsahem bílkovin (Leonel et al., 2017). Odrůdy s delší vegetační dobou by tedy měly kumulovat více patatinových bílkovin, avšak na úrovni celého hodnoceného souboru odrůd tento předpoklad nebyl potvrzen. Naopak potvrzen byl negativní vztah mezi velikostí hlíz a kumulací bílkovin a v tomto případě i patatinových bílkovin.

Odrůda byla rozhodujícím faktorem z hlediska relativní abundance patatinu i obsahu patatinu v sušině hlíz bramboru, a to u obou skupin odrůd; výraznější byl podíl odrůdy na variabilitě obou ukazatelů u konzumních odrůd. U konzumních odrůd se intenzivněji projevil i vliv ročníku a slabší byl vliv interakce obou hodnocených faktorů. Faktor odrůdy se na variabilitě relativní abundance patatinu podílel ze 49 %, faktor ročníku ze 14 % při hodnocení celého souboru odrůd.

Tabulka 12: Korelační vztahy mezi relativní abundancí a obsahem patatinu (převzato a upraveno dle (převzato a upraveno dle Bárta & Bártová, 2008).

		Celý soubor odrůd		Odrůdy pro zpracování na škrob		Konzumní odrůdy	
		PRA ¹	PAT ² (% sušiny)	PRA	PAT (% sušiny)	PRA	PAT (% sušiny)
Délka vegetační doby		0,031 ^{ns}	0,055 ^{ns}	0,220*	0,242**	0,251**	0,240**
Průměrná hmotnost hlíz (g)		-0,291***	-0,301***	-0,187*	-0,211*	-0,263**	-0,298**
Obsah sušiny (%)		0,320***	0,318***	0,066 ^{ns}	0,139 ^{ns}	0,131 ^{ns}	0,103 ^{ns}
Obsa škrobu (% čerstvé hmoty)		0,320***	0,329***	0,142 ^{ns}	0,179 ^{ns}	0,096 ^{ns}	0,108 ^{ns}
Obsah hrubých bílkovin (% sušiny)		0,204**	0,354***	0,452***	0,594***	0,355***	0,505***
Obsah bílkovin (% sušiny)		0,418***	0,756***	0,589***	0,889***	0,255**	0,565***

¹ relativní abundance patatinu (%) v obsahu hlízových bílkovin; ² obsah patatinu v hlízách (% sušiny); * P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ns – statisticky nepřekážné

Vzhledem k široce využitelným vlastnostem patatinu a jeho klíčové roli pro funkční a nutriční vlastnosti izolátů hlízových bílkovin, je až překvapující, že nejsou dostupné práce, které by se detailněji zabývaly vlivem odrůdy a dalších agroekologických podmínek na množství patatinu přítomné v hlíze. Literární zdroje uvádějí zastoupení patatinu ve spektru hlízových bílkovin na úrovni 20 - 40 % a až na starší práci Racusen & Foote (1980), jsou tyto informace založeny na analýze omezeného počtu genotypů, a to bez bližší specifikace vlivu odrůdy či dalších faktorů a vzájemných vztahů obsahových komponent hlíz a zastoupení patatinu (Pots, 1999; Jørgensen et al., 2006).

Práce Bárta & Bártová (2008) přinesla soubor dat, který nebyl v podobném rozsahu dosud publikován a práce dalších autorů, které na tuto práci postupně navazovali, se zabývali problematickou kvalitou hlíz brambor v širokém rozsahu řešených otázek. Za všechny lze uvést práce řešící zvyšování kvality hlíz šlechtitelskými postupy (např. Mouzo et al., 2018b), práce řešící vliv pěstitelské technologie na kvalitu hlíz brambor (např. Leonel et al., 2017) či vliv zpracovatelské technologie na obsahové látky hlíz (např. Ngobense & Workneh, 2018).

5.3.3. Vliv vybraných pěstitelských faktorů na kumulaci bílkovin a patatinové frakce v hlízách odrůd určených pro zpracování

- III) Bárta J., Diviš J., Švajner J., **Bártová V.** (2012c): Pěstování brambor pro produkci škrobu a bílkovin. Certifikovaná metodika pro praxi (osvědčení 194-2/KÚ/UKZUZ/2012), ZF JU v Českých Budějovicích
- IV) **Bártová V.**, Bárta J., Diviš J., Švajner J., Peterka J. (2009): Crude protein content in tubers of starch processing potato cultivars in dependence on different agro-ecological conditions. *Journal of Central European Agriculture* 10: 57-66.

Zpracování brambor na škrob logicky vyústilo v nutnost zabývat se faktory, které ovlivňují kumulaci škrobu v hlízách bramboru. Zároveň bylo nutné se v rámci šlechtitelské práce zabývat výběrem genových zdrojů, které splňují předpoklad vysoké výtěžnosti škrobu při zpracování hlíz. Zavedení izolace bílkovin z hlízové vody dává prostor pro sledování dalšího obsahového parametru hlíz. Je pravděpodobné, že z hlediska výběru odrůd zůstane rozhodující obsah a výnos škrobu z jednotky plochy, ale hodnocení obsahu bílkovin v odrůdách určených pro zpracování může přinést informace vedoucí k zefektivnění souběžné produkce škrobu a bílkovin.

Polní pokus vedený v letech 2004 - 2006 hodnotil reakci sedmi odrůd na výrazně odlišné dávky N hnojení v podmínkách stanovišť s odlišnou nadmořskou výškou (České Budějovice 380 m, Volyně 460 m, Lukavec 620 m). Závislost kumulace dusíkatých látek v hlíze na dostupnosti dusičnanových a amonných iontů v půdě byl prokázán v dřívějších publikacích (Eppendorf & Eggum, 1994; Lin et al., 2004), ale nedostupné jsou informace týkající se reakce odrůd určených pro výrobu škrobu na rozdílnou úroveň N výživy z pohledu změn obsahů bílkovin a patatinu. Rozporuplné jsou i informace týkající se vlivu N výživy na obsah a výnos škrobu (Ebúrneo et al., 2018) a vzájemné korelační vztahy mezi obsahem dusíkatých látek v hlíze a obsahem škrobu (Gao et al., 2015; Yang et al., 2017; Huang et al., 1996).

Průměrná hodnota obsahu dusíkatých látek (Tabulka 13) byla statisticky průkazně vyšší při aplikaci zvýšené dávky N hnojení. Obdobně byl zjištěn i statisticky průkazný rozdíl ve výnosu dusíkatých látek, zatímco obsah sušiny a výnos hlíz byly méně ovlivněny N hnojením a více se u těchto faktorů projevil vliv ročníku a vliv odrůdy. Na stanovišti s vyšší nadmořskou výškou byl zaznamenán nárůst výnosu hlíz i výnosu dusíkatých látek, ale zároveň pokles relativního obsahu dusíkatých látek v sušině hlíz. Přestože nejvyšší zastoupení dusíkatých látek bylo zaznamenáno v průběhu hodnocených ročníků u odrůd Tomensa (8,95 % sušiny) a Ornella (8,94 % sušiny); výnos dusíkatých látek z jednotky plochy byl hodnocen jako nejvyšší u odrůd Kuras (915 kg.ha⁻¹) a Westamyl (898 kg.ha⁻¹).

Tabulka 13: Výnos hlíz a dusíkatých látek z jednotky plochy v závislosti na ročníku, stanovišti, odrůdě a množství aplikovaného dusíku (převzato a upraveno dle Bártová et al., 2009).

Sledovaný parametr	Výnos hlíz (t.ha ⁻¹)	Obsah sušiny (%)	Obsah dusíkatých látek (% sušiny)	Výnos dusíkatých látek (kg.ha ⁻¹)
Ročník				
2004	32,52 ^a	28,32 ^a	8,09 ^a	727 ^a
2005	49,82 ^b	25,54 ^b	7,84 ^a	979 ^b
Stanoviště				
Č. Budějovice	34,70 ^a	27,16 ^b	8,17 ^b	746 ^a
Volyně	39,15 ^b	25,61 ^a	8,27 ^b	818 ^a
Lukavec	49,69 ^c	27,18 ^b	7,45 ^a	995 ^b
Odrůda				
Tomensa	34,44 ^a	26,86 ^{bc}	8,95 ^c	829 ^b
Rebel	37,73 ^a	26,12 ^{ab}	8,66 ^c	841 ^{bc}
Westamyl	41,33 ^{ab}	28,08 ^{cd}	7,83 ^b	898 ^{cd}
Ornella	39,61 ^{ab}	25,09 ^a	8,94 ^c	868 ^c
Amylon	38,22 ^{ab}	28,91 ^c	6,84 ^a	755 ^a
Kuras	51,13 ^c	25,85 ^{ab}	7,06 ^{ab}	915 ^d
Sibu	46,15 ^{bc}	25,63 ^{ab}	7,47 ^{ab}	866 ^c
Výživa				
100 N	40,86 ^a	26,92 ^a	7,51 ^a	796 ^a
200 N	41,58 ^a	26,38 ^a	8,42 ^b	909 ^b
Průměr	41,22	26,55	7,96	853

Pozn.: odlišná písmena značí statisticky průkazný rozdíl mezi hodnotami na hladině významnosti $P < 0,05$ (Tukey HSD test)

U výnosu hlíz, obsahu dusíkatých látek i výnosu dusíkatých látek se i v tomto pokusu projevila odlišná reakce odrůd na sledované faktory pokusu, jak také naznačuje tabulka 14. Zde uvedená data představují průměrné hodnoty obsahu dusíkatých látek a bílkovin během období 2004 - 2006 v rámci odrůd zařazených do pokusu a byla prezentována v pracích Bárta & Bártová (2007) a Bárta et al. (2012c). Zvýšená dávka N hnojení zvyšovala u všech odrůd zařazených do pokusu obsah dusíkatých látek i obsah bílkovin, avšak obsah dusíkatých látek byl zvyšován progresivněji, což se projevilo na parametru zastoupení bílkovin v obsahu dusíkatých látek. Zde byla vyšší hodnota zaznamenána u aplikace 200 kg N ha⁻¹ pouze v případě odrůdy Tomensa a nižší dávka N hnojení tak vytvářela příznivější podmínky pro formování kvality bílkovin. Vyšší dávka aplikovaného dusíku zvyšovala především nežádoucí zastoupení volných aminokyselin (Bárta & Bártová, 2007) v neprospěch zastoupení nutričně zlepšující frakce, jak vyplývá i z tabulky 15, kde jsou hodnoceny změny v zastoupení patatinu v celkovém obsahu hlízových bílkovin. Vyšší relativní abundance patatinu byla ve většině případů dosažena při aplikaci nižší dávky N hnojení. Velmi výrazný byl tento trend na stanovišti Lukavec, kde příznivé klimatické podmínky v kombinaci s vyšším přísunem dusíkatého hnojení zapříčinily nárůst výnosu i velikosti hlíz a „ředící“ efekt se projevil v nižším zastoupení patatinové frakce hlízových bílkovin. Z pohledu kvality bílkovin, ve smyslu zastoupení nutričně zlepšující patatinové frakce, je tedy výhodnější snížená dávka N hnojení. Přesto je nutné poznamenat, že vyššího výnosu bílkovin z jednotky plochy bylo dosaženo při zvýšené dostupnosti dusíku v půdě.

Tabulka 14: Vliv rozdílné dávky aplikovaného dusíku na sledované obsahové parametry dusíkatých látek a bílkovin v rámci souboru hodnocených odrůd určených pro zpracování na škrob (převzato a upraveno dle Bárta & Bártová, 2007).

Sledovaný parametr	Obsah N látek (% sušiny)		Obsah bílkovin (% sušiny)		Zastoupení bílkovin v obsahu N látek (%)		Výnos bílkovin (kg.ha ⁻¹)	
	100	200	100	200	100	200	100	200
Tomensa	8,54	9,56	5,73	6,70	67,8	70,3	536	650
Rebel	8,09	9,33	5,41	6,03	67,2	65,0	505	603
Westamyl	7,51	8,46	5,11	5,54	68,5	65,8	573	663
Ornella	8,20	9,43	4,92	5,64	60,8	60,2	460	550
Amylon	6,41	7,50	4,35	4,98	68,0	55,5	486	522
Kuras	6,59	7,38	4,29	4,68	65,8	63,9	546	591
Sibu	7,10	7,97	4,79	5,07	67,9	63,9	549	551
průměr	7,49	8,52	4,94	5,52	66,57	63,51	522	590

Tabulka 15: Relativní abundance (%) patatinu v bílkovinách hlíz v závislosti na odrůdě, stanovišti a odlišné dávce dusíku (převzato a upraveno dle z Bárta & Bártová, 2007).

Stanoviště	České Budějovice (380 m n. m.)		Volyně (460 m n. m.)		Lukavec (620 m n. m.)		
	Dávka N (kg.ha ⁻¹)	100	200	100	200	100	200
Tomensa		27,0	23,7	31,2	30,1	28,3	26,9
Rebel		24,1	26,7	28,0	24,4	25,7	20,5
Westamyl		25,8	25,7	29,0	29,3	26,7	24,0
Ornella		26,3	25,2	26,6	23,5	19,7	19,3
Amylon		23,2	19,3	22,5	20,3	19,9	18,5
Kuras		20,0	21,8	19,1	18,8	15,4	13,3
Sibu		23,2	22,1	22,7	20,8	18,3	17,0
průměr		24,2	23,5	25,5	23,9	22,0	19,9

Tabulka 16: Vztahy mezi produkčními parametry brambor pro výrobu škrobu a bílkovin s charakteristikami produkčního stanoviště (převzato a upraveno dle Bárta et al., 2012c).

parametr	nadmořská výška	suma průměrných denních teplot vzduchu ¹	úhrn srážek ¹	trvání slunečního svitu ¹
výnos hlíz	0,407 ***	-0,441 ***	0,400 ***	0,001
škrobnatost	0,317 ***	-0,112	-0,689 ***	0,504 ***
obsah bílkovin	0,077	0,127	0,225 *	-0,054
výnos škrobu	0,632 ***	-0,524 ***	0,226 ***	0,284 **
výnos bílkovin	0,557 ***	-0,380 ***	0,445 ***	0,128

