

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Rostlinné biotechnologie

Katedra: Rostlinné výroby a agroekologie
Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium proteinové skladby hlíz vybraných
kulturních druhů rodu *Solanum*

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

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

Autor: Bc. Adéla Brabcová

České Budějovice 2011

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

Jméno a příjmení: **Adéla STAŇKOVÁ**
Osobní číslo: **Z09733**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Rostlinné biotechnologie**
Název tématu: **Studium proteinové skladby hlíz vybraných kulturních druhů rodu *Solanum***
Zadávací katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

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

Informace o skladbě proteinů hlíz na úrovni genotypů druhu *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* jsou v současné době poměrně dostupné. Jak ukazují výsledky nedávných studií hlízové proteiny bramboru mají nejen vysokou nutriční hodnotu, ale mají také potenciál pro uplatnění v potravinářských a biotechnologických aplikacích. V oblastech původního rozšíření zástupců rodu *Solanum* (Střední a Jižní Amerika) jsou však pěstovány také další hlíznaté druhy brambor. Základní data o proteinové skladbě ostatních druhů kulturních brambor jsou však nedostačující, zastaralé nebo zcela chybějí. Cílem DP bude studium skladby proteinů hlíz vybraných kulturních druhů rodu *Solanum*. V souboru hodnocených genotypů budou zastoupeny diploidní druhy *S. phureja* a *S. stenotomum*, *S. goniocalyx*) a pro porovnání také tetraploidní druhy *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* a *S. tuberosum* subsp. *andigenum*. Řešení DP bude probíhat podle následujícího schématu:

1. Napěstování rostlinného materiálu na školitelském pracovišti (ZF JU) ve skleníkových podmínkách (původní reprodukční materiál bude získán z genové banky VÚB Havlíčkův Brod), sklizeň hlíz.
2. Příprava materiálu pro analýzy - produkce hlízové šťávy nebo lyofilizované sušiny, extrakce proteinů podle zavedených protokolů školitelského pracoviště.
3. Provedení laboratorních analýz a experimentálních procedur: obsah N látek (elementární analýza), obsah bílkovin (BCA Protein Assay), nativní a denaturované spektrum proteinů (elektroforetický), chromatografická purifikace a základní biochemická charakterizace hlavního proteinu hlíz patatinu.
4. Základní a statistické zpracování dat, hodnocení a porovnání zjištěných výsledků s výsledky obdobných analýz u dostupných prací mezinárodního významu.

Rozsah grafických prací: 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelstein S.J. (1996): Protein Methods. Wiley-Liss, Inc. New York, 415 p.
Bradshaw J.E, Mackay G.R. (eds.) (1994): Potato genetics. CAB International Wallingford, UK, 552 p.
Kärenlampi S.O., Whie O. (2009): Potato proteins, Lipids, and Minerals. In: Singh J., Kaur L., Advance in potato chemistry and technology, Elsevier Inc. pp. 99-125.
Sharma N., Gruszewski H.A., Park S.-W., Holm D.G, Vivanco J.M. (2004): Purification of an patatin with antimicrobial activity against Phytophthora infestans. Plant Physiology and Biochemistry 42:647-655.
Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gebhardt C. Govers F., Taylor M., MacKerron D., Ross H. (eds.) (2007): Potato biology and biotechnology: advance and perspective, Elsevier Inc., p. 856.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Konzultant diplomové práce: **Ing. Veronika Bártová, Ph.D.**
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Datum zadání diplomové práce: **25. ledna 2010**
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2010**

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

L.S.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 25. ledna 2010

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci „Studium proteinové skladby hlíz vybraných kulturních druhů rodu *Solanum*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

29. dubna 2011 v Českých Budějovicích

.....

DEDIKACE

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci řešení výzkumných projektů GAJU 064/2010/Z, GAČR 522/09/1693 a NAZV QI191A069.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala zejména vedoucímu práce doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za pomoc v průběhu celé práce, odborné rady a připomínky, poskytnutí studijních materiálů a fotodokumentaci rostlin v průběhu vegetace. Dále bych ráda poděkovala Ing. Veronice Bártové, Ph.D. za velkou pomoc při práci v laboratoři a odborné rady důležité pro experimentální metody, poskytnutí studijních materiálů a pomoc s překladem abstraktu do anglického jazyka. Ráda bych také poděkovala VÚB Havlíčkův Brod, konkrétně Ing. Vendulce Horáčkové, CSc. za poskytnutí hlízového materiálu.

Také bych ráda poděkovala Ing. Andree Kamenové, Bc. Zuzaně Reicheltové a Ing. Lucii Jílkové za vytvoření příjemného pracovního prostředí a dobrou náladu v laboratoři. Mé díky také patří mému manželovi Milánkovi.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá skladbou bílkovin hlíz kulturních druhů rodu *Solanum*.

V souboru hodnocených genotypů byly zastoupeny diploidní druhy *Solanum phureja*, *Solanum stenotomum* a *Solanum goniocalyx* a dále tetraploidní druhy *Solanum tuberosum* subs. *tuberosum* a *Solanum tuberosum* subs. *andigenum*.

U těchto zástupců byl laboratorními technikami a experimentálními procedurami stanoven obsah dusíkatých látek, který se u vybraných druhů pohyboval od 4,81 (*Solanum goniocalyx*) – 34 % (*Solanum phureja*) a obsah bílkovin, který se pohyboval v rozpětí 4,21 (*Solanum goniocalyx*) – 7,86 (*Solanum phureja*) %. Dále byla stanovena bílkovinná spektra a provedena purifikace hlavní bílkoviny hlíz patatinu. Analýzou SDS-PAGE byly detekovány bílkoviny patatinového komplexu v rozpětí od 38 – 43 kDa. Frakcionací hlízových bílkovin byla jako nejrozšířenější frakce u všech druhů zjištěna frakce albuminová, jejíž relativní podíl byl 31,3 – 36,3 %. Bylo zjištěno, že v této frakci se vyskytují výhradně bílkoviny s molekulovou hmotností v oblasti patatinu.

Abstract

The diploma thesis is focused on evaluation of tuber protein spectra characteristics of selected cultivated *Solanum* species. The collection of evaluated genotypes included both, diploid species (*Solanum phureja*, *Solanum stenotomum*, *Solanum goniocalyx*) and tetraploid species (*Solanum tuberosum* subs. *tuberosum* and *Solanum tuberosum* subs. *andigenum*).

The content of nitrogenous matters and content of proteins in tubers of these studied species ranged from 4.81 (*Solanum goniocalyx*) to 34 (*Solanum phureja*) % and from 4.21 (*Solanum goniocalyx*) to 7.86 (*Solanum phureja*) %, respectively. Next, the spectra of tuber proteins were studied and patatin proteins were purified from tubers of the selected potato species. Using of SDS-PAGE analysis revealed patatin proteins in area of 38 – 43 kDa. Fractionation of tuber protein of studied potato species confirmed the albumin fraction as the main tuber protein fraction with relative abundance ranging from 31.3 to 36.3 %. The albumin fraction included mainly proteins with molecular mass in patatin area.

Obsah

1. Úvod	10
2. Literární přehled	12
2.1 Brambor hlíznatý (<i>Solanum tuberosum</i>)	12
2.2 Dusíkaté látky hlíz brambor	12
2.3 Hlízové bílkoviny	14
2.3.1 Patatin – struktura a charakteristika	14
2.3.1.1 Enzymová aktivita patatinu	15
2.3.1.2 Využití patatinu	15
2.3.2 Inhibitory proteáz	15
2.3.3 Ostatní bílkoviny	16
2.3.4 Vlivy působící na množství a kvalitu bílkovin v hlízách	17
2.4 Nutriční hodnota bílkovin hlíz brambor	17
2.5 Charakteristika vybraných kulturních druhů rodu <i>Solanum</i>	18
2.6 Možnosti využití kulturních druhů rodu <i>Solanum</i> ve šlechtění rostlin	21
3. Cíle práce	22
4. Materiál a metody	23
4.1 Produkce hlízového materiálu	23
4.1.1 Zpracování vzorků hlíz	23
4.2 Stanovení obsahu dusíkatých látek v sušině hlíz brambor	24
4.3 Stanovení obsahu bílkovin v sušině hlíz brambor	25
4.3.1 Extrakce vzorků	25
4.3.2 Konstrukce kalibrační křivky	25
4.3.3 Měření koncentrace bílkovin pomocí BCA	26
4.4 Elektroforetická analýza bílkovin hlíz brambor	27
4.4.1 SDS-PAGE	27
4.4.2 Čipová elektroforéza a stanovení relativní abundance patatinu	28
4.4.3 Nativní PAGE	29
4.5 Frakcionace hlízových bílkovin	30
4.6 Chromatografická purifikace patatinu	31
4.6.1 Iontovýmienná chromatografie	31
4.6.2 Afinitní chromatografie	32
4.6.3 Odsolení patatinu	33
4.7 Vyhodnocení dat	33
5. Výsledky	34
5.1 Hmotnost a sušina hlíz (%)	34

5.2 Stanovení obsahu dusíkatých látek a bílkovin v sušině hlíz brambor	34
5.3 Vyhodnocení elektroforetických profilů hlízových bílkovin.....	37
5.3.1 SDS-PAGE	37
5.3.2 Čipová elektroforéza	40
5.3.3 Nativní spektrum.....	42
5.4 Frakcionace hlízových bílkovin.....	44
5.5 Purifikace patatinu	46
6. Diskuse	47
6.1 Obsah dusíkatých látek a bílkovin v sušině hlíz vybraných druhů brambor	47
6.2 Spektra hlízových bílkovin získaná elektroforetickými metodami.....	47
6.3 Frakcionace hlízových bílkovin.....	48
6.4 Purifikace patatinu	49
7. Závěr.....	50
8. Seznam použité literatury	52
9. Přílohy	59
9.1. Mapa výskytu kulturních a planých druhů a fotografická dokumentace	59
9.2 Složení jednotlivých pufrů a roztoků	61
9.3 Frakcionace hlízových bílkovin u vybraných druhů z rodu <i>Solanum tuberosum</i>	63

1. Úvod

Brambory byly do Evropy dovezeny z Jižní Ameriky v 16. století. V roce 1934 určil Vavilov dvě genová centra zkulturnění bramboru a to Andské centrum, které zahrnuje oblasti Peru a Bolívie, a Chilské centrum, zahrnující oblast Chile a přilehlá pobřeží. Bukasov (1971) označil kulturní druh z Andského centra jako *Solanum andigenum*. Hybridizací mezi jeho formami vznikl v oblasti Chile druh *Solanum tuberosum*. Tento druh je považován za předchůdce evropských odrůd bramboru. Hawkes (1978) sloučil oba druhy pod společný název *Solanum tuberosum*, u kterého uvádí dva poddruhy a to ssp. *andigenum* a ssp. *tuberosum*.

Na našem území jsou dochovány záznamy o pěstování brambor z poloviny 17. století, více se však jejich pěstování rozšířilo na počátku 19. století. Význam v této době měly brambory zejména v odstranění nebezpečí kurdějí a hladu.

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* subs. *tuberosum*) patří mezi oblíbenou plodinu s vysokou výnosovou schopností v celosvětovém měřítku. I když spotřeba brambor v České republice oproti roku 2009 dle ČSÚ klesla o 6,5 kg na 64,9 kg na osobu za rok, patří stále mezi základní potraviny našeho jídelníčku. Nyní mezi největší pěstitele dle údajů FAO patří Čína, Rusko a Indie, v EU pak Německo, Polsko a Nizozemí. Hlízy, jako zásobní a reprodukční orgán rostliny, jsou důležitou potravinou a průmyslovou surovinou pro zpracovatelský průmysl na výrobu bramborového škrobu. Hlízy brambor mají nutričně nejhodnotnější bílkoviny rostlinného původu a pro výživu obyvatelstva mají díky vyšší spotřebě nezanedbatelný význam. Hlízy bramboru mají také vhodný obsah sacharidické složky, vitamínů (zejména vitamínů C) a minerálních látek (zejména K a Mg). Ve výživě člověka plní funkci sytící i ochrannou. Brambory patří mezi plodiny s nízkým obsahem sušiny a s ní spojenou nízkou energetickou hodnotou a jsou tedy vhodnou potravinou pro dietní stravování.

Druh *Solanum tuberosum* subs. *tuberosum*, který je tetraploidní ($4n = 48$) a v Evropě nejrozšířenější není však jediným druhem, který má význam a využití. Velký význam mohou mít druhy, které se pěstují v oblastech původního rozšíření v Jižní Americe a z 80 % jsou diploidní ($2n = 24$). Tyto diploidní kulturní druhy (v angl. wild potato velmi široký pojem, který zahrnuje druhy, které nelze označit jako tzv. cultivated tedy

kulturní) mají využití ve šlechtění jako genetické zdroje rezistence proti biotickým a abiotickým faktorům a mohou také sloužit jako donoři nejrůznějších kvalitativních vlastností – např. některé linie *S. phureja* jsou uvažovány jako zdroj pro zvýšení obsahu karotenoidů a látek s antioxidantní aktivitou. Základní data o bílkovinné skladbě u těchto druhů jsou však nedostačující, zastaralé nebo chybějí úplně. Touto prací se alespoň malým dílem bude snažit přispět k informačnímu obohacení dané problematiky.

2. Literární přehled

2.1 Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum*)

Brambor hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) je botanicky řazen do rodu lilek (*Solanum*), čeledě lilkovitých (*Solanaceae*). Je jednoletou bylinou s hranatou, bohatě větvenou lodyhou s krátkými chlupy dorůstající až 1,5 m. Listy jsou lichozpeřené, květy bílé až fialové se žlutými tyčinkami. Plodem jsou bobule, které mají zelenou až žlutozelenou barvu a bílá semena. Kořenová soustava je tvořena svazčitými kořeny a hlízami. Morfologicky mají hlízy nejčastěji kulatý až oválný tvar se světle hnědou pokožkou a světlou dužinou. Velikost, tvar a barva hlíz je však závislá na odrůdě. Průměrné složení hlíz po uvaření ve slupce na 100 g je 77 g vody, 1,87 g bílkoviny, 5 mg vápníku, 0,1 g tuku, 379 mg draslíku, 150 mg vitamínu C, 44 mg fosforu, 0,31 mg železa, 1,44 mg niacinu, 0,106 mg thiaminu a 0,02 mg riboflavinu (VOKÁL et al. 2000, SINGHT and KAUR 2009).

Brambory se rozmnožují vegetativně hlízami nebo generativně semeny. V České republice se v rámci pěstování rozmnožují výhradně vegetativně a generativní množení se využívá ve šlechtění (VOKÁL et al. 2000). Mateřské hlízy po vyčerpání uložených zásob v průběhu vegetace odumírají společně s podzemními a nadzemními orgány mimo semena a dceřiné (nové) hlízy s živými spícími pupeny (RYBÁČEK et al. 1988).

2.2 Dusíkaté látky hlíz brambor

Dusíkaté látky obsažené v bramborové hlíze představují jeden z nejvýznamnějších komplexů sloučenin. Vytvářejí nutriční a kalorickou hodnotu bramborové hlízy. Mezi dusíkaté látky obsažené v bramborových hlízách patří bílkoviny, volné aminokyseliny (15 %), amidy (23 %) a ostatní dusíkaté látky, jako jsou glykoalkaloidy, sekundární metabolity aj. (BÁRTA and BÁRTOVÁ 2007).

Nejdůležitějším podílem komplexu dusíkatých látek je tzv. čistá bílkovina, jejíž obsah se pohybuje v průměru okolo 58 % celkového obsahu dusíkatých látek. Úloha bílkovin v metabolismu je nezastupitelná. Hrají významnou roli v interakci s ostatními složkami

v rostlině, jako jsou cukry, fenoly, hormony apod. Význam také spočívá v její vysoké biologické hodnotě, která se blíží vaječné bílkovině (ZRŮST 2004).

Významnou složku tohoto komplexu tvoří dusičnany, které představují asi 4 % z celkového dusíku. K jejich tvorbě dochází při nadměrné nabídce dusíku v půdě, který rostliny nestačí využít na tvorbu aminokyselin s následnou syntézou bílkovin (MÍČKA and BEČKA, 1984). Množství dusičnanů je stanoveno jako dusičnanový anion (NO_3^-) a dle Zákona č. 110/1997 Sb. o potravinách, je nejvyšší přípustné množství dusičnanů u raných brambor (od 16.5 do 30.6) 500 mg.kg^{-1} původní hmoty a po tomto datu 300 mg.kg^{-1} . Brambory však nepatří k plodinám, které by byly schopny nadměrně akumulovat dusičnany a jejich obsah také výrazně klesá k minimu po tepelné úpravě hlíz (snižuje se i po jejich oloupaní). I přes nízké hodnoty může v celkovém příjmu dusičnanů vést k nežádoucí zdravotní zátěži (JŮZL et al. 2008). Obsah dusíkatých látek může záviset na odrůdě a podmínky prostředí mohou měnit odrůdovou fixaci. Vedle odrůdy je tedy obsah dusíkatých látek také závislý na dávce dusíkatého hnojiva (MÍČKA et al. 1991). Dusíkaté látky nejsou v hlíze rovnoměrně rozděleny a jejich obsah se mění i v souvislosti s velikostí hlízy. Rozdíly byly zjištěny i mezi apikální a bazální částí hlízy (JŮZL et al. 2008). Volné aminokyseliny a jejich amidy mají význam pro metabolismus dusíku v bramborách. Volné aminokyseliny mají také velký vliv na chuť brambor – zesilují účinky chutě jiných sloučenin a různé aminokyseliny mají vlastní chuť od neutrální (př. izoleucin, lysin, serin aj.), hořkou (leucin, tryptofan, tyrosin aj.) až sladkou (prolin, alanin). Celkový obsah aminokyselin je závislý především na odrůdě a podíly jednotlivých aminokyselin se mohou měnit (ZRŮST 2004).

Steroidní glykoalkaloidy (SGA) jsou toxické sloučeniny, vyskytující se ve všech pletivech bramboru. Hlavními SGA v bramborách jsou α , β , γ solanin a α , β , γ chaconin. V hlíze je největší podíl těchto látek obsažen ve slupce a ve vnějších vrstvách (JŮZL et al. 2008). Horní hranice obsahu solaninu a chaconinu je dle zákona o potravinách 200 mg.kg^{-1} .

2.3 Hlízové bílkoviny

Bílkovina hlíz, patřící nutričně mezi nejhodnotnější, je určována aminokyselinovou skladbou a to zejména obsahem esenciálních aminokyselin (RYBÁČEK et al. 1988, BURLINGAME et al. 2009). Bílkovina hlíz, která není homogenní složkou, může být klasifikována dle Osborna na základě rozpustnosti na albuminovou, globulinovou, prolaminovou a glutelinovou frakci (JIDEANI et al. 1994, CHANPUT et al. 2009), nebo mohou být tyto frakce hlízových bílkovin klasifikovány pomocí elektroforetických metod, jako je například SDS-PAGE, která je nejvýznamnější. POTS (1999) na základě spekter, které získal pomocí této techniky, definoval tři základní skupiny a to patatin (bílkovina patatinového komplexu), inhibitory proteáz a ostatní bílkoviny.

2.3.1 Patatin – struktura a charakteristika

Skupinu patatinových bílkovin poprvé izolovali Racusen a Foote (publikováno v roce 1980) pomocí iontovýměnné a afinitní chromatografie (BÁRTA and ČURN 2004).

Patatin je označení pro skupinu imunologicky identických bílkovin vztahující se na glykoproteiny s molekulovou hmotností 40 kDa a představuje 40 % z celkových bílkovin v hlízách brambor (SHEWRY 2003). V hlíze je patatin lokalizován v centrálních vakuolách parenchymatických buněk a jeho funkce je především zásobní. Kromě zásobní funkce má patatin také enzymovou aktivitu (BÁRTA and BÁRTOVÁ 2008, JIMÉNEZ-ATIÉNZAR et al. 2003). V nativní formě je dimer s přibližnou molekulovou hmotností 80 kDa respektive 88 kDa (RACUSEN and WELLER 1984). Hodnota isoelektrického bodu bílkovin patatinového komplexu se nachází v rozpětí 4,6 – 5,2. Patatin je vysoce strukturovaná molekula a tato strukturální integrita molekuly je zachována až do pH = 6 a při teplotě do 28°C (POTS 1999).

Vzhledem k vysokému stupni homologie mezi genovými rodinami kódujícími bílkoviny patatinového komplexu a identickou imunologickou odpovědí je patatin reprezentován jako jeden bílkovinný druh. Přesto byla mezi odrůdami zjištěna nábojová heterogenita a při elektroforetické separaci tak může být zjištěn rozdílný počet pruhů, který představují jednotlivé isoformy v patatinové oblasti. (LEE et al. 1983, POTS 1999, BÁRTA and BÁRTOVÁ 2008). LEHESRANTA et al. (2005) identifikoval 9 patatinových

isoforem u odrůdy Desiree a BAUW et al. (2006) dokonce 17 isoforem u odrůdy Kuras. U patatinu byla také zjištěna antioxidační aktivita a také alergenní schopnost, která je snižována tepelnou úpravou (AL-SAIKHAN et al. 1995, SEPALLA et al. 1999, LIU et al. 2003). BAREL and GINZBERG (2008) také uvádějí protiplísňové a pesticidní aktivity.

2.3.1.1 Enzymová aktivita patatinu

Patatin v hlízách brambor má zejména zásobní funkci. V odborných publikacích byla rovněž potvrzena enzymová aktivita bílkovin patatinového komplexu. TONÓN et al. (2001) a RYDEL et al. (2003) uvádí β - 1,3 - glukánázovou aktivitu, PEYER et al. (2004) β - 1,2 -xylosidázy, SENDA et al. (1996) fosfolipázovou aktivitu a KORMUŤÁK et al. (1999) esterázovou aktivitu.