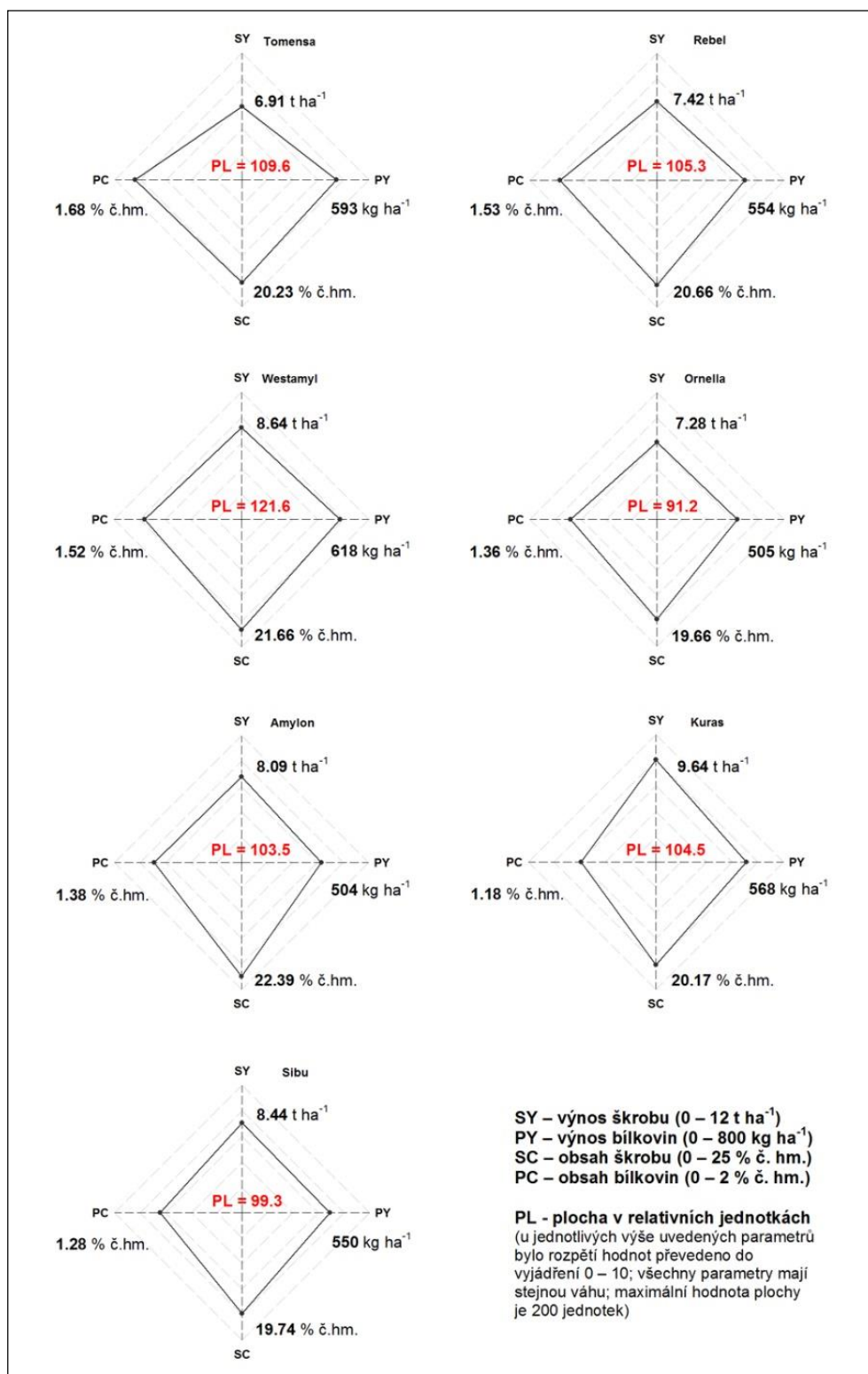
Pozn.: Statisticky průkazné na hladině významnosti: * P < 0,05; ** P < 0,01; ***P < 0,001; ¹za období výsadba – sklizeň; tučně jsou vyznačeny korelace s hodnotou r vyšší než ± 0,500

V tabulce 16 jsou naznačené vztahy mezi vybranými faktory stanoviště a sledovanými parametry obsahových látek hlíz. Stanoviště s vyšší nadmořskou výškou bylo vyhodnoceno jako vhodnější k produkci hlíz pro souběžné zpracování škrobu a bílkovin – u obou parametrů byla zjištěna pozitivní korelace, a to i přesto že z pohledu obsahu bílkovin i škrobu se jako příznivější jevila stanoviště s nižší nadmořskou výškou, která poskytovala předpoklad nižšího výnosu hlíz a tedy i nižšího „ředícího“ efektu obsahových látek. Výnosové charakteristiky (výnos hlíz, výnos bílkovin, výnos škrobu) byly též pozitivně ovlivněny úhrnem srážek, ale negativně ovlivněny sumou průměrných denních teplot. Trvání slunečního svitu jako faktor ovlivňující fotosyntetickou aktivitu rostliny se logicky projevil zejména v případě škrobnatosti hlíz. Škrobnatost hlíz byla pravděpodobně i z tohoto důvodu majoritně ovlivněna ročníkem (38% podíl na variabilitě faktoru), zatímco podíl N hnojení měl na škrobnatost minimální efekt. Naopak výnos škrobu byl majoritně ovlivněn stanovištěm (43% podíl na variabilitě faktoru) (Bárta et al., 2012c). Z dat uvedených v citované práci vyplynulo, že v případě škrobnatosti nebyl zjištěn zásadní rozdíl mezi odrůdami dle délky vegetační doby až na odrůdu Amylon, která vykazovala stabilně nejvyšší škrobnatost. Výnos škrobu byl determinován především odrůdovým potenciálem výnosu hlíz.

Hodnocení vhodnosti sledovaných odrůd pro souběžnou produkci škrobu a bílkovin vedlo ke konstrukci paprskových grafů, které umožňují souhrné hodnocení zvolených parametrů na základě plochy obrazce dle úrovně hodnocených parametrů. Na obrázku 7 je v rámci těchto paprskových grafů hodnocen výnos škrobu, výnos bílkovin, obsah škrobu a obsah bílkovin v čerstvé hmotě hlíz u souboru hodnocených odrůd. Všem hodnoceným parametrům byla při konstrukci paprskových grafů dána stejná váha parametru. Uvedený model vyhodnotil odrůdu Westamyl (plocha v relativních jednotkách 121,6) jako nejvýhodnější pro souběžné zpracování hlíz na škrob a bílkoviny.

Publikace autorského kolektivu zabývající se vyhodnocením dopadu agro-ekologických faktorů na obsahové charakteristiky bílkovin a škrobu (publikace Bárta et al., 2012c; Bártová et al., 2009) byly využity v publikacích dalších autorů v oblastech týkajících se zejména sledováním agronomických dopadů na kvalitativní strukturu obsahových látek hlíz (např. Leonel et al., 2017; Lombardo et al., 2017; Wierzbowska et al., 2015).

Obrázek 7: Model hodnocení odrůd pro souběžné zpracování brambor na škrob a bílkoviny (převzato a upraveno dle Bárta et al., 2012c).



5.4. Komentář publikovaných výsledků k třetímu okruhu habilitační práce

5.4.1. Izolace hlízových bílkovin a hodnocení biochemických vlastností bílkovinných izolátů

- I) Bárta J., Heřmanová V., Diviš J. (2008): Effect of low-molecular additives on precipitation of potato fruit juice proteins under different temperature regimes. *Journal of Food Process Engineering* 31: 533-547.
- II) Bártová V., Bárta J. (2009): Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol and ferric chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9028-9034.

První z uvedených publikací (Bárta et al., 2008) si kladla za cíl zmapovat využití různých typů srážecích činidel pro nativní izolaci bílkovin z hlízové vody a potenciální průmyslové využití tohoto izolačního postupu k získání hlízových bílkovin se zachovanými funkčními vlastnostmi. Srážení bílkovin pomocí kyselin, organických rozpouštědel či anorganických solí bylo naznačeno ve starších publikacích (Knorr, 1982; Koningveld et al., 2001), ale tyto publikace neuváděly hodnocení vlivu teploty na modifikaci funkčních vlastností izolátů a bez hodnocení vlivu izolačního procesu na majoritní, patatinovou složku izolovaných bílkovin.

Testovány byly tři skupiny srážecích činidel (organické a anorganické kyseliny, organická činidla a soli kovů), a to ve dvou teplotních režimech (0 a 22°C). Obrázek 8 znázorňuje úspěšnost izolačního procesu v závislosti na zvolených podmínkách z pohledu celkové výtěžnosti izolovaných bílkovin (vyjádřeno jako podíl z bílkovin, které bylo možné z hlízové šťávy vysrážet pomocí trichloroctové kyseliny), ale též zpětně rozpustného podílu bílkovin, u kterého lze předpokládat nativní stav a tedy i zachování zájmových funkčních vlastností. Z uvedených dat vyplývá odlišná výtěžnost procesu izolace bílkovin i jejich zpětná rozpustnost v závislosti na použitém srážecím činidlu a teplotním režimu, a to následujícím způsobem.

Při použití kyselin byla výtěžnost procesu vyšší při teplotě 22°C a pohybovala se v rozmezí od 41,5 (H₂SO₄) do 54,5 % (octová k.). Z pohledu zpětné rozpustnosti byl výhodnější teplotní režim 0°C (rozdíl mezi teplotními režimy nebyl statisticky průkazný) a izoláty získané pomocí kyselin byly hodnoceny jako produkty s velmi nízkou hodnotou zachované zpětné rozpustnosti – např. izolát získaný s využitím octové k. byl téměř nerozpustný (0,3 % rozpustného podílu).

Použití organických činidel bylo zcela jednoznačně úspěšnější v teplotním režimu 0°C a rozdíly v množství izolovaných bílkovin mezi teplotními režimy byly statisticky průkazné. Při nízké teplotě bylo dosaženo výtěžnosti od 25,06 (aceton) do 64,52 % (2-propanol). Z pohledu zpětné rozpustnosti bylo nejvýhodnější užití etanolu a metanolu jako srážecích činidel při teplotě 0°C. V případě zpětné rozpustnosti se také nejvíce projevil u organických činidel vliv teploty (dle statistické analýzy až 69% podílu na variabilitě výsledku). Izoláty získané při vyšší teplotě (22°C) byly téměř nerozpustné. V tomto případě bylo dosaženo maximální rozpustnosti (8,2 %) v případě metanolu.

Poslední testovanou skupinou byly tři typy **solí kovů**. U této skupiny se na základě analýzy variace komponent jako primární jevil vliv činidla (98 % z hlediska výtěžnosti; 97 % z pohledu zpětné rozpustnosti), zatímco vliv teploty byl u obou hodnocených parametrů minimální. Rozpětí výtěžnosti se pohybovalo od 86,4 (FeCl₃, 0°C) do 25,8 % (ZnCl₂, 0°C) a v porovnání

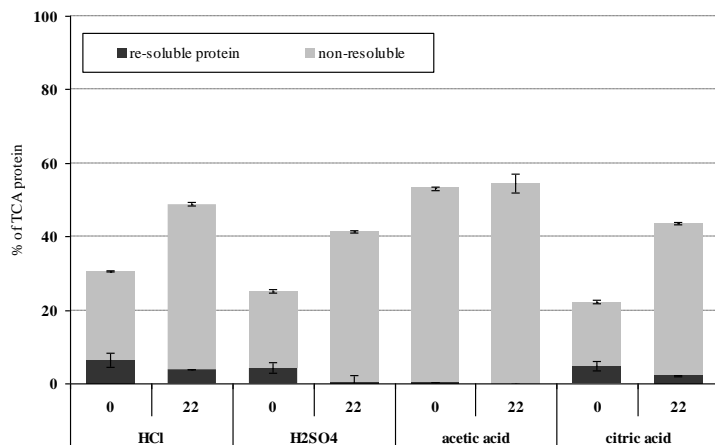
s předchozími skupinami činidel bylo dosaženo při použití FeCl_3 nejvyšší míry výtěžnosti hlízových bílkovin se zachováním vysoké hodnoty zpětné rozpustnosti.

Vzhledem k nezastupitelnému podílu jednotlivých frakcí hlízových bílkovin na funkční vlastnosti bílkovinných izolátů, byla v rámci publikace Bárta et al. (2008) provedena také analýza rozpustné části izolovaných bílkovin v systému SDS-PAGE s následným vyhodnocením zastoupení klíčových frakcí. Pozornost byla věnována zejména patatinové frakci vzhledem k jejímu podílu na nutričních a funkčních vlastnostech hlízových bílkovin. V původní hlízové šťávě patatin představoval 38 % a inhibitory proteas kolem 40 % z množství detekovaných bílkovin. Z obrazového záznamu analýzy i uvedeného výpočtu zastoupení frakcí vyplývá optimální zachování rozpustnosti patatinu při použití organických činidel za nízkých teplot, zejména pak etanolu a při použití FeCl_3 jako srážecího činidla. V případě posledně jmenovaného činidla byla optimální rozpustnost a tedy i pravděpodobné zachování funkčních vlastností zaznamenána i v případě izolace v režimu 22°C , zatímco v případě ostatních činidel tato teplota vedla k denuraci patatinu, ztrátě jeho rozpustnosti a využitelnosti jeho funkčních vlastností.

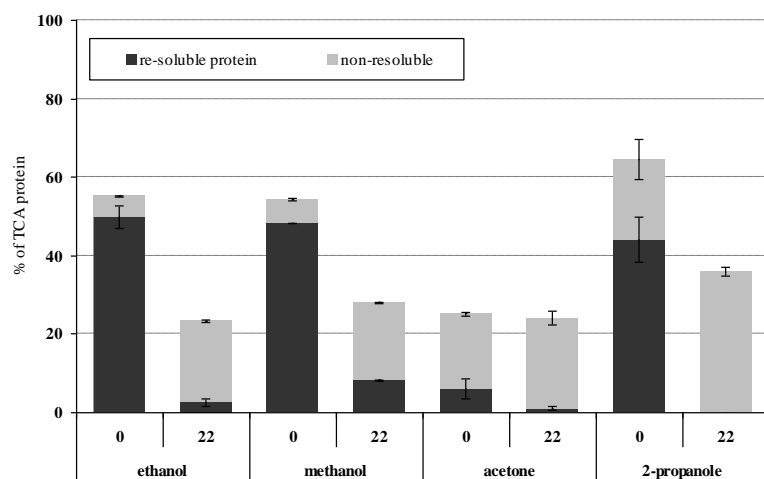
Na základě uvedených výsledků byla činidla etanol a FeCl_3 vyhodnocena jako nejvhodnější pro dosažení optimální výtěžnosti izolačního procesu se zachováním rozpustnosti a funkčních vlastností majoritní patatinové frakce bílkovin. Z tohoto důvodu byla v navazující publikaci Bártová & Bárta (2009) detailněji hodnocena tato dvě činidla.

Obrázek 8: Podíl rozpustné a nerozpustné části vysrážených bílkovin v závislosti na činidle a teplotním režimu, které byly použity pro srážení bílkovin (převzato a upraveno dle Bárta et al., 2008).

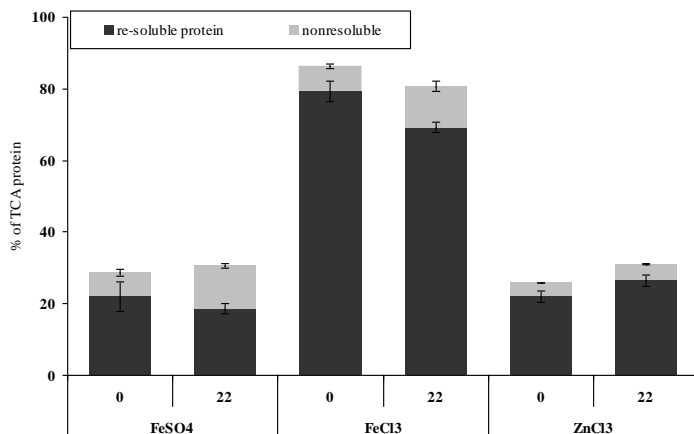
A) Vliv anorganických a organických kyselin



B) Vliv organických rozpouštědel

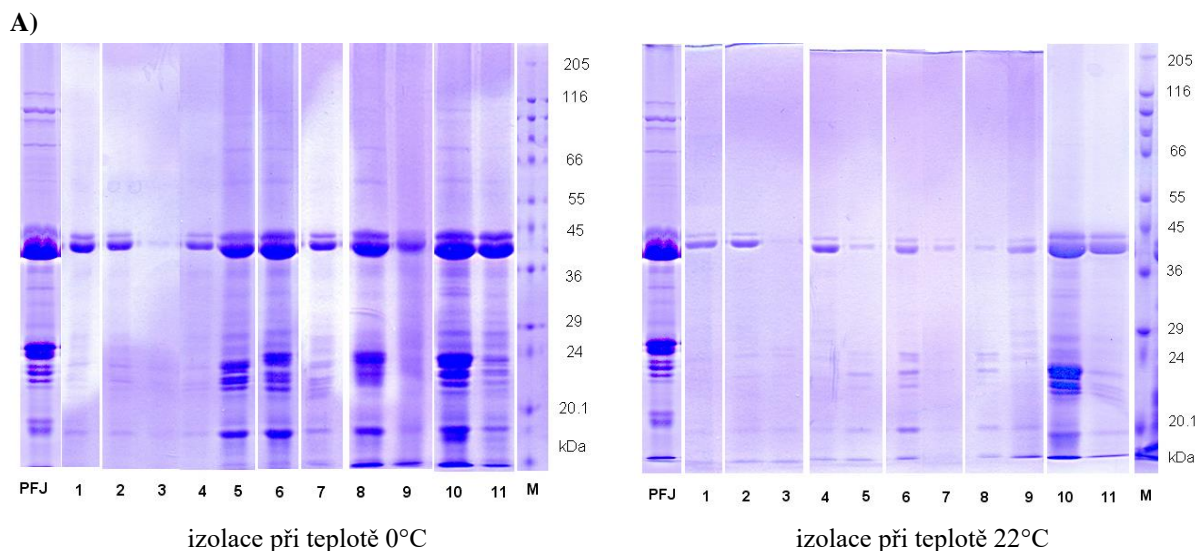


C) Vliv kovů solí



Pozn.: úsečky znázorňují směrodatnou odchylku

Obrázek 9: SDS-PAGE analýza rozpustného podílu bílkovin vysrážených z hlízové šťávy v závislosti na teplotě a použitém činidlu (A) a odhad procentického zastoupení jednotlivých velikostních frakcí izolovaných bílkovin (B) (převzato a upraveno dle Bárta et al., 2008).



Pozn.: legenda číselného označení vzorků na SDS-PAGE gelech je uvedena v tabulce B

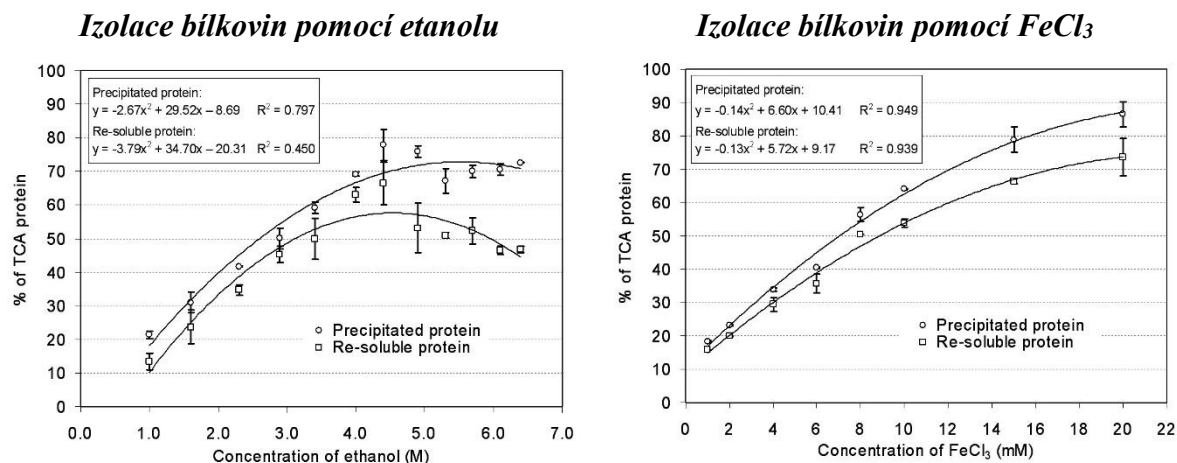
B)

činidlo	kód	pH	% zastoupení bílkovinných frakcí (kDa) při 0°C				% zastoupení bílkovinných frakcí (kDa) při 0°C kDa			
			40-43	21-25	14-20	0-14	40-43	21-25	14-20	0-14
<i>Hlízová šťáva</i>	<i>PFJ</i>		38,0	36,2	4,6	4,8	38,0	36,2	4,6	4,8
HCl	1	3,5	74,4	13,9	0,0	10,2	63,1	19,9	6,6	10,4
H ₂ SO ₄	2		54,9	34,3	0,0	8,1	65,6	14,8	8,8	10,9
acetic acid	3		-	-	-	-	-	-	-	-
citric acid	4		61,2	24,4	0,0	5,5	60,6	13,2	8,0	7,9
methanol	5	5,0	34,5	40,2	2,6	12,8	18,3	39,7	20,3	17,5
ethanol	6		37,9	35,6	2,8	13,0	27,4	40,4	19,6	12,6
acetone	7		42,4	23,7	6,1	26,4	31,2	41,3	12,9	14,6
2-propanol	8		31,1	39,3	4,5	18,7	23,8	46,1	17,5	12,7
ZnCl ₂	9		34,4	39,0	11,1	11,7	26,5	46,1	12,1	6,3
FeCl ₃	10		44,1	22,7	8,2	10,3	45,9	29,3	7,7	10,0
FeSO ₄	11		45,1	19,2	5,7	10,9	34,5	7,1	28,0	18,7

Postupné sycení roztoku hlízové šťávy etanolem lineárně zvyšovalo výtěžnost izolovaných bílkovin (Obrázek 10). Tento trend byl zaznamenná v rozmezí koncentrace 1 – 4 M etanolu v hlízové šťávě a křivka zpětné rozpustnosti svým průběhem křivku výtěžnosti kopírovala. Při vyšší koncentraci etanolu byl zaznamenán pokles výtěžnosti i zpětné rozpustnosti izolovaných bílkovin. Optimální koncentrace etanolu v roztoku hlízové šťávy byla z pohledu obou parametrů vyhodnocena v rozmezí 4,0 až 4,4 M. Avšak i při této optimální koncentraci v roztoku zůstalo nevysrážených přibližně 22 % bílkovin, což je výrazně více než uvádí Koningsveld et al. (2001), kteří ale ve své práci používali imitaci hlízové šťávy získané z hlíz odrůdy Elkana. V případě použití reálné, průmyslově produkované hlízové šťávy lze předpokládat odlišné zastoupení bílkovinných frakcí a jejich částečnou denaturaci, což ve výsledku zřejmě ovlivnilo i výsledek izolačního procesu.

Křivka izolace hlízových bílkovin s využitím FeCl_3 měla průběh bez dosažení bodu s výrazným poklesem výtěžnosti a zpětné rozpustnosti izolovaných bílkovin. Za optimální koncentraci FeCl_3 z pohledu množství izolovaných bílkovin a jejich rozpustnosti byla z tohoto důvodu vyhodnocena saturace hlízové šťávy na úrovni 20mM FeCl_3 , tedy koncentraci srážecího činidla, při níž bylo dosaženo až 86,5 % výtěžnosti bílkovin původně přítomných v hlízové šťávě.

Obrázek 10: Vliv rostoucí koncentrace etanolu nebo FeCl_3 na celkovou výtěžnost bílkovin izolovaných z hlízové šťávy a jejich zpětnou rozpustnost (převzato a upraveno dle Bártová & Bárta 2009).



Optimalizovaná koncentrace izolačních činidel v PFJ byla následně použita pro přípravu bílkovinných koncentrátů. U takto získaných koncentrátů bylo hodnoceno zastoupení bílkovin, kvantifikováno zastoupení jednotlivých bílkovinných frakcí, byla hodnocena přítomnost balastních a rizikových látek, a v neposlední řadě bylo také hodnoceno aminokyselinové složení izolovaných bílkovin a LAH aktivita patatinové frakce koncentrátů. Sledované charakteristiky jsou uvedeny v tabulkách 17 a 18.

Obsah bílkovin (vyjádřeno jako obsah N x 6,25) se v případě bílkovinných koncentrátů pohyboval od 69,4 do 84,9 % (Tabulka 17). Nízký reaktivní obsah dusíkatých látek v koncentráту vzniklém pomocí FeCl_3 lze přisuzovat obsahu Fe^{3+} iontů měnící relativní zastoupení ostatních komponent. Obsah glykoalkaloidů v sušině bílkovinných koncentrátů byl v případě srážení bílkovin etanolem a FeCl_3 na přibližně srovnatelné úrovni, zatímco v případě tepelné izolace byl tento obsah srovnatelný s původním obsahem glykoalkaloidů v hlízové šťávě, což podporuje předpoklad o vazbě glykoalkaloidů na bílkovinné struktury v průběhu srážení při vysokých teplotách. Obsah 1500 - 2500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ steroidních glykoalkaloidů v sušině koncentrátů hlízových bílkovin jsou běžně uváděnou hodnotou (Refstiea & Tiekstra, 2003). Obsah steroidních glykoalkaloidů je klíčový z hlediska kvality a využitelnosti izolovaných bílkovin (Friedman, 2006; Refstiea & Tiekstra, 2003). Snížení obsahu glykoalkaloidů ve výsledném produktu lze dosáhnout sledováním jejich obsahu v hlízách brambor či úpravou izolačního postupu – testovány byly techniky extrakce glykoalkaloidů s využitím pH gradientu (Backleh et al., 2004), zavedení promývacích kroků extrakčními činidly při teplotě až 80°C (Hossain et al., 2015), enzymová degradace glykoalkaloidů či adsorbce glykoalkaloidních látek na hydrofilní média (Bohlscheid et al., 2018). Uvedené metody, ale při jejich aplikaci vedou

k degradaci bílkovinné složky a nejlepších výsledků z hlediska obsahu glykoalkaloidů při zachování funkčních vlastností hlízových bílkovin bylo dosaženo při použití chromatografických metod izolace bílkovin (Løkra et al., 2008).

Tabulka 17: Hodnocené charakteristiky koncentrátů hlízových bílkovin získaných s využitím rozdílných izolačních postupů bílkovin (převzato a upraveno dle Bártová & Bárta 2009).

Typ bílkovinného izolátu	Obsah dusíkatých látek (% sušiny)	Obsah glykoalkaloidů (mg.kg ⁻¹)	Patatin 39-43 kDa (%)	Inhibitory proteas 25-4 kDa (%)	Aktivita lipidacylhydrolasy $\mu\text{mol (min.mg)}^{-1}$
Hlízová šťáva	45,5 ^b	1747 ^a	30,7 ^a	52,7 ^b	0,03 ^b
Srážení teplem	84,9 ^a	1612 ^a	32,3 ^a	39,5 ^c	0,01 ^b
Srážení etanolem	82,9 ^a	1016 ^c	25,6 ^b	50,9 ^b	0,07 ^b
Srážení FeCl ₃	69,4 ^{ab}	1196 ^b	20,3 ^c	58,5 ^a	0,03 ^b

Pozn.: odlišná písmena značí statisticky průkazný rozdíl mezi hodnotami na hladině významnosti $P < 0,05$ (Tukey HSD test)

Hodnota relativní abundance patatinu byla detekována na nejnižší úrovni v případě bílkovinného koncentrátu připraveného pomocí FeCl₃ (20,3 %) vyšší pak bylo v tomto koncentrátu zastoupení inhibitorů proteas (58,5 %). U bílkovinného koncentrátu získaného pomocí etanolu bylo zastoupení patatinu 25,6 % a zastoupení inhibitorů proteas 50,9 %. Odlišná strukturní stabilita vůči teplotám se projevila v zastoupení sledovaných frakcí v bílkovinném koncentrátu, který byl získán působením vysokých teplot – zastoupení patatinu je srovnatelné s jeho zastoupením v hlízové šťávě, ale frakce inhibitorů proteas, která je strukturně stabilnější při vyšších teplotách (Bártová et al., 2018; Pouvreau et al., 2005a; 2005b) byla vysrážena jen z části. Variabilita zastoupení uvedených bílkovinných frakcí u jednotlivých bílkovinných koncentrátů se následně projevila i ve variabilitě jejich nutriční hodnoty (Tabulka 18). V diskutované publikaci Bártová & Bárta (2009) byla poprvé prezentována nutriční hodnota patatinu, který byl purifikován z průmyslové PFJ. Hodnota EAAI patatinu byla stanovena na úrovni 86,1 % při srovnání s nutriční hodnotou celovaječné bílkoviny, což jasně prokazuje, že patatin představuje nutričně zlepšující frakci hlízových bílkovin. Bílkovinný koncentrát vzniklý tepelným srážením s nejvyšším relativním zastoupením patatinu, dosáhl tedy i nejvyšší hodnoty EAAI (83,3 % celovaječné bílkoviny). Uvedená data opět dokumentují význam sledování zastoupení patatinových bílkovin ve vstupní surovině, tedy v hlízách, neboť jejich obsah je klíčový i pro výslednou nutriční kvalitu produkovaných koncentrátů hlízových bílkovin. Patatin purifikovaný z hlízové šťávy vykazoval aktivitu lipidacylhydrolasy vůči *p*-nitrofenylbutyrátu na úrovni 0,50 $\mu\text{mol (min.mg)}^{-1}$. V případě bílkovinných koncentrátů byla tato aktivita pochopitelně nižší; nejvyšší míra zachování enzymové aktivity byla zaznamenána u bílkovinného koncentrátu vzniklého pomocí srážení bílkovin podchlazeným etanolem. Tento typ izolace představuje potenciál pro izolaci nativních bílkovin se zachováním jejich funkčních vlastností i s ohledem na snadné odstranění srážecího činidla, což se v případě použití FeCl₃ ukázalo jako velmi problémové. Nižší aktivita patatinu u vzorku, který byl izolován pomocí FeCl₃, je spíše než denurací patatinu (SDS-PAGE analýza rozpustného podílu toto nenaznačuje) dána nižším relativním zastoupením patatinové frakce (Tabulka 17) z důvodu obsahu Fe³⁺ iontů v sušině koncentrátu.

Tabulka 18: Variabilita nutriční kvality izolovaných bílkovin dle odlišného způsobu jejich získání (převzato a upraveno dle Bártová & Bárta 2009).