2.3.1.2 Využití patatinu

Bílkoviny patatinového komplexu mohou být použity pro své vlastnosti v potravinářském průmyslu a to při výrobě instantních polévek, omáček nebo sušených výrobků z brambor, kde zvyšují výživnou hodnotu a zvýrazňují chuť, dále pak v krmivářském nebo farmaceutickém průmyslu. Mají také schopnost tvorby pěn a emulzí a mohou být využity pro stabilizaci potravinářských pěn a emulzí (BÁRTA and BÁRTOVÁ 2007, KONINGSVELD et al. 2006). Jejich uplatnění je také možné v biotechnologických výrobních procesech, ve kterých se využívá enzymových vlastností nativního patatinu (BÁRTA and ČURN 2004).

2.3.2 Inhibitory proteáz

Inhibitory proteáz, vyskytující se přirozeně, jsou klasifikovány na základě enzymů, které inhibují (RYAN 1990, HANUSOVÁ and ČURN 2007). Dále mohou být děleny na základě jejich molekulové hmotnosti, stavby proteinu, isoelektrického bodu a počtu disulfidických můstků v molekule (POUVREAU et al. 2001). Na základě těchto kritérií POUVREAU et al. (2001) rozdělili inhibitory proteáz do 7 tříd a to: bramborový inhibitor I (PI-1), bramborový inhibitor II (PI-2), bramborový inhibitor karboxypeptidázy (PCI),

bramborový inhibitor aspartátových proteáz (PAPI), bramborový inhibitor cysteinových proteáz (PCPI), bramborový inhibitor proteáz Kunizova typu (PKPI) a ostatní inhibitory serinových proteáz (OSPI). Molekulové hmotnosti, isoelektrické body a hlavní inhibovaný enzym jednotlivých tříd jsou popsány v tab. č. 1.

V rostlinách se zapojují do obranného mechanismu a mají také zásobní funkci. Pokud dojde u rostliny k poranění nebo napadení patogenem, dochází k nárůstu inhibitorů proteáz (LAWRENCE et al. 2002). Inhibitory proteáz (zejména PI-I, PI-II a inhibitory Kunizova typu) vykazují také antimikrobiální a insekticidní účinky a mohou být tedy účinné proti fytopatogenním houbám a hmyzu (HERMOSA et al. 2006). Je tedy možné jejich využití v genovém inženýrství kulturních plodin (BÁRTA and BÁRTOVÁ 2007).

Tab. č. 1: Vlastnosti jednotlivých tříd inhibitorů proteáz (převzato a upraveno dle Hanusová and Čurn 2007)

Skupina	MW (kDa)	pI	Hlavní inhibovaný enzym
PI-I	35-40	5,1-7,8	chymotrypsin
PI-II	20,5	5,5-5,9	trypsin
PCPI	20,1-22,8	5,8-9	papain
PAPI	19,9	8,2	cathepsinD
PKPI	20,2	8-9	trypsin
PCI	4,3	-	karboxypeptidáza A
Ostatní	21-24	7,5-8,8	trypsin, chymotrypsin, elastáta

2.3.3 Ostatní bílkoviny

Jako ostatní bílkoviny označil POTS (1999) takové bílkoviny, které na základě jejich vlastností nelze zařadit k bílkovinám patatinového komplexu nebo inhibitorům proteáz. K ostatním bílkovinám jsou řazeny bílkoviny s molekulovou hmotností nad 45 kDa, kam patří například hlízový lektin (100 kDa), polyfenoloxidáza (60 a 69 kDa), kináza a také enzymy účastníci se syntézy škrobu a fosforylované isoenzymy (KONINGSVELD 2002). Velmi významný je zejména rostlinný lektin, který se účastní ochrany rostlin před infekcemi a to tak, že inhibuje růst hub majících ve vnější stěně chitin (VODRÁŽKA 2002).

2.3.4 Vlivy působící na množství a kvalitu bílkovin v hlízách

Na množství a kvalitu celkových dusíkatých látek může mít vliv celá řada faktorů, k nimž patří prvé řadě genotyp, dále pak podmínky a technologie pěstování (zejména hnojení dusíkem), vliv stanoviště a charakter půdy, ročníkové vlivy, skladování. Také záleží na stavu hodnocených hlíz – stupni zralosti, velikosti, hmotnosti (BÁRTA and BÁRTOVÁ, 2007).

2.4 Nutriční hodnota bílkovin hlíz brambor

Bílkoviny hlíz brambor mají vysokou nutriční hodnotu a to i přes denaturaci bílkovin během zpracování. Patří mezi nejhodnotnější bílkovinu rostlinného původu, jejíž hodnota je dána především esenciálními aminokyselinami.

Tab. č. 2: Zastoupení aminokyselin v bílkovinách hlíz bramboru v porovnání s bílkovinou vaječnou

Převzato a upraveno z Velíšek and Hajšlová (2009) a doplněno dle údajů FAO

Aminokyselina	Zastoupení (%) v hlízách	Vaječná bílkovina (%)
Alanin	4,62 – 5,32	5,9
Arginin	4,74 – 5,70	6,1
Asparťová kyselina	11,9 – 13,9	9,6
Cystein	0,20 – 1,25	2,4
Glutamová kyselina	10,2 – 11,8	12,7
Glycin	4,30 – 6,05	3,3
Histidin	2,10 – 2,50	2,4
Isoleucin	3,73 – 5,80	6,3
Leucin	9,70 – 10,3	8,8
Lysin	6,70 – 10,1	7,0
Methionin	1,20 – 2,15	3,4
Fenylalanin	4,80 – 6,53	5,7
Prolin	4,70 – 4,83	4,2
Serin	4,90 – 5,92	7,6
Threonin	4,60 – 6,50	5,1
Tryptofan	0,30 – 1,85	1,6
Tyrosin	4,50 – 5,68	4,2
Valin	4,88 – 7,40	6,8

2.5 Charakteristika vybraných kulturních druhů rodu *Solanum*

Tetraploidní druhy

***Solanum tuberosum* subs. *tuberosum*, odrůda Desireé**

Desirée je polopozdní až pozdní odrůda varného typu BC. Je vhodná pro zpracování na smažené výrobky a pro přímý konzum. Hlízy má oválné s červenou slupkou a světle žlutou dužinou. Je rezistentní proti napadení rakovinou brambor (patotyp 1) a naopak k napadení háďátkem bramborovým (patotyp Ro 1) náchylná. V České republice byla registrována v roce 1989, udržovatelem je HZPC Holland B.V., Joure, NL a zástupcem pro ČR je MEDIPO AGRAS H.B. , spol. s.r.o. Havlíčkův Brod. Rodičovská kombinace je Urgenta x Depesche (<http://www.katalogbrambor.cz/katalog/detail/135>, ČERMÁK 2009)

***Solanum tuberosum* subs. *andigena* (Juz. and Bukasov)**

Tento druh, označovaný také jako *Solanum andigenum*, je pěstován především v Jižní a Střední Americe (Argentina, Venezuela). Vznikl zřejmě křížením (chromosomovým zdvojnásobením nebo křížením diploidních druhů s chromosomovým zdvojnásobením) *Solanum stenotomum* (2n) se *Solanum sparsipilum* (2n), který je považován za jeden ze čtyř původních planých druhů. Tento tetraploidní druh byl lidmi zanesen do jižního Chile, kde se adaptoval na dlouhý den a zde se z tohoto druhu vyvinul *Solanum tuberosum* subs. *tuberosum*. Hlízy jsou oválné se světle hnědou slupkou. U tohoto druhu byly nalezeny geny pro rezistenci k háďátku bramborovému (*Globodera rostochiensis*) a k háďátku nažloutlému (*Globodera pallida*) (BRADSHAW et al. 1994, JELLIS and RICHARDSON 1987).



Obr. č. 1 : *Solanum tuberosum*, odrůda Desiree



Obr. č. 2 : *Solanum andigenum*

Zdroj: <http://www.katalogbrambor.cz/katalog/detail/135> Foto: Jan Bárta

Diploidní druhy

***Solanum goniocalyx* (Juz. and Bukasov)**

V literatuře je často označován jako *Solanum stenotomum* subs. *goniocalyx*, jelikož se od tohoto druhu oddělil. Pěstován je v severním Peru a střední Bolívii. Hlízy jsou oválné se světle hnědou slupkou a žlutou dužinou (LISIŇSKA and LESZCZYŇSKI 1989).

***Solanum phureja* (Juz. and Bukasov)**

Solanum phureja podobně jako *Solanum goniocalyx* vznikl z druhu *Solanum stenotomum*. Pěstuje se převážně ve Venezuele a střední Bolívii. Hlízy jsou oválné s fialovými skvrnami na slupce. U hlíz neprobíhá stádium dormance. U tohoto druhu byly nalezeny geny rezistence proti virům (PLVR, PVY) a plísni bramborové (*Phytophthora infestans*) (FRANCO-LARA and BARKER 1999, BRADSHAW et al. 1994).

***Solanum stenotomum* (Juz. and Bukasov)**

Tento druh je pěstován ve vysokohorských oblastech Peru a Bolívie. Byl vyselektován z původního diploidního planého druhu *Solanum leptophyes*. Některé formy jsou mrazuvzdorné (LISIŇSKA and LESZCZYŇSKI 1989, BRADSHAW et al. 1994).



Obr. č. 3: *Solanum goniocalyx*
Foto: Jan Bárta

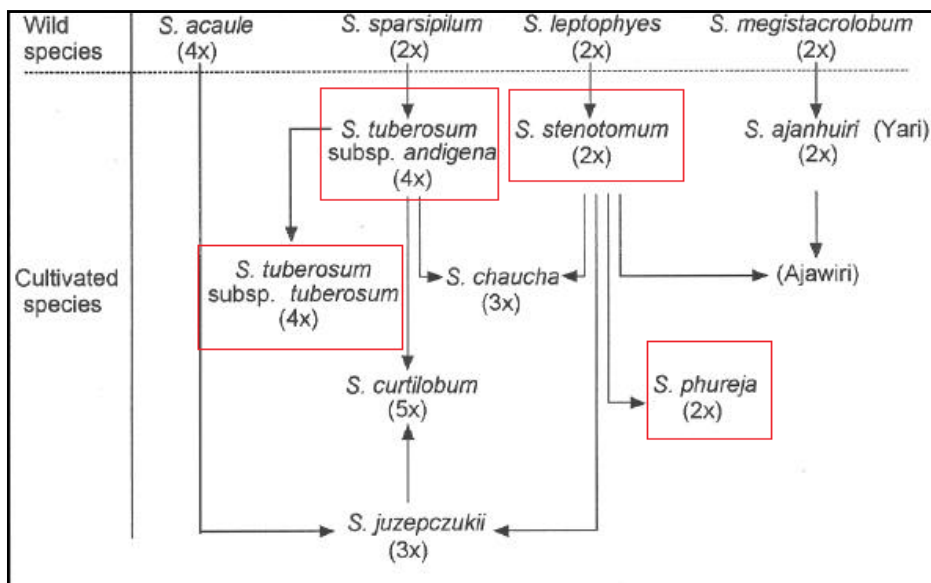


Obr. č. 4: *Solanum phureja*
Foto: Jan Bárta



Obr. č. 5: *Solanum stenotomum*
Foto: Jan Bárta

Obr. č. 6: Nejlépe evoluční vztah mezi jednotlivými druhy vyznačuje schéma převzaté od Hawkes (1994)



Z uvedeného schématu (obr. č. 6) vyplývá, že *Solanum tuberosum* subs. *andigena* (4n) vznikl z planého diploidního druhu *Solanum sparsipilum*, podobně jako *Solanum stenotomum* (2n) vznikl z planého diploidního druhu *Solanum leptophyes*. Z tetraploidního druhu *Solanum tuberosum* subs. *andigena* se vyvinul *Solanum tuberosum* subs. *tuberosum* a ze *Solanum stenotomum* se vyvinul druh *Solanum phureja*.

2.6 Možnosti využití kulturních druhů rodu *Solanum* ve šlechtění rostlin

Druhy bramboru představují různorodý genofond, který je využíván jako zdroj rezistence pro šlechtění rostlin vůči biotickým a abiotickým činitelům. Počátky moderního šlechtění jsou datovány v roce 1807 v Anglii, kde Knight zaznamenal první hybridizaci mezi odrůdami po umělém opylení (SINGH and KAUR 2009). Šlechtění brambor začalo také ve 30. letech 20. století v Číně a Indii a právě tyto země jsou nyní hlavními producenty brambor na světě (JIN et al. 2004).

Brambory byly asi jednou z prvních plodin, u které byly započaty pokusy na šlechtění vůči chorobám (BRADSHAW and MACKAY 1994). Jedním z důvodů bylo masivní rozšíření plísně bramborové (*Phytophthora infestans*) v Irsku v letech 1845-1851, které je označováno jako „Velký hladomor“ a další rozšíření epidemie do Velké Británie a Evropy.

Byly nalezeny geny rezistence vůči biotickým i abiotickým činitelům u mnoha druhů rodu *Solanum*. U druhu *Solanum phureja* byla například nalezena rezistence proti *Phytophthora infestans* (plíseň bramborová), *Pseudomonas solanacearum*, *Erwinia carotovora* (bakteriální vadnutí), virus X a Y (mozaiky) (HAWKES 1990, ROSS 1986). Rezistence proti plísni byla také nalezena například u *Solanum demisum* nebo *Solanum stoloniferum*, rezistence proti virům u *Solanum chacoense* nebo *Solanum acaule* a rezistence proti hádátku bramborovému (*Globodera rostochiensis* a *Globodera pallida*) u *Solanum spegazinii* (BRADSHAW 2007).

3. Cíle práce

Cíle diplomové práce byly dle zadání rozděleny do 4 okruhů:

1. Získání rostlinného materiálu z *in vitro* kultury a napěstování rostlinného materiálu ve skleníkových podmínkách, sklizeň hlíz
2. Příprava lyofilizované sušiny a extrakce bílkovin pro jednotlivé analýzy
3. Provedení laboratorních analýz
 - stanovení obsahu dusíkatých látek (%) a obsahu bílkovin (%)
 - analýza hlízových bílkovin vybraných kulturních druhů brambor s využitím elektroforetických technik
 - chromatografická purifikace a základní biochemická charakterizace hlavní bílkoviny hlíz patatinu
 - frakcionace hlízových bílkovin a určení zastoupení jednotlivých frakcí
4. Statistické vyhodnocení dat, hodnocení a porovnání výsledků

4. Materiál a metody

4.1 Produkce hlízového materiálu

Genotypy zvolených druhů (tab. č. 3) byly získány z Genové banky bramboru *in vitro*, udržované ve VÚB Havlíčkův Brod. Kolekce je uchovávána v režimu dlouhodobé kultivace, při teplotě 10° C. Vzorky byly převedeny z chladových podmínek do prostředí pro běžnou kultivaci. K převodu byly použity rašící mikrohlízky po periodě dormance nebo jejich výhony, případně segmenty zachovalých stonků. Materiál byl množen pasážováním pomocí nodálních řízků na agarovém živném médiu MS se 3 % sacharózy, bez růstových regulátorů a kultivace rostlin probíhala při teplotě 20°C. *In vitro* namnožené, zakořeněné rostliny všech vybraných genotypů byly při výšce cca 4 – 5 cm převedeny do podmínek *in vivo* ve skleníku. K zakořenění v půdním substrátu bylo použito plastových sadbovačů a následně byly rostliny přesazeny do kultivačních nádob. Výsadba byla provedena v měsíci únoru, tak aby bylo podpořeno lepší nasazování hlíz, vázané u většiny tohoto materiálu na období krátkého dne. Hlízy byly sklizeny až po samovolném ukončení vegetace jednotlivých genotypů v měsících říjen až prosinec. Všechny genotypy nasadily hlízy, které byly použity k plánovaným analýzám.

Tab. č. 3: Vybrané druhy rodu *Solanum*

Druh	Genotyp
<i>Solanum andigenum</i>	SLO, 00235
<i>Solanum goniocalyx</i>	701830, Garhuas huayro, 00109
<i>Solanum phureja</i>	703295, Griola negra, 00136
<i>Solanum stenotomum</i>	AD 2-1, 00001
<i>Solanum tuberosum</i> , odrůda Desiree	243

4.1.1 Zpracování vzorků hlíz

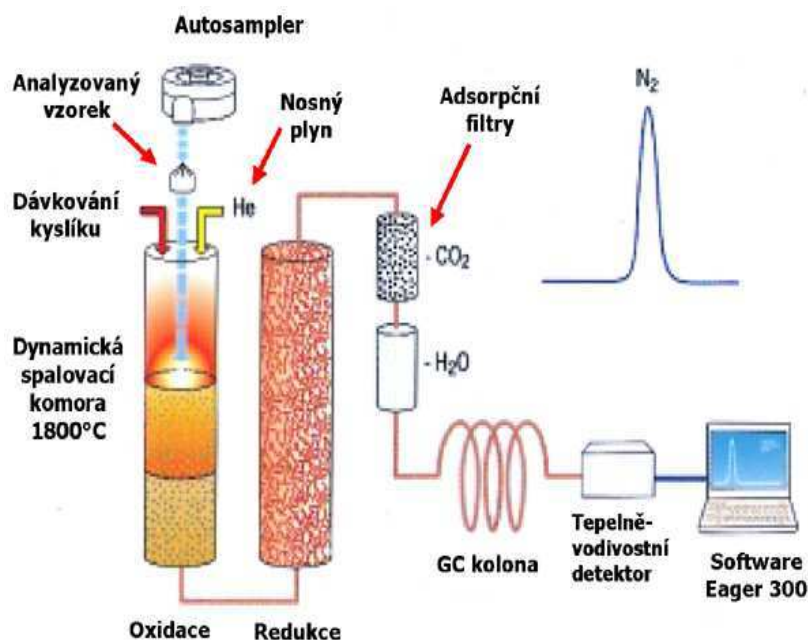
Odebrané vzorky hlíz byly důkladně omyty a osušeny a poté byly rozkrájeny na plátky tenké asi 2 mm. Tyto plátky byly ihned navažovány do dóz o známé hmotnosti.

Materiál byl zmražen v mrazicím boxu na -20°C a poté lyofilizován (ALPHA Martin Christ, Německo) do té doby, dokud vzorek nebyl zcela vysušen do konstantní hmotnosti. Homogenizace vzorku byla provedena pomocí laboratorního mlýnku nebo pomocí třecí misky. Homogenizované vzorky byly uchovány při pokojové teplotě v řádně uzavřených dózách pro zamezení přístupu vlhkosti.

4.2 Stanovení obsahu dusíkatých látek v sušině hlíz brambor

Bylo naváženo 25 mg vzorku vždy ve dvou opakováních a následně byla provedena analýza modifikovanou Dumasovou metodou (přístroj Flash EA 1112, ThermoQuest, USA/Itálie). Po provedení analýzy byl obsah celkového dusíku přepočten dle koeficientu $N \times 6,25$ na obsah dusíkatých látek ve vzorku.

Obr. č. 7: Schéma znázorňující analýzu celkového dusíku



4.3 Stanovení obsahu bílkovin v sušině hlíz brambor

4.3.1 Extrakce vzorků

K naváženému množství 50 mg homogenizovaného lyofilizátu bylo do 2 ml mikroskopické pipety přidáno 500 µl vychlazeného extrakčního pufru (viz příloha, kapitola 9.2). Směs byla důkladně promíchána a vzorky ponechány v lednici po dobu 4 hodin, v průběhu kterých byl materiál několikrát protřepán. Po uplynutí doby extrakce byla provedena centrifugace (6 000 rpm, 4°C, 5 minut), supernatant přenesen do 1,5 ml mikroskopické pipety a povařen 3 minuty ve vodní lázni. Po ochlazení lze vzorek hned použít pro analýzu, nebo jej lze zamrazit (-20°C) pro pozdější analýzu.

4.3.2 Konstrukce kalibrační křivky

Jednotlivé koncentrace BSA (= bovine serum albumin, hovězí sérový albumin) standardu se připraví pomocí ředění extrakčním činidlem s příslušným stupněm zakonzentrování podle poměrů uvedených v tab. č. 4. Výchozím zdrojem BSA je jeho roztok o koncentraci 2 mg/ml (součást kitu BCA Protein Assay Kit, Pierce, USA).

Tab. č. 4: Příprava koncentrační řady BSA standardů

Označení	Objem ředícího pufru (µl)	Objem zdroje BSA (µl)	Konečná koncentrace BSA (µg/ml)
A	125 činidlo č. 1	375 Z	1500
B	325 činidlo č. 2	325 Z	1000
C	175 činidlo č. 3	175 A	750
D	325 činidlo č. 3	325 B	500
E	325 činidlo č. 3	325 D	250
F	325 činidlo č. 3	325 E	125
G	400 činidlo č. 3	100 F	25
H	400 činidlo č. 3	0	0 (blank)