Nutriční charakteristika	Hlízová šťáva	Srážení teplem	Srážení etanolem	Srážení FeCl ₃	Patatin
Průměrná hodnota AAS (%)	79,5	93,8	93,9	94,4	111,2
AAS hodnota limitující aminokyseliny (%)	37,7	45,5	45,9	45,2	34,0
	cystein	cystein	cystein	cystein	cystein
	methionin	methionin	methionin	methionin	methionin
EAAI (%)	70,6	83,3	81,7	82,7	86,1

Pozn.: AAS (%) – aminokyselinové skóre (*Amino Acid Score*); EAAI (%) – index esenciálních aminokyselin (*Essential Amino Acid Index*); hodnoty AAS (%) a EAAI (%) jsou vztaženy k aminokyselinovému složení celovaječné bílkovin dle Martínez-Villaluenga et al. (2008).

Komentované práce Bárta et al. (2008) a Bártová & Bárta (2009) prezentovaly soubor dat, byly do současnosti citovány v 35 pracích dalších autorů. Tyto navazující práce se zabývaly možnostmi izolace hlízových bílkovin se zachováním jejich funkčních vlastností (např. Kong et al. 2015; Schmidt et al., 2018; Waglay & Karboune, 2017; Zhang et al., 2017), problematikou glykoalkaloidů v koncentrátech hlízových bílkovin (Laus et al., 2017), či problematikou funkčních vlastností hlízových bílkovin, jejich individuálních frakcí a postupů optimalizace využití funkčních vlastností bílkovin (např. Bártová et al., 2018; Glusac et al., 2017; Klaassen et al., 2019; Sun et al., 2013).

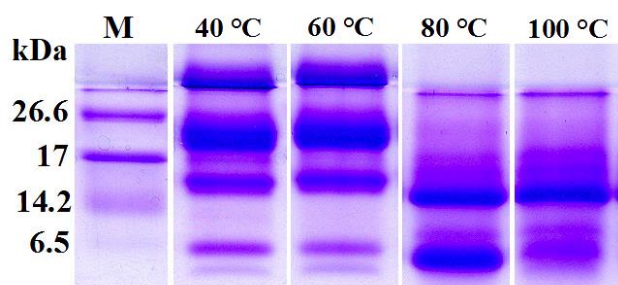
5.4.2. Antifungální vlastnosti bílkovinných frakcí hlíz bramboru

- III) **Bártová V.**, Bárta J., Vlačihová A., Šedo O., Zdráhal Z., Konečná H., Stupková A., Švajner J. (2018): Proteomic characterization and antifungal activity of potato tuber proteins isolated from starch production waste under different temperatures regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 10551-10560.
- IV) **Bártová V.**, Bárta J., Jarošová M. (2019): Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications: A mini-review. Under review in *Applied Microbiology and Biotechnology*

V průběhu izolace bílkovin z hlízové šťávy pomocí jejich tepelného vysrážení zůstává jako odpadní produkt tzv. deproteinovaná hlízová voda – tedy tekutý podíl hlízové šťávy bez majoritního zastoupení hlízových bílkovin. Informace řešící složení či využití tohoto sekundárního odpadu jsou omezené. V sušině deproteinované hlízové vody byl stanoven obsah 17 % dusíkatých látek (Bárta & Bártová, Studie zpracovaná v rámci řešení VHC pro VŠCHT, Praha). Škrobárna Lyckebý-Amylex a.s. nabízí v současné době deproteinovanou hlízovou vodu po jejím zakoncentrování jako organické hnojivo (osobní sdělení). Nevyřešenou otázkou je zastoupení individuálních bílkovinných frakcí v deproteinované hlízové vodě. Lze předpokládat, že i přes vysrážení majoritního podílu termolabilních bílkovin, zůstává část bílkovin nevysrážena, a tyto bílkoviny lze označit jako termostabilní.

Termostabilní bílkoviny hlíz brambor, ale i jiných rostlinných druhů, bývají nositeli zajímavých, např. antibakteriálních a antifungálních vlastností (Bártová et al., 2019) a i z tohoto důvodu byla v publikaci Bártová et al. (2018) této frakci bílkovin věnována pozornost.

Obrázek 11: Separace termostabilních frakcí hlízových bílkovin pomocí peptidové SDS-PAGE (převzato a upraveno dle Bártová et al., 2018).



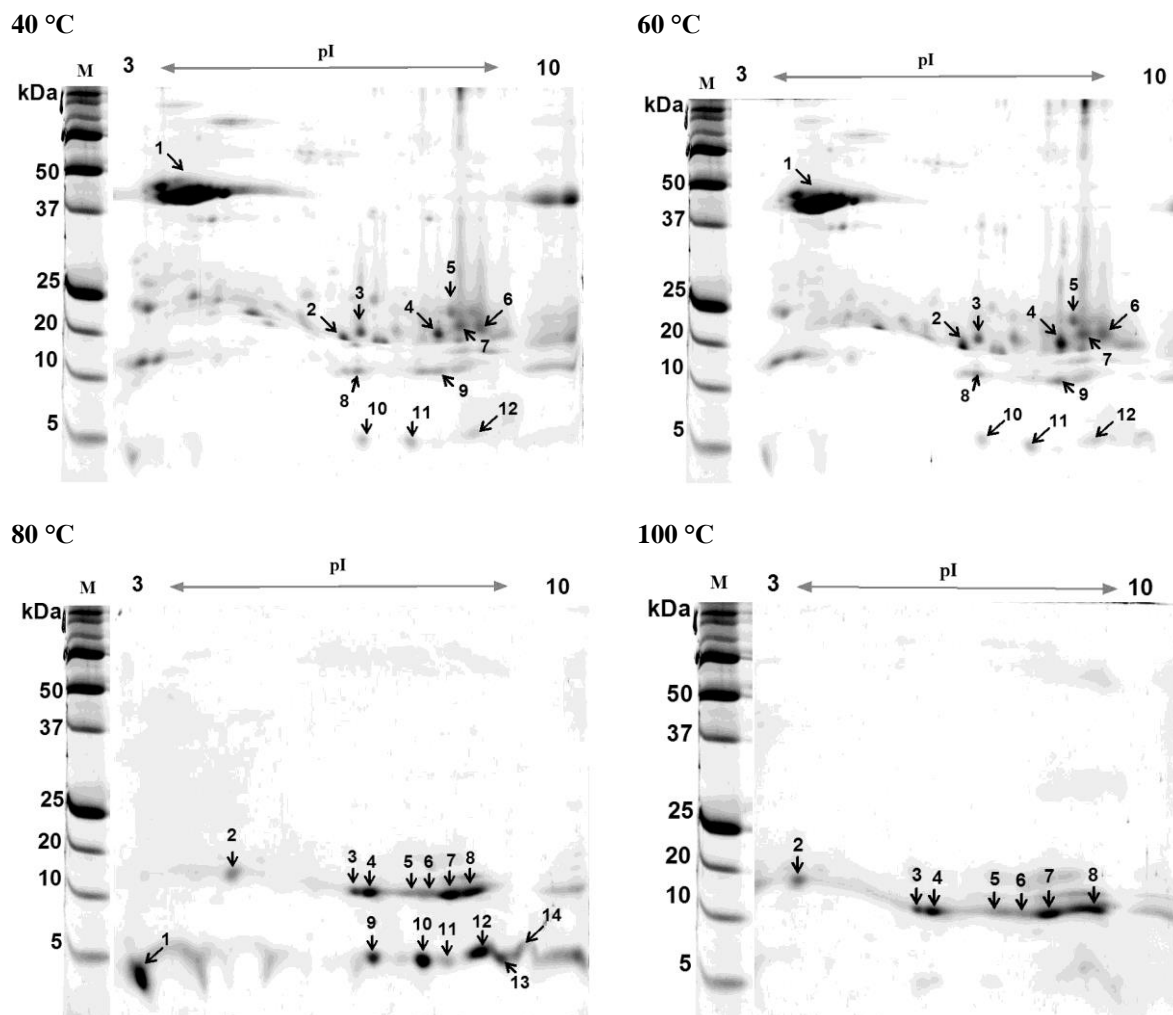
Frakce hlízových bílkovin s odlišnou termostabilitou byly izolovány z PFJ získané z provozu Lyckeby Amylex a.s.. Hlízová voda byla ošetřena teplotami 40, 60, 80 a 100 °C. Po odstranění vysráženého podílu termolabilních bílkovin byla věnována pozornost frakcím bílkovin, které zůstaly rozpustné v tekutém podílu deproteinované hlízové vody.

Obrázek 11 představuje elektroforetickou analýzu těchto bílkovinných komponent v systému peptidové SDS-PAGE. Z uvedeného záznamu je patrné odlišné složení deproteinované hlízové získané při nízkých teplotách (40 a 60 °C) oproti vzorkům deproteinované hlízové vody, které byly získány při vyšších teplotách (80 a 100 °C). Při použití nižších teplot bylo zřetelněji bohatší spektrum detekovaných bílkovin s vyšší molekulovou hmotností, zatímco bílkoviny s nižší molekulovou hmotností (pod 15 kDa) si zachovaly svou rozpustnost, a lze předpokládat, že i strukturní a funkční vlastnosti i při vyšších teplotách. Tyto detekované rozdíly ve složení frakcí hlízových bílkovin izolovaných s použitím odlišných teplot byly potvrzeny i 2D PAGE analýzou, jak je patrné z obrázku 12 a z následné identifikace detekovaných spotů – pro frakci izolovanou při 80 °C je identifikace spotů prezentována v tabulce 19. Závěry z identifikace spotů ostatních teplot jsou dostupné v publikaci Bártová et al. (2018).

Identifikací bílkovinných spotů bylo zjištěno, že izoláty vzniklé za nižších teplot (40 a 60 °C) obsahovaly termolabilní bílkovinné frakce, zatímco při izolaci za vyšších teplot došlo k eliminaci bílkovinných struktur o vyšší molekulové hmotnosti. Jednalo se o termolabilní patatinovou frakci, u které je uváděna teplotní stabilita do 49 °C (Koppelman et al., 2002; Pots, 1999). Obdobně v izolátech 80 a 100 °C chyběla frakce inhibitorů aspartátových a cysteinových proteas a došlo též k eliminaci inhibitorů proteas Kunitzova typu. Pouvreau et al. (2005a, b) uvádějí pro inhibitory cysteinových a serinových proteas narušení struktury v rozmezí teplot 60 až 66 °C. ECD data prezentovaná v publikaci Bártová et al. (2018) naznačují výrazný pokles α -helikálních struktur, tedy denaturaci bílkovin izolovaných při 80 °C, s výrazným navýšením tohoto trendu v izolátech získaných po ošetření PFJ teplotou 100 °C. Přesto právě bílkoviny přítomné v tekutém podílu hlízové vody deproteinované při 80 a 100 °C vykazovaly nejsilnější antifungální aktivitu vůči zvolené skupině patogenů, jak je patrné z obrázku 13 a 14. Hodnota IC_{50} byla v průměru 0,18 mg.ml⁻¹ u izolátů získaných při 80 °C a 0,25 mg.ml⁻¹ u izolátů vzniklých v případě 100 °C, v porovnání s hodnotami IC_{50} na úrovni 1,11 a 0,68 mg.ml⁻¹, které byly zjištěny u bílkovin izolovaných při použití teplot 40 a 60 °C (data dostupná v práci Bártová et al., 2018). Bílkoviny zachovávající si rozpustnost a antifungální aktivitu i při teplotách 80 a 100 °C byly identifikovány jako bramborové inhibitory I a II s rozsahem molekulové hmotnosti 7834 až 16649 Da, jak ukazuje tabulka 19. Bílkovinné spoty detekované ve vzorcích izolovaných při teplotě 100 °C byly identifikovány jako zástupci bramborových inhibitorů II.

Ani u jednoho z těchto vzorků, nebyly nalezeny zástupci bramborových inhibitorů proteas Kunitzova typu, inhibitory aspartátových či cysteinových proteas.

Obrázek 12: 2D PAGE termostabilních frakcí hlízových bílkovin získaných při teplotách 40, 60, 80 a 100 °C (převzato a upraveno dle Bártová et al., 2018).



Pozn.: spoty určené k následné identifikaci MALDI MS/MS analýzou jsou označeny čísly, uvedená čísla se shodují s označením analyzovaného spotu v rámci identifikace – viz tabulku 19.

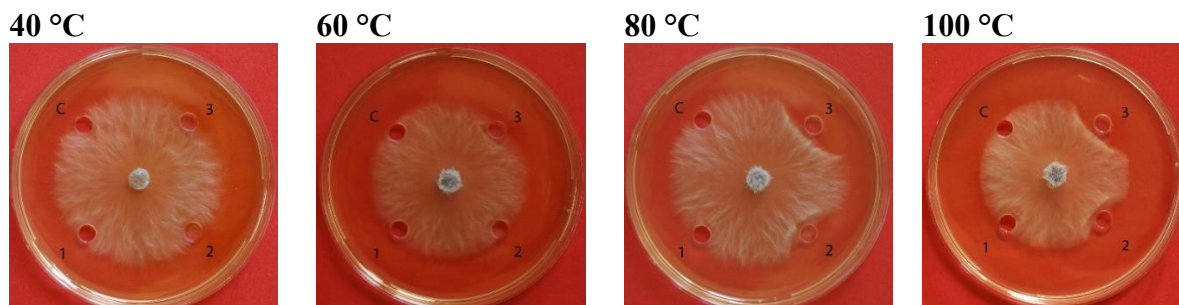
Tabulka 19: Ukázka MALDI-MS/MS identifikace bílkovinných spotů po předchozí 2D PAGE analýze termostabilní frakce izolované při 80°C (převzato a upraveno dle Bártová et al., 2018).

ID spotu	GI číslo	Název bílkoviny	Organismus	Protein identification details			
				Skóre	Počet peptidů	Pokrytí sekvence (%)	Molekulová hmotnost (Da)
Serine protease inhibitor							
1	gi 70779535	Proteinase inhibitor 1 PPI3A4	<i>S. tuberosum</i>	92	3	33	11890
2	gi 29650887	Proteinase inhibitor II protein	<i>S. phureja</i>	171	6	40	16630
3	gi 29650887	Proteinase inhibitor II protein	<i>S. phureja</i>	161	7	44	16630
4	gi 29650887	Proteinase inhibitor II protein	<i>S. phureja</i>	223	10	68	16630
5	gi 3915590	Proteinase inhibitor type-2 K	<i>S. tuberosum</i>	300	6	52	16494
6	gi 29650887	Proteinase inhibitor II protein	<i>S. phureja</i>	280	8	66	16649
7	gi 29650887	Proteinase inhibitor II protein	<i>S. phureja</i>	138	6	39	16630
8	gi 29650887	Proteinase inhibitor II protein	<i>S. phureja</i>	120	6	40	16630
10	gi 124130	Wound-induced proteinase inhibitor 1	<i>S. tuberosum</i>	96	3	38	12137
	gi 42795394	Serine protease inhibitor	<i>S. tuberosum</i>	66	2	23	7834
12	gi 3913948	Proteinase inhibitor type-2	<i>S. tuberosum</i>	105	2	13	15925

Pozn.: spot č. 9 nebyl identifikován; u spotů č. 11, 13, 14 nebyla zaznamenána signifikantní úroveň identifikace

Z pohledu antifungální aktivity byl vyhodnocen jako nejúčinnější izolát získaný působením teploty 80°C, a to vůči všem hodnoceným patogenům. Houbový patogen druhu *Fusarium solani* CCM 1036 byl vyhodnocen jako nejcitlivější vůči testovaným izolátům bílkovin. V uvedené publikaci Bártová et al. (2018) byly poprvé prezentovány informace o výjimečné funkční termostabilitě frakce bramborových inhibitorů proteas I a II a jejich antifungální aktivitě vůči skupině patogenů patřících do rodu *Fusarium*.