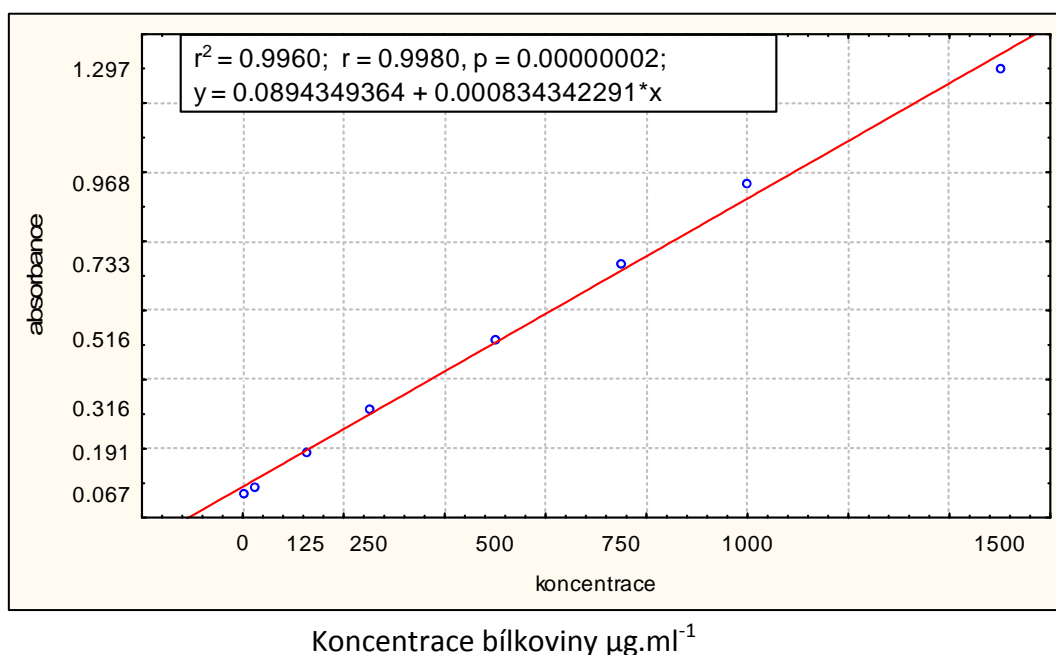
Z = základní koncentrace BSA (2 mg/ml)

Činidlo č. 1 = 4x extrakční činidlo

Činidlo č. 2 = 2x extrakční činidlo

Činidlo č. 3 = 1x extrakční činidlo

Graf č. 1: Kalibrační vztah pro BCA stanovení



4.3.3 Měření koncentrace bílkovin pomocí BCA

K vlastnímu stanovení byl použit analytický kit „BCA Protein Assay Kit“ (Pierce, v ČR zastupuje Genetica), který sestává z: 1 000 ml BCA Reagencie A, 25 ml BCA Reagencie B, sady 10 ampulí standardu BSA (2 mg/ml). Před analýzou se připraví pracovní roztok smícháním reagencie A a B v poměru 50:1.

Do testovací tuby bylo přidáno 0,1 ml supernatantu, ke kterému bylo přidáno 2 ml pracovního roztoku. Směs byla důkladně promíchána a inkubována při 37°C po dobu 30 minut. Po této době byla změřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm. Koncentrace bílkovin ve vzorku byla zjištěna dosazením hodnoty absorbance do získané rovnice a dle uvedeného vzorce byl vypočten obsah bílkovin v sušině hlíz v % :

$$\text{Obsah bílkovin v sušině hlíz (\%)} = (C * V) / (10 * M)$$

C = zjištěná koncentrace bílkovin podle kalibrační křivky v $\mu\text{g/ml}$

V = celkový extrakční objem v ml

M = navážka lyofilizované sušiny hlíz v mg

4.4 Elektroforetická analýza bílkovin hlíz brambor

4.4.1 SDS-PAGE

Příprava gelu

Na SDS-PAGE analýzu (denaturační systém) byl připraven 10% separační a 3,75% zaostřovací gel. Separační gel měl složení: 42 ml dH₂O, 26,6 ml 30% akrylamidu (37,5:1, AppliChem), 10 ml pufru A, 800 µl 10% SDS, 60 µl siřičitanu sodného, 400 µl 15% persíranu amonného a 40 µl tetramethylethyldiamin (Sigma, dále jen TEMED). Zaostřovací gel měl složení 12,15 ml dH₂O, 2,5 ml 30% akrylamidu (37,5:1, AppliChem), 5 ml pufru B, 200 µl 10% SDS, 20 µl siřičitanu sodného, 150 µl 15% persíranu amonného a 15 µl TEMED.

Extrakce a příprava vzorků na SDS-PAGE

Do 2 ml mikrozkušavek bylo naváženo 50 mg homogenizovaného lyofilizátu a přidáno 500 µl extrakčního pufru (viz příloha, kapitola 9.2) s 5 % β-merkaptoethanolu (Sigma). Směs byla důkladně promíchána a vzorky ponechány v lednici na ledu po dobu 4 hodin. Poté byla provedena centrifugace (6000 rpm, 4°C, 10 min.) a supernatant byl přepipetován do nových 1,5 ml mikrozkušavek.

Vyextrahované vzorky byly naředěny do 1,5 ml mikrozkušavek v poměru 20 µl dH₂O + 20 µl vzorku + 10 µl nanášecího pufru (viz příloha, kapitola 9.2) s β-merkaptoethanolem (Sigma). Takto připravená směs byla vařena po dobu 3 minut a v množství 10 µl nanášena na gel. Na gel byl kromě vzorků nanášen také marker ve stejném množství jako vzorky tj. 10 µl.

Průběh SDS-PAGE

Separace byla provedena na deskové vertikální elektroforéze (model SE 600, Hoefer) při 50 mA/gel a napětí cca 120 V v prostředí vanového pufru. Detekce bílkovin na gelu byla provedena pomocí roztoku obsahujícího barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250 a následným odbarvením gelu (cca 4 hodiny) odbarvovacím roztokem. Dále byl gel pro lepší skladovatelnost a vyhodnocení zafixován ve fixačním roztoku.

Složení vanového pufru, barviva, odbarvovacího a fixačního roztoku je uvedené v kapitole 9.2.

4.4.2 Čipová elektroforéza a stanovení relativní abundance patatinu

Čipová elektroforéza byla provedena na přístroji Experion™ pomocí kitu Pro260 Analysis Kit (Bio-Rad, USA). Analytický kit obsahuje reagenty – Pro260 gel (polymerní matice, 520 µl), Pro260 stain (fluorescenční barvivo, 45 µl), Sample buffer (obsahuje horní a dolní zarovnání markerů, 400 µl), Pro260 ladder (proteinový standart, 60 µl), Spin filters (kolonky na filtraci gelů, 3 ks). Postup práce probíhal podle následujících kroků dle návodu výrobce:

1. Příprava gelu (G) a Gel-stain (GS)
2. Příprava Sample buffer (SB) s redukujícím činidlem (β -merkaptoethanol)
3. Příprava ladder a vzorků
4. Příprava čipu
5. Analýza čipu
6. Čištění elektrod

Příprava gelových systémů pro čipovou elektroforézu Gel-Stain (GS) a Filtred Gel (G)

GS – k 520 µl Pro260 gel bylo přidáno 20 µl Pro260 stain a celý objem byl zvortexován (cca 10 sekund) a přepipetován na kolonku (součást kitu) a dále byla provedena centrifugace (5 minut, rpm 10 000, pokojová teplota).

G – 520 µl Pro260 gelu bylo přepipetováno na kolonku a provedena centrifugace (5 min., rpm 10 000, pokojová teplota).

Příprava Sample Buffer (SB)

K 30 µl SB byl přidán 1 µl β -merkaptoethanolu (BME) a takto připravený SB byl zvortexován a zcentrifugován (cca 10 sekund).

Příprava vzorků a Pro260 Ladder

Do 0,5 ml mikrozkušavek byly napipetovány 2 µl vzorku (nebo ladderu) s 4 µl SB, celý objem byl zvortexován a stočen (10 sekund) a takto připravené vzorky i ladder byly uvařeny ve vodě (3 minuty, 95-100°C). K uvařeným vzorkům a ladderu bylo poté přidáno 84 µl dH₂O a opět proveden vortex. Během přípravy čipu byly vzorky uchovávány ve tmě.

Příprava čipu

Příprava čipu probíhala dle návodu výrobce – nejprve byly napipetovány GS a G (12 μ l), poté vzorky a ladder (6 μ l) do přesně vyznačených kolonek. Po aplikaci vzorků byl čip vložen do přístroje a proběhla vlastní analýza.

Obr. č. 8: Ukázka čipu (Bio-Rad, USA)



Stanovení relativní abundance patatinu

Na základě dat poskytnutých po analýze provedené na automatické čipové elektroforéze byla v % vyjádřena abundance všech bílkovinných pruhů zastoupených v celém spektru vybraných druhů. Jakou část v tomto spektru zaujímá patatin, vyjádřenou jako relativní abundanci patatinu, byla zjištěna sečtením naměřených hodnot relativní abundance píků (pravděpodobně jednotlivé isoformy patatinu) detekovaných v oblasti patatinu.

4.4.3 Nativní PAGE

Příprava gelu

Na nativní diskontinuální PAGE (nedenaturační systém) byl připraven 7,5% separační a 3,75% zaostřovací gel. Separační gel měl složení: 50 ml dH_2O , 20 ml 30% akrylamidu (37,5:1, AppliChem), 10 ml pufru A', 60 μ l siřičitanu sodného, 400 μ l 15% persíranu amonného a 40 μ l TEMED (Sigma). Zaostřovací gel měl složení 12,5 ml dH_2O , 2,5 ml

30% akrylamidu (37,5:1, AppliChem), 5 ml pufru B, 20 μ l siřičitanu sodného, 150 μ l 15% persíranu amonného a 20 μ l TEMED.

Extrakce a příprava vzorků na nativní PAGE

Do 2 ml mikrozkušavek bylo naváženo 50 mg homogenizovaného lyofilizátu a přidáno 500 μ l extrakčního pufru (viz příloha, kapitola 9.2). Směs byla důkladně promíchána a vzorky ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Poté byla provedena centrifugace (6000 rpm, 4°C, 10 min.) a supernatant byl přepipetován do nových 1,5 ml mikrozkušavek.

Vyextrahované vzorky byly připraveny v poměru 40 μ l vzorku s 10 μ l nanášecího pufru pro nativní PAGE a v množství 10 μ l nanášeny na gel.

Průběh nativní PAGE

Separace byla provedena na deskové vertikální elektroforéze (model SE 600, Hoefer) při napětí 120 V (10 minut) a poté při 150 V v prostředí borátového pufru (pH 7,2). Detekce bílkovin na gelu byla provedena stejným způsobem jako u SDS-PAGE. Složení borátového pufru je uvedeno v kap. 9.2.

4.5 Frakcionace hlízových bílkovin

Frakcionace bílkovin byla provedena na principu Osbornovy metody dle modifikovaného postupu uvedeného v práci Martinez-Villalueva et al. (2008) postupným „odmýváním“ jednotlivých frakcí bílkovin extrakčními činidly, čímž vzniklo 5 frakcí: 1. frakce albuminů a ve vodě rozpustných nebílkovinných látek, 2. frakce globulinů rozpustných v 5% roztoku K_2SO_4 , 3. frakce prolaminů rozpustných v 70% etanolu, 4. frakce glutelinů rozpustných v 0,03M NaOH, 5. frakce byla tvořena nerozpustným zbytkem.

Materiálem pro frakcionaci bylo 0,5 g lyofilizované sušiny, extrakce jednotlivých extrakčních činidel trvala 1 hodinu při 4°C. Během extrakce bylo nutné směs několikrát protřepat. Po uplynutí doby extrakce byla provedena centrifugace (4°C, 10 min, 4500

rpm). Supernatant byl slit a mezi extrakcemi jednotlivými činidly (dH₂O, 5% roztok K₂SO₄, 70% etanol, 0,03M NaOH) byly zařazeny promývací kroky s využitím dH₂O.