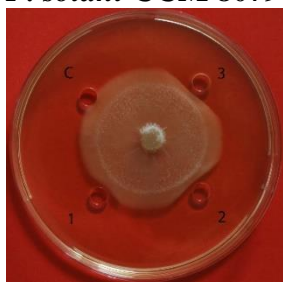
Obrázek 13: Antifungální aktivita termostabilních bílkovin izolovaných za různých teplotních režimů vůči *Fusarium solani* CCM 1036 (převzato a upraveno dle Bártová et al., 2018).



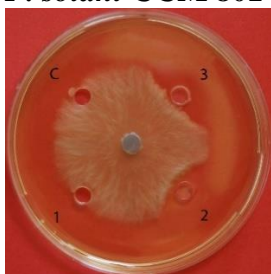
Pozn.: C-kontrola; 1-termostabilní frakce bílkovin v koncentraci 1 mg.ml⁻¹; 2- termostabilní frakce bílkovin v koncentraci 5 mg.ml⁻¹; 3- termostabilní frakce bílkovin v koncentraci 10 mg.ml⁻¹

Obrázek 14: Detekce antifungální aktivity termostabilní bílkovinné frakce získané při 80°C vůči testovanému souboru houbových patogenů rodu *Fusarium* (Bártová et al. - nepublikovaná data).

***F. solani* CCM 8079**



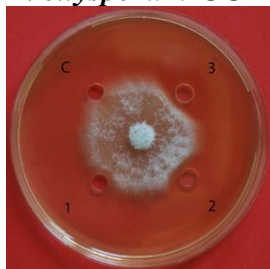
***F. solani* CCM 8014**



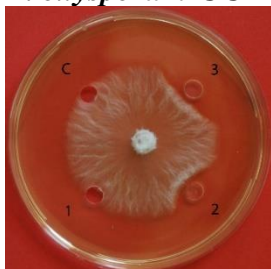
***F. solani* CCM 1036**



***F. oxysporum* CCM 17**



***F. oxysporum* CCM 65**



Pozn.: C-kontrola; 1-termostabilní frakce bílkovin v koncentraci 1 mg.ml⁻¹; 2- termostabilní frakce bílkovin v koncentraci 5 mg.ml⁻¹; 3- termostabilní frakce bílkovin v koncentraci 10 mg.ml⁻¹

Na základě dat uvedených v práci Bártová et al. (2018) v časopise *Applied Microbiology and Biotechnology* vznikl požadavek jmenovaného časopisu na předložení souhrnného přehledu, který by představil dosud publikované informace o antifungálním a antimikrobiálním působení hlízových bílkovin bramboru a možnosti využití těchto specifických látek v rámci zemědělského a potravinářského komplexu. Rukopis publikace Bártová et al. (2019), který je v tuto chvíli v oponentním řízení, představuje čtenářům hlavní skupiny hlízových bílkovin s prokázanou antifungální či antibakteriální aktivitou. Antifungální aktivita byla v rámci dosud prezentovaných výsledků zaznamenána u skupiny hlízových inhibitorů proteas, patatinových bílkovin, lektinu a specifických bílkovin o malé molekulové hmotnosti, kam jsou řazeny hlízové defensiny, thioniny a bílkoviny s označením snakin-1 a snakin-2, které jsou svou sekvencí částečně homogenní s bílkovinami hadích jedů. Jako velmi perspektivním se jeví skupina inhibitorů proteas hlíz brambor, jak naznačuje tabulka 20.

Tabulka 20: Přehled inhibitorů proteas hlíz brambor s prokázanou antifungální a antibakteriální aktivitou (převzato a upraveno dle Bártová et al., 2019).

Označení bílkoviny/peptidu	Inhibovaný organismus	Zdroj
Serinové inhibitory proteas		
směs PPI-I a PKPI	<i>Botrytis cinerea</i>	Hermosa et al. 2006
PLPKI	<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Feldman et al. 2014
termostabilní PPI-II	<i>Fusarium solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Bártová et al. 2018
Inhibitory proteas Kunitzova typu		
PKPI skupina A a B	<i>Fusarium moniliforme</i>	Heibges et al. 2003b
PKSI (PKPI skupina C)	<i>Phytophthora infestans</i>	Revina et al. 2004
	<i>Fusarium culmorum</i>	Revina et al. 2008
PSPI-21	<i>Phytophthora infestans</i>	Valueva et al. 1998
	<i>Fusarium culmorum</i>	Revina et al. 2008
PSPI-22	<i>Phytophthora infestans</i>	Valueva et al. 1998
AFP-J	<i>Candida albicans</i> , <i>Trichosporon beigelii</i>	Park et al. 2005
Potide-G	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganense</i> <i>Candida albicans</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Kim et al. 2006 Tripathi et al. 2006
PT-1	aktivita vůči bramborovému viru Y <i>Candida albicans</i> <i>Rhizoctonia solani</i>	Kim et al. 2005
PG-2	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganense</i> <i>Candida albicans</i> (izolát humánního patogenu) <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganense</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Kim et al. 2013
Karboxapeptidázový inhibitor		
PCI	<i>Magnaporthe oryzae</i> <i>Fusarium verticillioides</i>	Quilis et al. 2007

PPI-I bramborový inhibitor proteas I, PPI-II bramborový inhibitor proteas II, PKPI bramborový inhibitor proteas Kunitzova typu, PLPKI bramborový inhibitor serinových proteas specifický vůči proteinase K, PKSI bramborový inhibitor proteas specifický vůči subtilisinu ze skupiny inhibitorů Kunitzova typu, PSPI-21 bramborový inhibitor serinových proteas o velikosti 21 kDa; PSPI-22 bramborový inhibitor serinových proteas o velikosti 22 kDa; AFP-J antifungální bílkovina ze skupiny inhibitorů proteas izolovaná z hlíz cv. L Jopung; PT-1 Potamin 1; PG-2 Potide G-2; PCI bramborový inhibitor carboxypeptidasy.

Ze skupiny hlízových inhibitorů proteas se jako perspektivní jeví skupina inhibitorů serinových a cysteinových proteas a mezi nimi především skupina bramborových inhibitorů proteas I (PPI-I) a skupina inhibitorů proteas Kunitzova typu (PKPI). Zvláště pak zástupci inhibitorů Kunitzova typu jsou v hlízách velice variabilní z hlediska struktury i biochemických vlastností (Bauw et al., 2006; Heibges et al., 2003a) a u zástupců této skupiny byla zjištěna aktivita vůči *Fusarium moniliforme* (Heibges et al., 2003b), *Phytophthora infestans*, *Fusarium culmorum* (Revina et al., 2008; Valueva et al., 1998), *Botrytis cinerea* (Hermosa et al., 2006). Z hlediska praktického využití jsou perspektivní bílkoviny řazené k inhibitorům proteas Kunitzova typu, které byly popsány v pracích Kim et al. (2005) a (2006) a Park et al. (2005). Jedná se o bílkoviny s označením AFP-J (Park et al. 2005) a bílkovin izolované z hlíz odrůdy Gogu Valley, jako Potide-G (Kim et al. 2006), Potamin-1 (Kim et al., 2005) a PG-2 (Kim et al. 2013). Uvedené bílkoviny jsou termostabilní a jak naznačuje tabulka 19, vykazují inhibiční aktivity i vůči

humánním patogenům, čímž se otevírají možnosti jejich využití nejen v zemědělském sektoru, ale i v potravinářských či farmaceutických aplikacích. Využití této skupiny bílkovin je dobře dokumentováno v publikacích Jin et al. (2009) a Ohh et al. (2010) – bílkovinný izolát z hlíz odrůdy Gogu Valley, který tyto specifické bílkoviny obsahoval, byl použit jako přídavek krmné směsi ve výkrmu prasat a broilerů – v obou případech byl pozorován pokles obsahu rizikových fekálních bakterií *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella gallinarum* a *Escherichia coli*, zatímco symbiotická střevní mikroflóra nebyla narušena.

Tabulka 21: Inhibice bakteriálních a houbových patogenů hlízovými bílkovinami patřící do skupiny snakinů, thioninů a defensinů (převzato a upraveno dle Berrocal-Lobo et al., 2002 a Bártová et al., 2019).

Patogenní organismus	Bílkovina (EC ₅₀) ^a		
	StSN1	StSN2 μM	StPTH1
Bacteria			
<i>Clavibacter michiganensis</i>	1	4	7
<i>Ralstonia solanacearum</i>	NA	NA	25
<i>Ralstonia solanacearum</i>	30	15	25
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	NA	NA	NA
<i>Rhizobium meliloti</i>	8	nt	NA
Fungi			
<i>Botrytis cinerea</i>	2	0.8	1
<i>Fusarium solani</i>	3	2	0.2
<i>Fusarium culmorum</i>	2	2	NA
<i>Fusarium oxysporum f. sp.</i>	10	13	nt
<i>conglutinans</i>			
<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	20	13	nt
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	10	10	10
<i>Colletotrichum graminicola</i>	10	20	2
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	10	10	nt
<i>Bipolaris maydis</i>	20	20	10
<i>Aspergillus flavus</i>	20	20	nt

^aEC₅₀ – efektivní koncentrace pro 50% inhibici; NA – neaktivní při koncentraci ≤ 20μM; nt – netestováno; StSN1 *S. tuberosum* snakin-1; StSN2 – *S. tuberosum* snakin-2

Tabulka 21 představuje antibakteriální i antifungální aktivitu hlízových bílkovin, které jsou řazeny mezi tzv. hlízové thioniny, defensiny a snakiny. Bramborový pseudothionin (StPth1) vykazuje např. aktivitu vůči závažnému patogenu *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Jedná se o bílkovinu o velikosti Mr 5 kDa tvořenou 47 aminokyselinami se schopností interagovat s buněčnými membránami patogenů (Bártová et al., 2019; Bártová et al., 2012; Berrocal-Lobo et al., 2002). Snakin-1 (6,9 kDa) a Snakin-2 (7 kDa) jsou bazické bílkoviny velmi stabilní struktury, která je tvořen 6 cystiny. Tyto bílkoviny jsou řazeny do třídy snakin/GASA bílkovin a jsou významnou součástí konstitutivní i indukované reakce rostlin na biotické stresory.

Proteiny či peptidy s antimikrobiální aktivitou mají široké možnosti uplatnění zahrnující oblasti humánní i veterinární medicíny (léčba houbových, kvasinkových a bakteriálních chorob, sterilizace materiálu), oblasti potravinářského průmyslu (např. konzervace potravin, produkce obalových materiálů nové generace) či oblasti zemědělských biotechnologií při tvorbě nových genotypů zemědělských plodin se zvýšenou rezistencí vůči klíčovým patogenům. Inhibitory proteas hlíz bramboru patří k bílkovinné frakci, u které můžeme předpokládat nejširší varianty využití pro jejich antifungální, antibakteriální i insekticidní účinky (Bártová et al., 2019; Bártová et al., 2012).

6. Závěr

Habilitační práce prezentovala způsoby řešení a výsledky publikací, které se dotýkaly třech oblastí výzkumu hlízových bílkovin brambor. Uvedené práce se zabývaly (I) odrůdovou a druhovou variabilitou biochemických vlastností patatinových bílkovin; (II) vlivem odrůdy a vybraných pěstitelských faktorů na kumulaci bílkovin a patatinové frakce v hlízách bramboru a (III) metodami izolace hlízových bílkovin z hlízové šťávy, popisem vlastností vzniklých bílkovinných koncentrátů a jejich antifungálním působením.

Ad I

V rámci hodnoceného souboru 20 odrůd kulturního druhu bramboru byl zjištěn rozsah molekulové hmotnosti detekovaných isoform patatinu od 40513 do 42988 Da. Isoforma první hmotností úrovně (~40590 Da) byla detekována u všech analyzovaných odrůd. Přítomnost druhé (~41798 Da) a třetí (~42930 Da) hmotnostní isoformy patatinu byla již odrůdově specifická. Rozdíl mezi hmotnostními úrovněmi byl přibližně 1,2 kDa, což odpovídá hmotnosti sacharidové části a byl potvrzen zásadní podíl glykosylační úrovně patatinu na variabilitě jeho hmotnostních isoform.

V rámci hodnoceného souboru bylo nalezeno 7 - 14 nábojových isoform s hodnotou isoelektrického bodu v rozsahu pH 4,45 až 5,14. Pomocí 2D PAGE analýzy bylo u patatinových vzorků nalezeno 17 až 23 spotů, což představuje komplexní variabilitu hmotnostních a nábojových isoform patatinu. Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že tato variabilita je dána glykosylační úrovní patatinových isoform, záměnami v primární sekvenci bílkovinné struktury a genotypově specifickým složením sacharidické části glykoproteinové struktury patatinu.

Vedle odrůdové variability charakteristik patatinových bílkovin byla pozornost věnována také hodnocení této variability v rámci širší skupiny příbuzných druhů rodu *Solanum* – soubor zahrnoval 5 odrůd kulturního druhu *S. tuberosum*, 4 druhy pěstované v zemi původu (zde pro zjednodušení označené jako „polokulturní“ druhy) a 19 genotypů planých druhů.

Ve skupině planých druhů byl zaznamenán nižší obsah bílkovin v sušině hlíz, ale nejvyšší obsah dusíkatých látek. Druh *S. sucrense* vykázal z hodnocených genotypů nejvyšší obsah bílkovin v sušině hlíz (9,18 %). Ve skupině planých druhů byla nalezena v průměru nejnižší hodnota relativní abundance patatinu (26,8 %) a obsahu patatinu v sušině hlíz (0,39 %). Rozsah hodnot byl ale ve skupině planých druhů rozmanitý a tato skupina je zajímavým zdrojem variability obsahových charakteristik patatinu. U druhu *S. acaule* byla zaznamenána nejvyšší hodnota obsahu patatinu (0,83 %) v rámci všech hodnocených genotypů.

Lipidacylhydrolasová (LAH) aktivita patatinu se v rámci hodnoceného souboru pohybovala od 2,67 do 22,74 $\mu\text{mol (min mg)}^{-1}$ a nejvyšší byla zjištěna ve skupině planých druhů. Výjimečně vysoká LAH aktivita, a to 22,74 $\mu\text{mol (min. mg)}^{-1}$, byla zaznamenána u druhu *S. bulbocastanum*.