Supernatanty jednotlivých frakcí byly analyzovány na peptidové SDS-PAGE. Použita byla desková vertikální elektroforéza (model SE 600, Hoefer) s diskontinuálním uspořádáním matrice a 16% separační gel (modifikováno dle práce Judd 2002). Detekce bílkovin na gelu byla provedena pomocí roztoku obsahujícího barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250. Centrifugované pelety po postupném paralelním odmyváním jednotlivých frakcí byly lyofilizovány (ALPHA Martin Christ, Německo), gravimetricky vyhodnoceny a pomocí modifikované Dumasovy metody (přístroj Flash EA 1112, ThermoQuest, USA/Itálie) byl stanoven obsah N.

4.6 Chromatografická purifikace patatinu

Purifikace patatinu byla provedena dvoustupňovou chromatografickou purifikací. Prvním stupněm byla iontovýměnná chromatografie s náplní Diethylaminoethyl celulóse (GE Healthcare).

Druhým stupněm byla afinitní chromatografie s concanavalinovou náplní označované jako ConA Sepharose 4B (GE Healthcare). Dalším krokem bylo odsolení patatinu za pomoci gelové filtrační chromatografie s náplní Sephadex G-25 (GE Healthcare).

Složení jednotlivých pufrů pro chromatografii jsou uvedeny v příloze kapitole 9.2 a v tab. č. 10 v kapitole 9.2.

4.6.1 Iontovýměnná chromatografie

Iontovýměnná chromatografie zahrnovala ekvilibraci kolon a nanesení upraveného vzorku, promytí kolon, isokratickou eluci navázaných bílkovin a regeneraci a sanaci kolon. Jednotlivé kroky probíhaly dle následujících bodů:

1. extrakt hlízových bílkovin byl přefiltrován přes filtrační papír, extrakt byl zcentrifugován (5 minut, 9 000 rpm, 4°C) a u extraktu byla provedena kontrola a úprava pH na 7,4 pomocí 1M Tris.
2. Na ekvilibrované kolony (provedeno 25 ml 25 mM Tris-HCl, pH 7,4) s náplní Diethylaminoethyl celulóse byl pomocí pipety nanesen upravený extrakt (10 ml). Po otevření výtokového otvoru kolony byly frakce sbírány do dóz. Ze sebraného objemu bylo odebráno 200 µl pro elektroforetickou (dále jen elfo) kontrolu purifikačního procesu.
3. Poté bylo provedeno promytí kolon 40 ml pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4), přičemž prvních 15 ml bylo ještě sbíráno.
4. Isokratická eluce navázaných bílkovin byla provedena pomocí 20 ml elučního pufru (25 Mm Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M NaCl). Eluát byl sbírán do dóz označených C (po kontrole a úpravě pH byly později ve 2. stupni purifikace aplikovány na kolonu s náplní Con A). Ze sebraného objemu bylo opět odebráno 200 µl pro pozdější elfo kontrolu purifikačního procesu.
5. Regenerace a sanace kolonky byla provedena pomocí 15 ml 1 M NaOH.

4.6.2 Afinity chromatografie

Afinity chromatografie zahrnovala ekvilibraci kolon, nanesení upraveného vzorku, vymytí nenavázaných složek, isokratickou eluci a regeneraci kolon. Přehled pracovních kroků:

1. Ekvilibrace kolony byla provedena 30 ml startovacího pufru a poté byl nanesen vzorek s upraveným pH na 7,4 pomocí 1 M HCl. Při nanesení vzorku byl uzavřen kohout kolony na 10 minut a medium se vzorkem bylo řádně, ale pomalu promícháno.

2. K vymytí nenávaných složek bylo opět použito 30 ml startovacího pufru a médium bylo v tomto pufru opět řádně promícháno.
3. Isokratická eluce navázaných bílkovin byla provedena 25 ml elučního pufru, který byl na kolony přidáván postupně. Při první aplikaci objemu elučního pufru 10 ml byly kohouty kolony na 10 minut uzavřeny a médium se vzorkem pomalu promícháno skleněnou tyčinkou podobně jako při nanesení vzorku.
4. Regenerace kolon byla provedena celkem ve třech krocích, přičemž každý krok zahrnoval regeneraci nejprve 15 ml basického pufru a poté 15 ml kyselého pufru.

4.6.3 Odsolení patatinu

Odsolení patatinu gelovou chromatografií s 5 ml Sephadex[™] G-25 na kolonách PD-10 (GE Healthcare) bylo podobně jako u předchozích typů chromatografie provedeno v několika krocích. Prvním krokem byla ekvilibrace kolon asi 30 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), poté bylo na ekvilibrované kolony nanášeno 2,5 ml vyizolovaného patatinu. Dalším krokem byla eluce, která byla provedena 3,5 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,4) a promytí kolon asi 20 ml stejným pufrém.

Odsolený patatin byl dále vysterilizován pomocí filtrů a uchován ve sterilních 1,5 ml tubách eppendorf při -20°C. Kontrola purifikačního procesu byla provedena na SDS-PAGE. Reakce byla připravena z 50 µl vzorku a 12,5 µl nanášecího pufru a nanášena na gel byla v množství 15 µl.

4.7 Vyhodnocení dat

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí software STATISTICA 9 (StatSoft USA, 2009). Používané analýzy byly test ANOVA (na hladině významnosti $\alpha = 0,5$), Tukey HSD test a analýza korelace. Výsledky z PAGE a SDS-PAGE byly vyhodnoceny v programu BioProfil Bio1D++, verze 99 (Vilber Lourmat, Francie).

5. Výsledky

5.1 Hmotnost a sušina hlíz (%)

Průměrné hmotnosti hlíz se velmi lišily a pohybovaly se od 2,16 g (*Solanum phureja*) do 52,27 g (*Solanum goniocalyx*) dle tabulky č. 4. Zastoupení sušiny (%) se pohybovalo od 19,91 % do 22,17 %.

Tab. č. 4: Průměrné hmotnosti a sušina hlíz (%)

Druh	Průměrná hmotnost 1 hlízy (g)	Sušina (%)
<i>S.andigenum</i>	3,42	21,30
<i>S.goniocalyx</i>	52,27	22,17
<i>S.phureja</i>	2,16	19,91
<i>S.stenotomum</i>	2,82	21,48
<i>S.tuberosum</i>	13,78	20,27

5.2 Stanovení obsahu dusíkatých látek a bílkovin v sušině hlíz brambor

Obsah dusíkatých látek (Nx6,25) se pohyboval v rozpětí 4,81-34,0 % a obsah bílkovin v rozmezí 4,21-7,86 %.

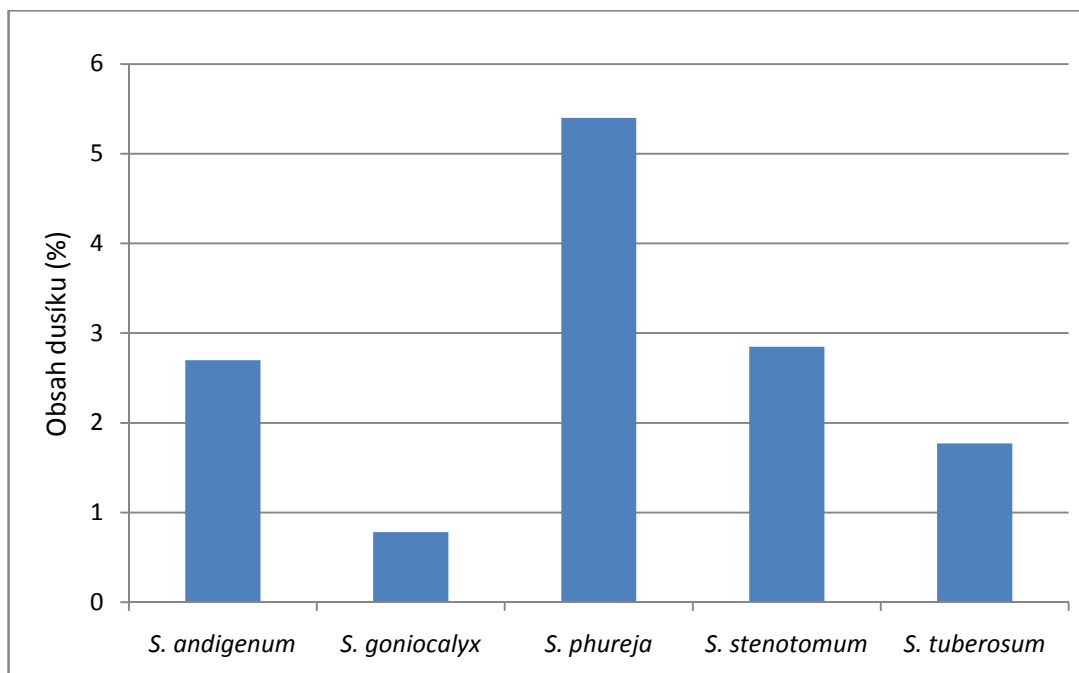
Nejvyšší obsah dusíkatých látek byl zjištěn u druhu *Solanum phureja*, který činil v průměru 33,78 %. Obsah bílkovin byl však jen 7,68 %, což je 22,87 % z celkových dusíkatých látek. Naopak u druhu *Solanum goniocalyx* byl obsah dusíkatých látek 4,88 % a bílkovin 4,23 %, což znamená, že bílkoviny u tohoto druhu tvoří téměř 87 % všech dusíkatých látek. U druhu *Solanum andigenum* byl obsah dusíkatých látek 16,85 % a bílkoviny z tohoto množství tvořily asi 30,36 %. U *Solanum stenotomum* tvořily dusíkaté látky 17,79 % a bílkoviny 7,23 %, tj. 40,68 % z celkových dusíkatých látek, a u druhu *Solanum tuberosum* tvořily dusíkaté látky 11,07 % a bílkoviny 4,72 % (tj. 42,6 % z celkových dusíkatých látek).