V souboru genotypů byly detekovány tři hmotnostní úrovně patatinu. Nejvíce početná byla první (přítomná u 24 genotypů z 29 hodnocených) a nejméně zastoupená byla třetí hmotnostní úroveň patatinu, která např. ve skupině planých forem byla přítomná pouze u dvou druhů. Jednalo se o druhy *S. berthaultii* a *S. bulbocastanum*.

Složení sacharidové struktury patatinu bylo analyzováno u druhů *S. tuberosum* cv. Desirée, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum* a *S. andigenum*. Poprvé byla publikována data potvrzující genotypovou variabilitu struktury sacharidové části patatinu.

U stejné skupiny pěti druhů (*S. tuberosum* cv. Desirée, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum* a *S. andigenum*) byl potvrzen klíčový význam patatinu v nutriční hodnotě hlízových bílkovin. U druhu *S. goniocalyx* byla zjištěna nejvyšší hodnota indexu esenciálních aminokyselin izolovaného patatinu, a to na úrovni 112,5 %. Sirné aminokyseliny byly vyhodnoceny jako limitující u všech analyzovaných druhů.

Ad II

Hodnocením relativní abundance patatinu v rámci souboru 40 odrůd s rovnoměrným zastoupením odrůd konzumních brambor a odrůd brambor určených pro výrobu škrobu bylo zjištěno, že relativní abundance patatinu v hlízových bílkovinách ve skupině odrůd určených pro výrobu škrobu je statisticky průkazně vyšší ($P < 0,001$) než ve skupině odrůd konzumních brambor. Průměrná hodnota relativní abundance patatinu byla ve skupině odrůd určených pro výrobu škrobu 25,1 %, zatímco ve skupině odrůd konzumních brambor se jednalo o 21,6 %. Obdobně i obsah patatinu v sušině hlíz byl vyšší u odrůd určených pro výrobu škrobu. V této skupině odrůd obsah patatinu dosáhl 1,28 % sušiny, zatímco ve skupině konzumních odrůd dosáhl 1,03 %. U odrůdy Tomensa byla zjištěna nejvyšší hodnoty obsahu patatinu v sušině hlíz (2,03 %).

Kromě obsahu bílkovin a dusíkatých látek byl obsah patatinu v sušině hlíz pozitivně ovlivněn obsahem sušiny ($r = 0,318$; $P < 0,001$). Naopak byl nalezen negativní vztah ($r = -0,301$; $P < 0,001$) mezi obsahem patatinu a velikostí hlíz a nebyl potvrzen vliv délky vegetační doby na kumulaci patatinu v hlízách. Odrůda byla potvrzena jako klíčový faktor s majoritním podílem na variabilitě relativní abundance i obsahu patatinu v hlízách bramboru.

V rámci maloparcelkových pokusů byl hodnocen vliv pěstitelských faktorů a pěstitelské technologie na kumulaci dusíkatých látek, hlízových bílkovin a variabilitu obsahových charakteristik patatinu.

Dle očekávání byla v systému ekologické produkce zaznamenána nižší produkce hlíz s vyšším podílem menších hlíz. V hlízách konvenční produkce byla zaznamenána vyšší kumulace dusičnanů a celkových dusíkatých látek. Obsah bílkovin byl mírně vyšší v konvenční produkci, ale zjištěný rozdíl oproti ekologické produkci nebyl statisticky průkazný a odrůda měla na tento ukazatel významnější vliv (ve společné interakci s ročníkem až 37 %) než pěstitelská technologie. V konvenční technologii produkce hlíz byl zjištěn mírně vyšší obsah patatinu. Avšak ani u tohoto ukazatele nebyl zaznamenán statisticky průkazný vliv technologie produkce hlíz a odrůda měla opět hlavní podíl na variabilitě obsahu patatinu v sušině hlíz. U odrůdy Karin byly při komplexním vyhodnocení zaznamenány nejvyšší hodnoty hodnocených ukazatelů (obsah sušiny, obsah bílkovin, zastoupení bílkovin v obsahu dusíkatých látek, relativní abundance patatinu a obsah patatinu) při její produkci v ekologickém systému.

V druhém polním maloparcelkovém pokusu byla hodnocena reakce odrůd určených pro výrobu škrobu na výrazně odlišné dávky N hnojení (100 a 200 kg N). Průměrná hodnota obsahu dusíkatých látek byla průkazně vyšší u varianty zvýšené dávky N hnojení a nejvyšší hodnota výnosu dusíkatých látek byla zaznamenána v případě odrůdy Kuras (915 kg ha⁻¹). Zvýšená dávka N hnojení zvyšovala i obsah bílkovin, avšak tento parametr rostl pomaleji a nižší dávka N hnojení tak vytvářela příznivější podmínky pro formování kvality dusíkatých látek. Pouze odrůda Tomensa reagovala na zvýšenou dávku N hnojení vyšší hodnotou zastoupení bílkovin v obsahu dusíkatých látek. Vyšší relativní abundance patatinu bylo s převahou dosaženo při nižší dávce N hnojení, což se nejvýrazněji projevilo na stanovišti Lukavec, kde příznivé klimatické podmínky pro tvorbu výnosu hlíz při vyšší dávce N hnojení zapříčinily pokles relativní abundance všech sledovaných obsahových látek. Přesto bylo stanoviště s vyšší

nadmořskou výškou vyhodnoceno jako vhodnější k produkci hlíz pro souběžné zpracování hlíz na škrob a bílkovinu vzhledem k svému výnosovému potenciálu. Konstrukcí paprskových grafů byla odrůda Westamyl vyhodnocena jako velmi vhodná pro zamýšlenou souběžnou produkci bílkovin a škrobu (hodnocen byl výnos škrobu, výnos bílkovin, obsah škrobu a obsah bílkovin).

Ad III

Testovány byly tři skupiny srážecích činidel (organické a anorganické kyseliny, organická činidla a soli kovů) v teplotních režimech 0 a 22°C. Izoláty získané pomocí kyselin vykazovaly velmi nízkou rozpustnost, a to v obou teplotních režimech. Při použití organických činidel se vliv teploty projevil výrazně na výtěžnosti i zpětné rozpustnosti izolovaných bílkovin a zcela jednoznačně byl proces izolace bílkovin úspěšnější v režimu 0°C. Výtěžnost ani zpětná rozpustnost izolovaných bílkovin nebyla při použití solí kovů ovlivněna teplotou a v případě chloridu železitého bylo dosaženo vysoké výtěžnosti (až 86 %) se zachováním zpětné rozpustnosti izolovaných bílkovin. Použití etanolu a FeCl₃ v režimu nízkých teplot bylo vyhodnoceno jako nejvhodnější pro dosažení vysoké výtěžnosti bílkovin při současném zachování jejich zpětné rozpustnosti.

Na základě další optimalizace procesu izolace hlízových bílkovin byla stanovena optimální koncentrace etanolu v reakční směsi v rozsahu 4,0 – 4,4 M s nutností provést izolaci bílkovin za velmi nízkých teplot (nejlépe 0°C). Optimální koncentrace FeCl₃ byla stanovena na úrovni 20 mM v objemu reakční směsi. Obsah dusíkatých látek byl u etanolového koncentrátu 83 %, což je srovnatelné s obsahem dusíkatých látek v koncentrátu vzniklém působením tepla. Výrazný pokles relativního obsahu N látek v FeCl₃ koncentrátu (69,4 %) lze přisuzovat přítomnosti dalších balastních látek a mezi nimi i Fe³⁺ iontů. Obsah steroidních glykoalkaloidů byla u etanolového a FeCl₃ koncentrátu statisticky průkazně nižší při srovnání s jejich obsahem v sušině hlízové šťávy a tepelného koagulátu. Vzhledem k termolabilitě patatinu byla nejvyšší relativní abundance této bílkoviny zaznamenána v tepelném koagulátu. Nutriční hodnota vyjádřena indexem esenciálních aminokyselin byla srovnatelná pro tepelný koagulát, etanolový i FeCl₃ koncentrát a pohybovala se přibližně na úrovni 82 %. Poprvé byla stanovena nutriční hodnota patatinu izolovaného z průmyslové hlízové šťávy. Index esenciálních aminokyselin patatinu dosáhl hodnoty 86 % a byla potvrzena klíčová role patatinu v nutriční hodnotě bílkovinných koncentrátů.

Po izolaci bílkovin z PFJ pomocí jejich vysrážení teplem, zůstává další odpadní produkt označovaný jako tzv. deproteinovaná hlízová voda. Bylo prokázáno, že tento produkt obsahuje termostabilní bílkoviny vykazující antifungální aktivitu vůči patogenům rodu *Fusarium*. Z pohledu antifungální aktivity byl jako nejúčinnější vyhodnocen izolát termostabilních bílkovin získaný při ošetření hlízové šťávy teplotou 80°C. Na základě MALDI-MS/MS analýzy byla v této frakci bílkovin zjištěna přítomnost bramborových inhibitorů I a II s převahou skupiny inhibitorů proteas II. Inhibitory proteas II byly také výhradně přítomny ve vzorku bílkovin izolovaných při 100°C, který vykazoval druhou nejsilnější antifungální aktivitu. Uvedené výsledky představují bramborové inhibitory I a II jako bílkoviny s funkční termostabilitou a prokázanými antifungálními vlastnostmi.

7. Seznam zkratek

AAS	aminokyselinového skóre
EAAI	index esenciálních aminokyselin
BCA metoda	metoda využívající kyseliny bicinchoninové
ECD metoda	spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu
2D PAGE	dvoudimenzionální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
HPLC-MS/MS	metody kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie
MALDI-MS/MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice a tandemové hmotnostní spektrometrie
ID spotu	identifikátor spotu
GI číslo	identifikační číslo bílkoviny v rámci databáze
PFJ	hlízová šťáva brambor
PR	bílkoviny, jejichž syntéza je spojena s patogenezí
PPIs	inhibitory proteas hlíz bramboru
PI-1	bramborový inhibitor I
PI-2	bramborový inhibitor II
PCPI	bramborový inhibitor cysteinových proteas
PAPI	bramborový inhibitor aspartátových proteas
PKPI	bramborový inhibitor Kunitzova typu
OSPI	ostatní inhibitory proteas hlíz brambor
PCI	bramborový inhibitor karboxypeptidasy
PHN	fenylhydrazin hydrochlorid
LAH aktivita	lipidacylhydrolasová aktivita

8. Seznam použité literatury

1. Andersson J., Sahoo D., Mattiasson B. (2008): Isolation of potato proteins using simulated moving bed technology. *Biotechnology and Bioengineering* 101: 1256-1263.
2. Avebe (2019): <https://www.avebe.com/dairy-free-foods/> (dostupné on-line 18.2. 2019).
3. Averis Seed (2019): <http://www.averis.nl/over-averis/geschiedenis/> (dostupné on-line 25.2. 2019).
4. Backle M., Ekici P., Leupold G., Coelhan M., Parlar H. (2004): Enrichment of the glycoalkaloids α -solanine and α -chaconine from potato juice by Adsorptive Bubble Separation using a pH gradient. *Journal of Separation Science* 27: 1042–1044.
5. Bárta J., Bártová V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Vědecká monografie. ZF JU v Č. Budějovicích. 116 p.
6. Bárta J., Bártová V. (2008): Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, and its occurrence as genotype effect: processing versus table potatoes. *Czech Journal of Food Sciences* 26: 347-359.
7. Bárta J., Bártová V., Brabcová A., Diviš J., Horáčková V., Kamenová A., Zdráhal Z. (2015): Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*. Kurent České Budějovice 142 p.
8. Bárta J., Bártová V., Diviš J. (2009): Využití analýzy bílkovin na automatické čipové elektroforese Experion pro charakterizaci genotypů brambor. Uplatněná metodika, ZF JU v Č. Budějovicích, 37 p.
9. Bárta J., Bártová V., Zdráhal Z., Brabcová A., Kamenová A., Diviš J. (2013): Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor. Certifikovaná metodika. Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, 39p.
10. Bárta J., Bártová V., Sýkorová S., Čurn V., Diviš J., Matějovi E., Štočková L. (2012b): Komplexní metodika pracovních postupů pro charakterizaci odrůd brambor. Uplatněná metodika, ZF JU v Českých Budějovicích, 43 p.
11. Bárta J., Bártová V., Zdráhal Z., Sedo O. (2012a): Cultivar variability of patatin biochemical characteristics: table versus processing potatoes (*Solanum tuberosum* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 4369–4378.
12. Bárta J., Diviš J., Švajner J., Bártová V. (2012c): Pěstování brambor pro produkci škrobu a bílkovin. Certifikovaná metodika pro praxi (osvědčení 194-2/KÚ/UKZUZ/2012), ZF JU v Českých Budějovicích, 33 p.
13. Bárta J., Heřmanová V., Diviš J. (2008): Effect of low-molecular additives on precipitation of potato fruit juice proteins under different temperatures regimes. *Journal of Food Process Engineering* 31: 533-547.
14. Bártová V., Bárta J. (2009): Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol and ferric chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9028-9034.
15. Bártová V., Bárta J., Diviš J., Švajner J., Peterka J. (2009): Crude protein content i tubers of starch processing potatoes cultivars in dependence on different agro-ecological conditions. *Journal of Central European Agriculture* 1: 57-56.
16. 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.
17. Bártová V., Bárta J., Brabcová A., Zdráhal Z., Horáčková V. (2015): Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species. *Journal of Food Composition and Analysis* 40: 78-85.
18. Bártová V., Bárta J., Jarošová M. (2019): Antifungal and antimicrobial proteins and peptides of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers and their applications: A mini-review. Under review in *Applied Microbiology and Biotechnology*.
19. Bártová V., Bárta J., Vlačihová A., Šedo O., Zdráhal Z., Konečná H., Stupková A., Švajner J. (2018): Proteomic characterization and antifungal activity of potato tuber proteins isolated from starch production waste under different temperatures regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 10551-10560.
20. Bártová V., Diviš J., Bárta J., Brabcová A., Švajnerová M. (2013): Variation of nitrogenous components in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers produced under organic and conventional crop management. *European Journal of Agronomy* 49: 20-31.
21. Bauw G., Nielsen H.V., Emmersen J., Nielsen K.L., Jørgensen M., Welinder K.G. (2006): Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. *FEBS Journal* 273: 3569-3584.
22. Bergsma J. (2019): Vegan cheese analogue. US patent 2019/0037872 A1.
23. Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, Lopez G, García-Olmedo F, Molina A (2002): Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiology* 128: 951-961.

24. Bohlscheid J.C., Fletcher K.M., Huffman L. M. (2018): Potato protein powders. United States Patent Application 20180289036.
25. Creusot N., Wierenga P.A., Laus M.C., Giuseppin M.L.F., Gruppen H. (2011): Rheological properties of patatin gels compared with β -lactoglobulin, ovalbumin, and glycinin. *The Journal of the Science of Food and Agriculture* 91:253-61.
26. Chakraborty S., Chakraborty N., Agrawal L., Ghosh S., Narula K., Shekhar S., Naik P.S., Pande P.C., Chakraborti S.K., Datta A. (2010): Next-generation protein-rich potato expressing the seed protein gene AmA1 is a result of proteome rebalancing in transgenic tuber. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America National Academy of Sciences* 107: 17533–17538.
27. Dabestani S., Arcot J., Chen V. (2017): Protein recovery from potato processing water: Pre-treatment and membrane fouling minimization. *Journal of Food Engineering* 195:85-96.
28. Davies C., Macrae A.R. (2001): Způsob výroby esterů alifatických monokarboxylových kyselin. Patentový spis CZ 289151 B6. Úřad průmyslového vlastnictví ČR.
29. Delahaije R.J., Gruppen H., van Nieuwenhuijzen N.H., Giuseppin M.L., Wierenga P.A. (2013): Effect of glycation on the flocculation behavior of protein-stabilized oil-in-water emulsions. *Langmuir* 29 (49): 15201–15208.
30. Doke N., Nishimura S. (1988): Activation of O₂ generating reaction in potato plants infected with *Phytophthora infestans*: its mechanisms and significance in induced resistance. Abstract of Papers, 5th International Congress of Plant Pathology, 229p.
31. Domkářová J. (2001): Zhodnocení genofondu odrůd *Solanum tuberosum* L. z hlediska kvality a odolnosti k chorobám. Autoreferát disertační práce. Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 24 s.
32. Ebúrneo J.M., Garcia E.L., Rodrigues dos Santos T.P., de Freitas Cordova de Souza E., Soratto R.P., Fernandes A.M., Magali Leonel M. (2018): Influence of nitrogen fertilization on the characteristics of potato starch. *Australian Journal of Crop Science* 10(03): 365-373.
33. El-Sayed S.F., Hassan H.A., El-Mogy M.M. (2015): Impact of Bio- and Organic Fertilizers on Potato Yield, Quality and Tuber Weight Loss After Harvest. *Potato Research* 58: 67-81.
34. Eppendorfer W.H., Eggum B.O. (1994): Effects of sulphur, nitrogen, phosphorus, potassium, and water stress on dietary fibre fractions, starch, amino acids and on the biological value of potato protein. *Plant Foods for Human Nutrition* 45: 299-313.
35. FAO/WHO (1991): Protein quality evaluation. Report of a joint FAO-WHO expert consultation FAO. FAO Food and Nutrition Paper 51, pp. 35-36.
36. Feldman M.L., Oliva C.R., Casalengué C.A., Daleo G.R. (2000): Induction of a proteinase K inhibitor in a potato cultivar with a high degree of field resistance against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 109:14-20.
37. Fu Y., Alashi A.M., Young J.F., Therkildsen M., Aluko R.E. (2017): Enzyme inhibition kinetics and molecular interactions of patatin peptides with angiotensin I-converting enzyme and renin. *International Journal of Biological Macromolecules* 101: 207-213.
38. Fu Y., Wu W., Zhu M., Xiao Z. (2016): In Silico assessment of the potential of patatin as a precursor of bioactive peptides. *Journal of Food Biochemistry* 40: 261-390.
39. Friedman M. (2006): Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8655-8681.
40. Galdón B.R., Mesa D.R., Rodríguez E.M.R., Romero C.D. (2010): Amino acid content in traditional potato cultivars from the Canary Islands. *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 148-153.
41. Gambuti A., Rinaldi A., Moio L. (2012): Use of patatin, a protein extracted from potato, as alternative to animal proteins in fining of red wine. *European Food Research and Technology* 235: 753-765.
42. Gambuti A., Rinaldi A., Romano R., Manzo N., Moio L. (2016): Performance of a protein extracted from potatoes for fining of white musts. *Food Chemistry* 190: 237-243.
43. Gao X., Li C., Zhang M., Wang R., Chen B. (2015): Controlled release urea improved the nitrogen use efficiency: yield and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.) on silt loamy soil. *Field Crops Research* 181: 60-68.
44. Glusac J., Isaschar-Ovdat S., Kukavica B., Fishman A. (2017): Oil-in-water emulsions stabilized by tyrosinase-crosslinked potato protein. *Food Research International* 100: 407-415.
45. Guiseppin, M. (2014): Myths and facts on plant proteins: case potato proteins. Conference: ScanBalt Forum, At Groningen, The Netherlands.
46. Guiseppin M.L.F.G., Laus M.Ch., Shipper J. (2013): Potato protein isolates. Patent, application number: 20150183840.
47. Gomord V., Faye L. (2004): Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 171-181.

48. Hajšlová J., Schulzová V., Slanina P., Janné K., Hellenäs K.E., Andersson Ch. (2005): Quality of organically and conventionally grown potatoes: Four-year study of micronutrients, metals, secondary metabolites, enzymic browning and organoleptic properties. *Food Additives and Contaminants* 22: 514-534.
49. Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C. (2003a): Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) *Molecular Genetics and Genomics* 269: 526-534.
50. Heibges A., Salamini F., Gebhardt C (2003b) Functional comparison of homologous member of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 269: 535-541.
51. Hermosa M.R., Turrà D., Fogliano V., Monte E., Lorito M. (2006): Identification and characterization of potato protease inhibitors able to inhibit pathogenicity and growth of *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68:138-148.
52. Heřmanová V., Bárta J., Čurn V. (2006): Antifungální proteiny rostliny – klasifikace, charakteristika, možnosti využití, *Chemické Listy* 100: 495-500.
53. Hossain M.B., Rawson A., Aguiló-Aguayo I., Brunton N.P., Rai D.K. (2015): Recovery of steroidal alkaloids from potato peels using pressurized liquid extraction. *Molecules* 20: 8560-8573.
54. Huang C., Feng W.L., Xiong J., Wang T.L., Wang W.G., Wang C.W., Yang F. (2019): Impact of drying method on the nutritional value of the edible insect protein from black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae: amino acid composition, nutritional value evaluation, in vitro digestibility, and thermal properties. *European Food Research and Technology* 245: 11-21.
55. Huang P., Wen S.L., Jin X.J. (1996): Effects of some physical and chemical character of main soil type in Gansu on potato quality. *Journal of Gansu Agricultural University* 31: 257-262.
56. Järvan M., Edesi L., (2009): The effect of cultivation methods on the yield and biological quality of potato. *Agronomy Research* 7: 289–299.
57. Jiménez-Atiéndzar M., Cabanes J., Gandía-Herrero F., Escribano J., García-Carmona F., Pérez-Gilabert M. (2003): Determination of the phospholipase activity of patatin by a continuous spectrophotometric assay. *Lipids* 38: 677-82.
58. Jin Z., Shide P.L., Yang Y.X., Choi J.Y., Yoon S.Y., Hahn T.-W., Lim H.T., Park Y.K., Hahm K.S., Joo J.W., Chae B.J. (2009): Use of refined potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Gogu Valley) protein as an alternative to antibiotics in weaning pigs. *Livestock Science* 124: 26-32.
59. Jin C.Y., Xu D., Zeng F.K., Zhao Y.C., Yang Y.C., Gao G.Q., Wen G.H., Liu, G. (2017): A simple method to prepare raw dehydrated potato flour by low-temperature vacuum drying. *International Journal of Food Engineering* 13: 20170127.
60. Jin Ch., Zeng F., Liu G. (2018): Recovery of protease inhibitors from potato fruit water by expanded bed adsorption chromatography in pilot scale. *The American Journal of Potato Research* 95: 1-8.
61. Jørgensen, M., Bauw G., Welinder K.G. (2006): Molecular properties and activities of tuber proteins from starch potato cv. Kuras. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9389-9397.
62. Kärenlampi S.O., White P.J. (2009): Potato proteins, lipid and minerals. In: Sigh J., Kaur L.: *Advances in potato chemistry and technology*, pp. 99-126, Elsevier, Oxford.
63. 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 Communication* 330: 921-927.
64. Kim M.H., Park S.-C., Kim J.-Y., Lee S.Y., Lim H.T., Cheong H., Hahm K.-S., Park Y. (2006): Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety Golden Valley. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346: 681-686.
65. Kim J-Y., Park S-Ch., Kim M-H., Lim H-T., Park Y., Hahm K-S. (2013): Antimicrobial activity studies on a trypsin-chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330: 921-927.
66. Klaassen M.T., Bourke P.M., Maliepaard C., Trindade L.M. (2019): Multi-allelic QTL analysis of protein content in a bi-parental population of cultivated tetraploid potato. *Euphytica* 215: 14.
67. Knorr D. (1980): Effect of recovery methods on yields, quality and functional properties of potato protein concentrates. *Journal of Food Science* 45: 1183-1186.
68. Knorr D. (1982): Effects of recovery methods on the functionality of protein concentrates from food processing wastes. *Journal of Food Process Engineering* 5: 215-230.
69. KOB (2019): Katalog odrůd brambor registrovaných v ČR. <http://www.katalogbrambor.cz/> (on-line dostupné 19. 2. 2019).
70. Kong X.Z., Kong L.Z., Ying Y.S., Hua Y.F., Wang L. (2015): Recovering proteins from potato juice by complexation with natural polyelectrolytes. *International Journal of Food Science and Technology* 50: 2160-2167.

71. Koningsveld van G.A. (2001): Physico-chemical and functional properties of potato proteins. Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen 143 p.
72. Koningsveld van G.A., Gruppen H., Jongh de H.H.J., Wijngaards G., Boekel van M.A.J.S., Walstra P., Voragen AG. (2001): Effects of pH and heat treatment on the structure and solubility of potato proteins in different preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4889-4897.
73. Koppelman S.J., van Koningsveld G.A., Knulst A.C., Gruppen H., Pigmans I.G., de Jongh H.H. (2002): Effect of heat-induced aggregation on the IgE binding of patatin (Sol t 1) is dominated by other potato proteins *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1562–1568.
74. Ku S.K., Sung S.H., Choung J.J., Choi J-S., Shin Y.K., Kim J.W. (2016): Anti-obesity and anti-diabetic effect of a standardized potato extract in *ob/ob* mice. *Experimental and Therapeutic Medicine* 12: 354-364.
75. 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.
76. Lattová E., Brabcová A., Bártová V., Potěšil D., Bárta J., Zdráhal Z. (2015): N-Glycome profiling of patatins from different potato species of *Solanum* genus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 3243-3250.
77. Laus M.C., Klip G., Giuseppin M.L.F. (2017): Improved extraction and sample cleanup of tri-glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine in non-denatured potato protein isolates. *Food Analytical Methods* 10: 845-853.
78. Lehesranta S.J., Davies H.V., Shepherd L.V.T., Nunan N., McNicol J.W., Auriola S., Koistinen K.M., Suomalainen S., Kokko H.I., Sirpa O. Kärenlampi S.O. (2005): Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. *Plant Physiology* 138: 1690-1699.
79. Lehesranta S.J., Koistinen K.M., Massat N., Davies H.V., Shepherd L.V.T., McNicol J.W., Cakmak I., Cooper J., Lück L., Kärenlampi S.O., Leifert C. (2007): Effects of agricultural production systems and their components on protein profiles of potato tubers. *Proteomics* 7: 597-604.
80. Leonel M., do Carmo E.L., Fernandes A.M., Soratto R.P., Eburneo J.A.M., Garcia É.L., dos Santos T.P.R. (2017): Chemical composition of potato tubers: the effect of cultivars and growth conditions. *The Journal of Food Science and Technology* 54: 2372-2378.
81. Li L.M., Wang C.J., Qiang S., Zhao J.X., Song S., Jin W.J., Wang B., Zhang Y., Huang L.J., Wang Z.F. (2016): Mass spectrometric analysis of N-Glycoforms of soybean allergenic glycoproteins separated by SDS-PAGE. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 7367-7376.
82. Lin S., Sattelmacher B., Kutzmutz E., Muhling K.H., Dittert K. (2004): Influence of nitrogen nutrition on tuber quality of potato with special reference to the pathway of nitrate transport into tubers. *Journal of Plant Nutrition* 27: 341–350.
83. Liu Y-W., Han Ch-H., Lee M-H., Hsu F-L., Hou W.-Ch. (2003): Patatin, the tuber storage protein of potato (*Solanum tuberosum* L.), exhibits antioxidant activity in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4389-4393.
84. Liu Z., Wu Z., Li R., Fan X. (2013): Two-stage foam separation technology for recovering potato protein from potato processing wastewater using the column with the spiral internal component. *Journal of Food Engineering* 114:192–198.
85. Løkra S., Holland M.H., Clausen I.C., Straekvern K.O., Egellandsdal B. (2008): Chemical characterization and functional properties of potato protein concentrate prepared by large-scale expanded bed absorption chromatography. *LWT-Food Science and Technology* 41: 1089-1099.
86. Løkra, S., Schüller, R. B., Egellandsdal, B., Engebretsen, B., Strætkvern, K.O. (2009): Comparison of composition, enzyme activity and selected functional properties of potato proteins isolated from potato juice with two different expanded bed resins. *LWT - Food Science and Technology* 42: 906-913.
87. Lombardo S., Pandino G., Mauromicale G. (2017): The effect on tuber quality of an organic versus a conventional cultivation system in the early crop potato. *Journal of Food Composition and Analysis* 62: 189-196.
88. Lomolino G., Vincenzi S., Gazzola D., Crapisi A., Curioni A. (2015): Foaming properties of potato (*Solanum tuberosum*) proteins: A study by the gas sparing method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects* 475: 75-83.
89. Macrae A.R., Visicchio 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.
90. Maggio A., Carillo P., Bulmetti G.S., Fuggi A., Barbieri G., de Pascale S. (2008): Potato yield and metabolic profiling under conventional and organic farming. *The European Journal of Agronomy* 28: 343-350.
91. Majamaa H., Seppälä U., Palosuo T., Turjanmaa K., Kalkkinen N., Reunala T. (2001): Positive skin and oral challenge responses to potato and occurrence of immunoglobulin E antibodies to patatin (Sol t 1) in infants with atopic dermatitis. *Pediatric Allergy Immunology* 12: 283-288.