Tab. č. 5: Zastoupení dusíkatých látek a bílkovin u hodnocených druhů rodu *Solanum*

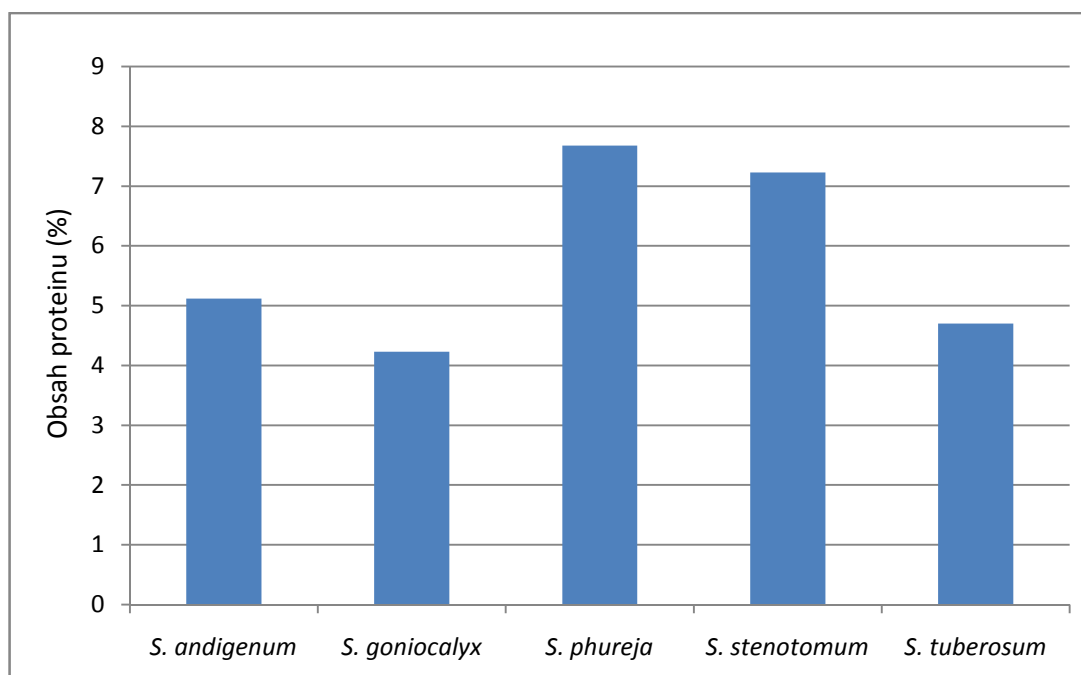
Druh	N (%)	NL (%)	Bílkoviny (%)	NL/Bílkoviny (%)	Relativní abundance patatinu (%)
<i>S. andigenum</i>	2,70 c	16,85 c	5,12 c	30,36 b	37,86 c
<i>S. goniocalyx</i>	0,78 a	4,88 a	4,23 a	86,70 d	30,36 b
<i>S. phureja</i>	5,40 e	33,78 e	7,68 d	22,88 a	27,63 b
<i>S. stenotomum</i>	2,85 d	17,79 d	7,23 d	40,68 c	38,53 c
<i>S. tuberosum</i>	1,77 b	11,01 b	4,70 ab	42,60 c	20,10 a

Neshodná písmena indikují průkazný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Tukey HSD test)

Graf č. 2: Porovnání obsahu dusíku mezi jednotlivými druhy



Graf č. 3: Porovnání obsahu bílkovin mezi jednotlivými druhy

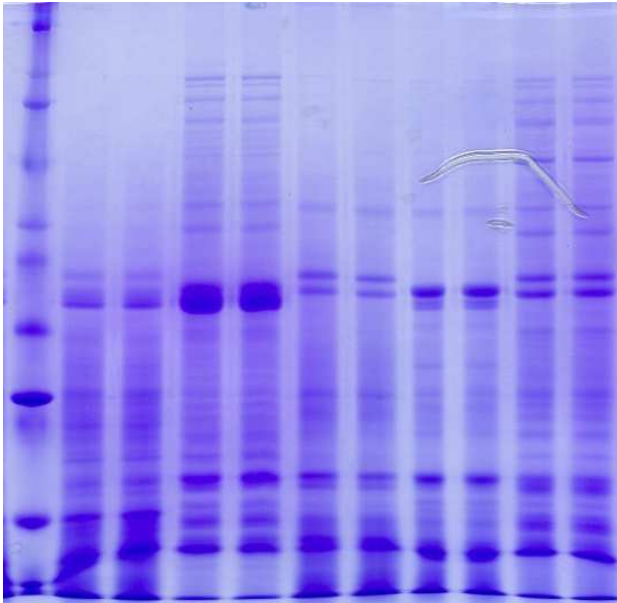


5.3 Vyhodnocení elektroforetických profilů hlíz bílkovin

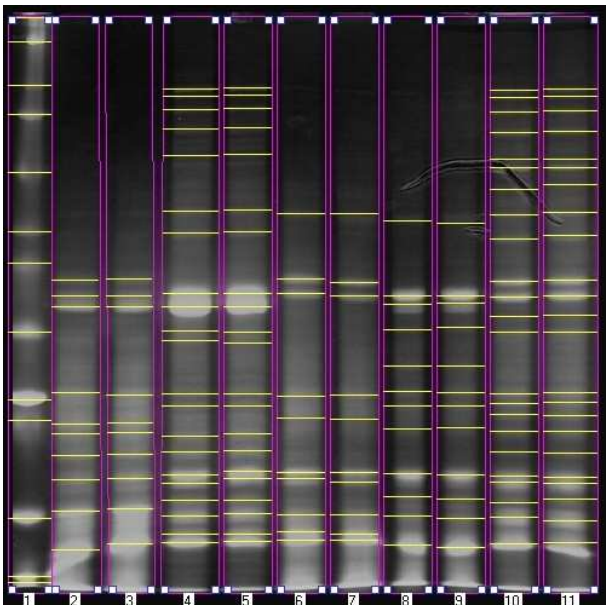
5.3.1 SDS-PAGE

Obr. č. 8: Profily bílkovin získané po analýze SDS-PAGE

a) původní gel



b) vyhodnocený gel s detekovanými pozicemi bílkovin



Legenda:

1 – marker

2,3 – *Solanum andigenum*

4,5 – *Solanum goniocalyx*

6,7 – *Solanum phureja*

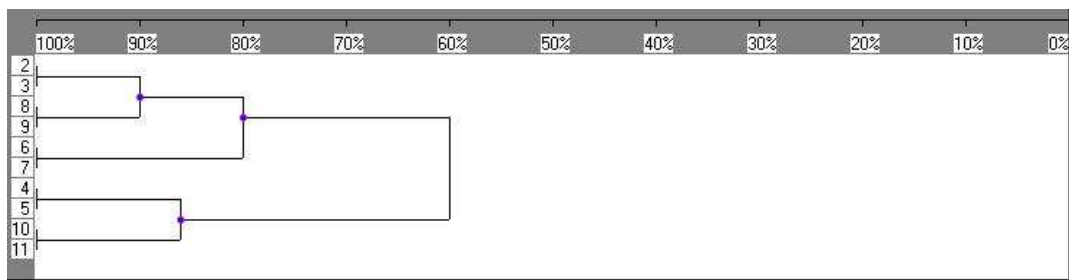
8,9 – *Solanum stenotomum*

10,11 – *Solanum tuberosum*

Tab. č. 6: Molekulové hmotnosti hodnocených druhů rodu *Solanum* (kDa), získané po SDS-PAGE

	M (kDa)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		<i>S. andigenum</i> (kDa)		<i>S. goniocalyx</i> (kDa)		<i>S. phureja</i> (kDa)		<i>S. stenotomum</i> (kDa)		<i>S. tuberosum</i> (kDa)	
1	205	42,4	42,6	95,6	96,2	59,5	59,5	57,9	57,3	95,1	95,6
2	116	40,2	40,2	92,1	92,7	42,6	42,0	40,1	40,1	91,5	92,2
3	97,4	38,7	38,7	86,1	86,6	40,5	40,1	39,0	39,1	85,0	85,5
4	84	30,5	30,0	78,9	79,3	29,8	30,0	36,2	36,4	77,6	78,1
5	66	27,7	27,2	70,3	70,7	26,5	26,5	34,0	34,0	69,3	69,3
6	55	23,3	23,5	60,0	60,2	24,5	24,3	30,7	30,5	67,2	67,2
7	45	21,4	21,6	54,6	55,0	24,3	24,9	27,4	27,4	63,7	64,3
8	36	18,3	17,8	40,5	40,5	19,1	19,1	27,3	27,5	59,3	59,8
9	29	17,7	17,8	38,7	38,7	15,9	15,9	22,3	22,5	52,5	53,7
10	24	15,6	15,6	36,1	36,0	15,9	15,9	19,4	20,1	42,2	42,4
11	20,1			35,6	35,5			16,1	16,4	40,0	40,2
12	14,2			30,3	30,3			15,9	15,8	37,6	37,7
13	6,5			27,4	27,4					36,0	36,0
14				27,0	26,7					30,3	30,5
15				25,0	25,0					28,0	28,4
16				20,9	21,4					27,2	27,0
17				19,4	18,9					25,3	25,0
18				18,2	18,4					21,8	21,8
19				16,5	16,5					19,7	20,8
20				15,8	16,0					18,2	18,0
21				15,6	15,6					16,8	16,4
22										15,7	15,6
23										15,6	15,6

Obr. č. 9: Dendrogram vyjadřující vzájemnou podobnost mezi druhy



Legenda:

2,3 – *Solanum andigenum*, 4,5 – *Solanum goniocalyx*, 6,7 – *Solanum phureja*, 8,9 – *Solanum stenotomum*, 10,11 – *Solanum tuberosum*

SDS-PAGE analýzou bylo zaznamenáno 10 (*S. andigenum*, *S. phureja*) až 23 (*S. tuberosum*) bílkovinných pruhů. Mezi hodnocenými genotypy byla zaznamenána variabilita vyskytující se ve dvou hlavních oblastech – patatinu a inhibitorů proteáz, ale i v oblasti nad 45 kDa. V oblasti nad 45 kDa nebyly u *S. andigenum*, *S. phureja* a *S. stenotomum* zaznamenány výrazné pruhy, zatímco u *S. goniocalyx* a *S. tuberosum* byly zaznamenány výraznější pruhy v oblasti až 95 kDa.

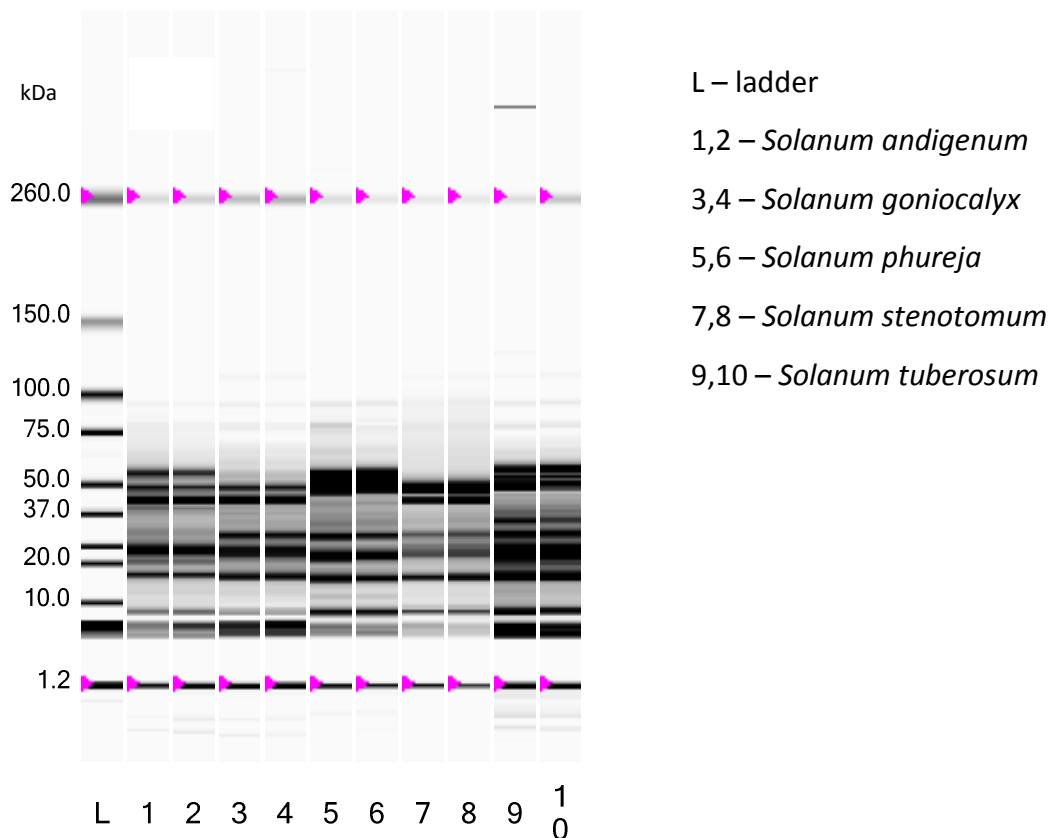
5.3.2 Čípková elektroforéza

Na základě čípkové elektroforézy byl vyhodnocen počet isoform bílkovin patatinového komplexu, představujících jednotlivé pruhy v oblasti 43,2 kDa až 57,9 kDa, a dále byla vyhodnocena relativní abundance patatinu (%) uvedená v tab. č. 5 v kapitole 5.1.