92. Makarewicz A., Plaza A., Gasiorowska B., Rosa R., Cybulaska A. (2017): The tuber content of harmful substances in potato manured with undersown catch crops. *Romanian Agricultural Research* 34: 319-327.
93. Martínez-Villaluenga C., Gullewicz P., Frias J., Gulewicz K., Vidal-Valverde C. (2008): Assessment of protein fraction of three cultivars of *Pisum sativum* L.: effect of germination. *European Food Research and Technology* 226: 1465-1478.
94. Mello de C.S., Van Dijk J.P., Voorhuijzen M., Kok E.J., Arisi A.C. (2016): Tuber proteome comparison of five potato varieties by principal component analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96: 3928-3936.
95. Mignery G.A., Pikaard C.S., Park W.D. (1988): Molecular characterization of the patatin multigene family of potato. *Gene* 62: 27-44.
96. Mitrus J., Stankiewicz C., Steć E., Kamecki M., Starczewski J. (2003): The influence of selected cultivation on the content of total protein and amino acids in the potato tubers. *Plant, Soil and Environment* 49: 131-134.
97. Mouzo D., Bernal J., López-Pedrouso M., Franco D., Zapata I. C. (2018a): Advances in the biology of seed and vegetative storage proteins based on two-dimensional electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Molecules* 23: 2462.
98. Mouzo D., Lopez-Pedrouso M., Bernal J., Garcia L., Franca D., Zapata C. (2018b): Association of patatin-based proteomic distances with potato (*Solanum tuberosum* L.) quality traits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66: 11864-11872.
99. Munger A., Simon M.A., Khalf M., Goulet M.-C., Michaud D. (2015): Cereal cystatins delay sprouting and nutrient loss in tubers of potato, *Solanum tuberosum*. *BMC Plant Biology* 15:296.
100. Narasimhamoorthy B., Zhao L.Q., Liu X., Essah S.Y.C., Holm D.G., Greaves J.A. (2013): Effect of harvest date on PI-2, total protein, TGA content and tuber performance in potato *American Journal of Potato Research* 90: 561-569.
101. Narvaez-Cuenca C.E., Pena C., Restrepo-Sanchez L.P., Kushalappa A., Mosquera T. (2018): Macronutrient contents of potato genotype collections in the *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Journal of Food Composition and Analysis* 66: 179-184.
102. Ngobese N.Z., Workneh T.S. (2018): Potato (*Solanum tuberosum* L.) nutritional changes associated with French fry processing: Comparison of low-temperature long-time and high-temperature short-time blanching and frying treatments. *LWT-Food Science and Technology* 97: 448-455.
103. Ohh S.H., Shide P.L., Choi J.Y., Jin Z., Hahn T.W., Lim H.T., Kim G.Y., Park Y.K., Hahm K.S., Chae B.J. (2010): Effect of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Golden Valley) protein on performance, nutrient metabolizability, and cecal microflora in broilers. *Archiv fur Geflugelkunde* 74: 30-35.
104. Osborne T.B., Campbell G.F. (1896): The properties of the potato. *Journal of the American Chemical Society* 18: 575-582.
105. Park Y., Choi B.H., Kwak J.S., Kang C.W., Lim H.T., Cheong H.S., Hahm K.S. (2005): Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 6491-6496.
106. Park W.D., Paiva E., Lister R. M. (1983): Induction and Accumulation of Major Tuber Proteins of Potato in Stems and Petioles. *Plant Physiology* 71(1):161-8.
107. Pawelzik E., Moller K. (2014): Sustainable potato production worldwide: the challenge to assess conventional and organic production systems. *Potato Research* 57: 273-290.
108. Pęksa A., Kita A., Kułakowska K., Aniołowska M., Hamouz K., NemśA. (2013): The quality of protein of coloured fleshed potatoes. *Food Chemistry* 141: 2960-2966.
109. Pęksa A., Miedzianka J., NemśA. (2018): Amino acid composition of flesh-coloured potatoes as affected by storage conditions. *Food Chemistry* 266: 335-342.
110. Perla V., Jayanty S.S., Holm D.G., Davidson R.D. (2014): Relationship between tuber storage proteins and tuber powdery scab resistance in potato. *American Journal of Potato Research* 9: 233-245.
111. Peyer C., Bonay P., Staudacher E. (2004): Purification and characterization of a beta-xylosidase from potatoes (*Solanum tuberosum*). *Biochimica and Biophysica Acta (BBA)* 1672: 27-35.
112. Pots A.M. (1999): Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein. Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 123 p.
113. Pouvreau L. (2004): Occurrence of physico-chemical properties of protease inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum*). Ph.D. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, 157 p.
114. Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S.R., van den Broek L.A.M., van Koningsveld G.A., Voragen A.G.J. (2001): Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2864-2874.

115. Pouvreau L., Kroef T., Gruppen H., van Koningsveld G., van den Broek L.A.M., Voragen A.G.J. (2005a): Structural and stability of the potato cysteine protease inhibitor group (cv. Elkana). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 5739-5746.
116. Pouvreau L., Kroef T., Gruppen H., van Koningsveld G., van den Broek L.A.M., Voragen A.G.J. (2005b): Conformational stability of the potato serine protease inhibitor group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3191-3196.
117. Quilis J., Meynard D., Vila L., Avilés F.X., Guiderdoni E., Segundo San B. (2007): A potato carboxypeptidase inhibitor gene provides pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 5:537-53.
118. Quispe-Mendoza L., Betalleluz-Pallardel, I., Vargas-Delgado L., Velezmoro-Sanchez C. (2018): Stability of cooked pressed yellow potato (*Solanum goniocalyx*) in frozen storage. *Scientia Agropecuaria* 9: 123-131.
119. Racusen D. (1986): Esterase specificity of patatin from two potato cultivars. *Canadian Journal of Botany* 64: 2104-2106.
120. Racusen D. (1988): Patatin in wild species of *Solanum*. *Canadian Journal of Botany* 66: 727-729.
121. Racusen D., Foote M. (1980): A major soluble glycoprotein of patatin, a major potato tuber protein. *Journal of Food Biochemistry* 8: 103-107.
122. Racusen D., Racusen R. (1992): Esterase activity and structural heterogeneity in patatin from a wild potato species. *Canadian Journal of Botany* 70: 597-600.
123. Rajapakse D.P., Imai T., Ishige T. (1991): Analysis of potato microtuber proteins by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Potato Research* 34: 285-293.
124. 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.
125. Refstie S., Harold A.J. (2003): Potato protein concentrate with low content of solanidine glycoalkaloids in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 216: 283-298.
126. Revina T.A., Gerasimova N.G., Kladnitskaya G.V., Chalenko G.I., Valueva T.A. (2008): Effect of proteinaceous proteinase inhibitors from potato tubers on the growth and development of phytopathogenic microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44: 89-92.
127. Revina T.A., Speranskaya A.S., Kladnitskaya G.V., Shevelev A.B., Valueva T.A. (2004): Subtilisin protein inhibitor from potato tubers. *Biochemistry (Moscow)* 69:1092-1098.
128. Rodríguez I.F., Sayago J.E., Torres S., Zampini I.C., Isla M.I., Ordóñez R.M. (2015): Control of pathogens by protein extracts from *Solanum tuberosum* tubers. *The European Journal of Plant Pathology* 141: 585-595.
129. Rojas-Padilla C., Vasquez-Villalobo V. (2016): Phenolic compounds with antioxidant capacity of the native Andean potato (*Solanum tuberosum* L.) Huagalina variety in La Libertad-Peru. *Scientia Agropecuaria* 7(3): 333-340.
130. 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: 303-11.
131. Schmidt J.M., Damgaard H., Greve-Poulsen M., Larsen L.B., Hammershøj M. (2018): Foam and emulsion properties of potato protein isolate and purified fractions. *Hydrocolloids* 74: 367-378.
132. Sharma N., Gruszewski H.A., Park S.W., Holm D.G., Vivanco J.M. (2004): Purification of an isoform of patatin with antimicrobial activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 647-655.
133. Shewry P.R. (2003): Tuber storage proteins. *Annals of Botany* 91: 755-769.
134. Senda K., Doke N., Kawakita K. (1998): Effect of mastoparan on phospholipase A2 activity in potato tubers treated with fungal elicitor. *Plant and Cell Physiology* 39: 1080-1086.
135. Senda K., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (1996): A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell and Physiology* 37: 347-53.
136. Sever N., Filipic M., Brzin J., Lah T.T. (2002): Effect of cysteine proteinase inhibitors on murine B16 melanoma cell invasion *in vitro*. *Biological Chemistry* 383: 839-42.
137. Sitjà-Arnau M., Molina M.A., Blanco-Apericio C., Ferrer-Soler L., Lorenzo J., Avilés F.X., Querol E., de Llorens R. (2005): Mechanism of action of potato carboxypeptidase inhibitor (PCI) as an EGF blocker. *Cancer Letters* 226: 169-184.
138. Sonnewald U., Sturm A., Chrispeels M.J., Willmitzer L. (1989): Targeting and glycosylation of patatin the major potato tuber protein in leaves of transgenic tobacco. *Planta* 179: 171-180.
139. Spelbrink R.E.J., Lensing H., Egmond M.R., Giuseppin M.L.F. (2015): Potato protein generates short-chain fatty acids from milk fat that contribute to flavour development in Cheese Ripening. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176: 231-243.

140. Strætkevørn K.O., Schwarz J.G. (2012): Recovery of Native Potato Protein Comparing Expanded Bed Adsorption and Ultrafiltration. *Food and Bioprocess Technology* 5: 1939-1949.
141. Stiekema W.J., Heidekamp F., Dirkse W.G., van Beckum J., de Haan P., Bosch C.T., Louwerse J.D. (1988): Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Molecular Biology* 11: 255-269.
142. Strickland J.A., Orr G.L., Walsh T.A. (1995): Inhibition of diabrotica larval growth by patatin, the lipid acyl hydrolase from potato tubers. *Plant Physiology* 109: 667-674.
143. Stupar R.M., Beaubien K.A., Jin W., Song J., Lee M.K., Wu C., Zhang H.B., Han B., Jiang J. (2006): Structural diversity and differential transcription of the patatin multicopy gene family during potato tuber development. *Genetics* 172: 1263-1275.
144. 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.
145. Taskila S., Ahokas M., Jarvinen 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* 2017: 5120947.
146. Tesfaye H.T. (2016): A review on potato (*Solanum tuberosum* L.) production situations in Ethiopia. *Food Science and Quality Management* 57: 109-112.
147. Tonón, C., Daleo G., Oliva C. (2001): An acidic β -1,3 glucanase from potato tubers appears to be patatin. *Plant Physiology and Biochemistry*. 39: 849-854.
148. Tonón C., Guevara G., Oliva C.; Daleo G. (2002): Isolation of a potato acidic 39 kDa beta-1,3-glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance. *Journal of Phytopathology Phytopathologische Zeitschrift* 150: 189-195.
149. 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.
150. Twell D., Ooms G. (1988): Structural diversity of the patatin family in potato cv. Désirée. *Molecular and General Genetics* 212: 325-336.
151. 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.
152. Waglay A., Karboune S. (2017): A novel enzymatic approach based on the use of multi-enzymatic systems for the recovery of enriched protein extracts from potato pulp. *Food Chemistry* 220: 313-323.
153. Waglay A., Karboune S., Alli I. (2014): Potato protein isolates: recovery and characterization of their properties. *Food Chemistry* 142:373-82.
154. 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.
155. Welinder K.G., Jørgensen M. (2009): Covalent structures of potato tuber lipases (patatins) and implications for vacuolar import. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 9764-9769.
156. Wierzbowska J., Cwalina-Ambroziak B., Głosek M., Sienkiewicz, S. (2015): Effect of biostimulators on yield and selected chemical properties of potato tubers. *Journal of Elementology* 20: 757-768.
157. Yang F., Huang X.J., Zhang C.L., Zhang M., Huang C., Yang H. (2018): Amino acid composition and nutritional value evaluation of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) and its protein subunit. *RSC Advances* 8: 2653-2659.
158. Yang K., Wang F., Shock C.C., Kang S., Huo Z., Song N., Ma D. (2017): Potato performance as influenced by the proportion of wetted soil volume and nitrogen under drip irrigation with plastic mulch. *Agricultural Water Management* 179: 260-270.
159. Zaheer K, Akhtar MH Potato Production, Usage, and Nutrition--A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56:711-21.
160. Zeng F., Liu H., Ma P.-J., Liu G. (2013). Recovery of native protein from potato root water by expanded bed adsorption with amberlite XAD7HP. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 18: 981-988.
161. Zhang D.Q., Mu T.H., Sun H.N., Chen J.W., Zhang M. (2017): Comparative study of potato protein concentrates extracted using ammonium sulfate and isoelectric precipitation. *International Journal of Food Properties* 20: 2113-2127.
162. Zwijnenberg H.J., Kemperman A.J.B., Boerrigter M.E., Lotz M., Dijksterhuis J.F., Poulsen P.E., Koopsa G.H. (2002): Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination* 144:331-334.

Příloha I

Variabilita vybraných biochemických a nutričních charakteristik hlízových bílkovin v rámci kulturního druhu bramboru (*Solanum tuberosum* L.) a příbuzných druhů rodu *Solanum*

Bártová V., Bárta J., Brabcová A., Zdráhal Z., Horáčková V. (2015): Amino acid composition and nutritional value of four cultivated South American potato species. *Journal of Food Composition and Analysis* 40: 78-85.

Lattová E., Brabcová A., **Bártová V.**, Potěšil D., Bárta J., Zdráhal Z. (2015): N-Glycome profiling of patatins from different potato species of *Solanum* genus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 3243-3250.

Bárta J., **Bártová V.**, Brabcová A., Diviš J., Horáčková V., Kamenová A., Zdráhal Z. (2015): Genotypový potenciál obsahu a kvality bílkovin v hlízách brambor, p. 21-64. In: Bárta J. (ed.): Potenciál bílkovin hlíz brambor v rámci rodu *Solanum*. KURENT České Budějovice.

Bárta J., **Bártová V.**, Zdráhal Z., Šedo O. (2012): Cultivar variability of patatin biochemical characteristics: table versus processing potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 4369-4378.

Příloha II

Vliv odrůdy a vybraných pěstitelských faktorů na kumulaci bílkovin v hlízách kulturního druhu bramboru *Solanum tuberosum* L.

Bártová V., Diviš J., Bárta J., Brabcová A., Švajnerová M. (2013): Variation of nitrogenous components in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers produced under organic and conventional crop management. *European Journal of Agronomy* 49: 20-31.

Bárta J., Diviš J., Švajner J., **Bártová V.** (2012b): Pěstování brambor pro produkci škrobu a bílkovin. Certifikovaná metodika pro praxi (osvědčení 194-2/KÚ/UKZUZ/2012), ZF JU v Českých Budějovicích, 33 p.

Bártová V., Bárta J., Diviš J., Švajner J., Peterka J. (2009): Crude protein content in tubers of starch processing potato cultivars in dependence on different agro-ecological conditions. *Journal of Central European Agriculture* 10: 57-66.

Bárta J., **Bártová V.** (2008): Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, and its occurrence as genotype effect: processing versus table potatoes. *Czech Journal of Food Sciences* 26: 347-359.

Příloha III

Praktické aspekty variability vybraných obsahových a funkčních vlastností hlízových bílkovin z pohledu jejich izolace a využití

Bártová V., Bárta J., Jarošová M. (2019): Antifungal and antimicrobial potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber proteins and peptides and their applications in biotechnology and agriculture. Submitted to *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Bártová V., Bárta J., Vlačihová A., Šedo O., Zdráhal Z., Konečná H., Stupková A., Švajner J. (2018): Proteomic characterization and antifungal activity of potato tuber proteins isolated from starch production waste under different temperatures regimes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 10551-10560.

Bártová V., Bárta J. (2009): Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol and ferric chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9028-9034.

Bárta J., **Heřmanová V.**, Diviš J. (2008): Effect of low-molecular additives on precipitation of potato fruit juice proteins under different temperature regimes. *Journal of Food Process Engineering* 31: 533-547.