U *Solanum andigenum* byly zjištěny 3 isoformy patatinu a to v oblastech 43,2 kDa, 48,9 kDa a 55,6 kDa. U *Solanum goniocalyx* 2 isoformy v oblastech 43,9 kDa a 49,0 kDa. U *Solanum phureja* 3 isoformy v oblastech 48,6 kDa, 51,7 kDa a 54,8 kDa. U *Solanum stenotomum* byly nalezeny 2 isoformy a to v oblastech 43,6 kDa a 47,8 kDa a u *Solanum tuberosum* 3 isoformy v oblastech 50 kDa, 53,8 kDa a 57,3 kDa.

Relativní abundance patatinu se u hodnocených genotypů výrazně lišila – u druhu *Solanum tuberosum* patatin zaujímá 20 %, zatímco u druhů *Solanum andigenum* a *Solanum phureja* zaujímá téměř 40 %. I u ostatních druhů patatin zaujímá okolo 30 %, což je v porovnání se *S. tuberosum* o 50 % více.

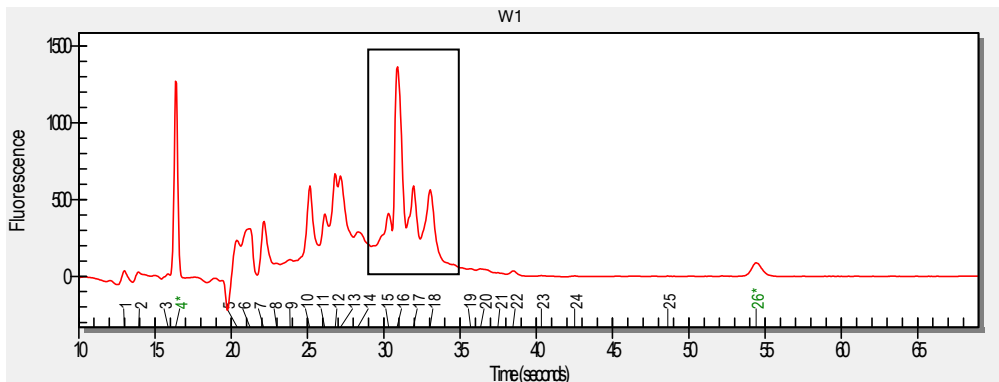
Obr. č. 10: Profily bílkovin získané po čípkové elektroforéze



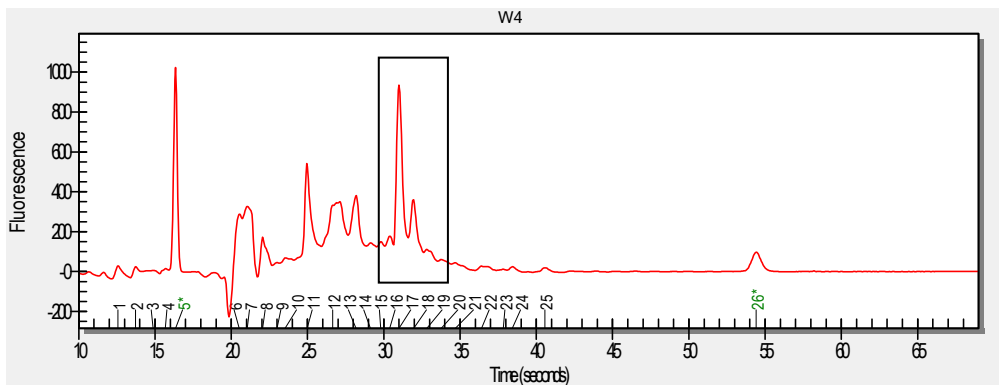
Graf č. 4: Průběh čipové elektroforézy u analyzovaných druhů rodu *Solanum*

U jednotlivých grafů je zvýrazněna oblast patatinových bílkovin, ze kterých byla odečtena relativní abundance patatinu (%)

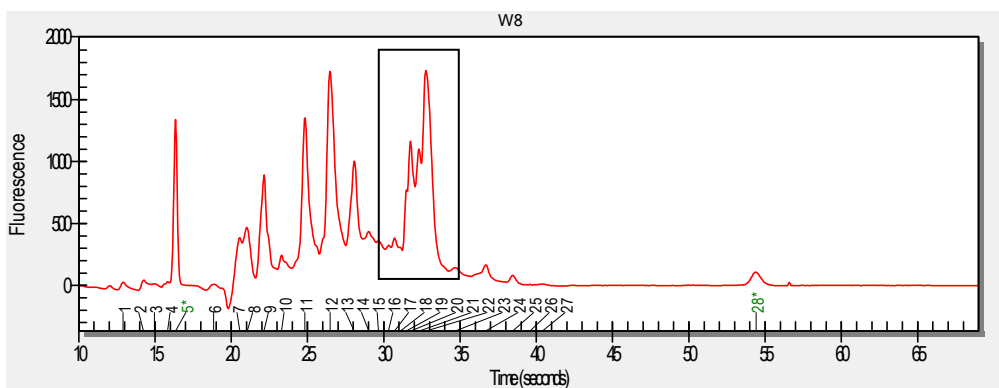
a) *Solanum andigenum*



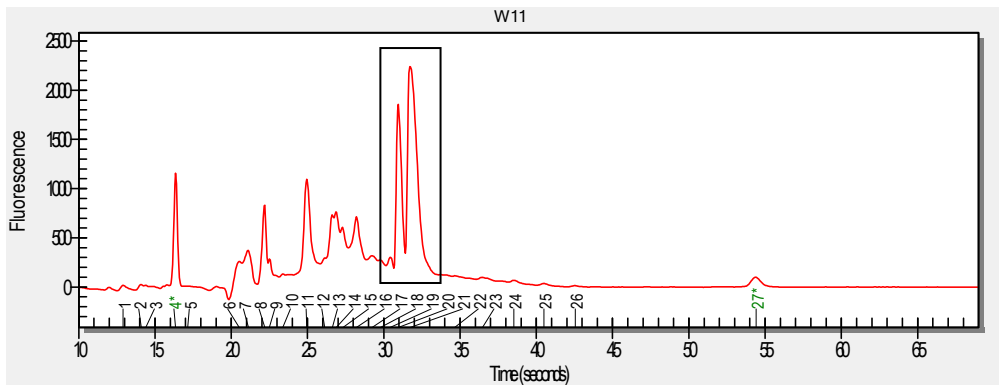
b) *Solanum goniocalyx*



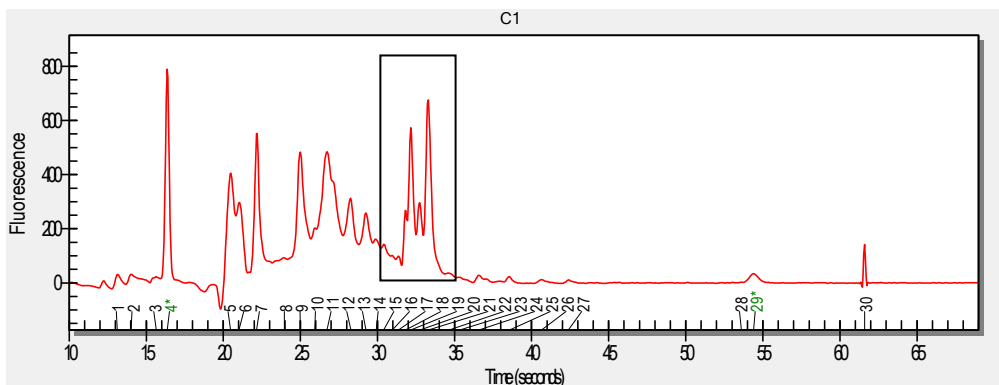
c) *Solanum phureja*



d) *Solanum stenotomum*

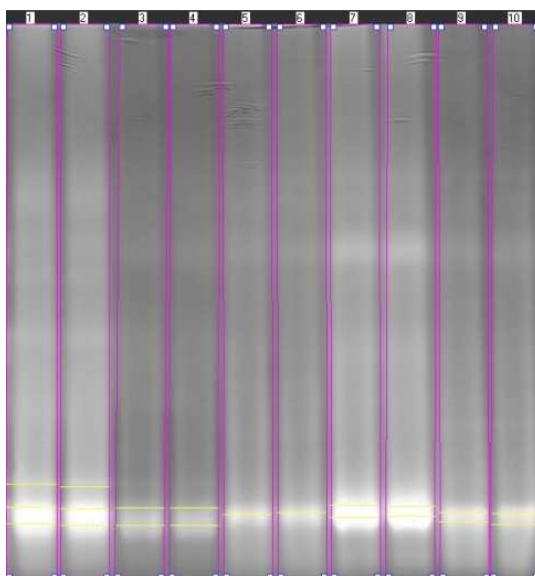


e) *Solanum tuberosum*, odrůda Desireé



5.3.3 Nativní spektrum

Obr. č. 11: Spektrum bílkovin získané po nativní PAGE



Legenda:

1,2 – *Solanum andigenum*

3,4 – *Solanum goniocalyx*

5,6 – *Solanum phureja*

7,8 – *Solanum stenotomum*

9,10 – *Solanum tuberosum*

Tab. č. 7: Relativní mobilita bílkovin (Rf) po nativní PAGE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	<i>S. andigenum</i>		<i>S. goniocalyx</i>		<i>S. phureja</i>		<i>S. stenotomum</i>		<i>S. tuberosum</i>	
1	0,830	0,835	0,873	0,873	0,885	0,882	0,868	0,870	0,882	0,883
2	0,872	0,875	0,905	0,905			0,890	0,888	0,898	0,903
3	0,902	0,905								

Po provedení v systému nativní PAGE bylo získáno spektrum s 1-3 pruhy. Relativní mobilita se pohybovala v rozpětí 0,830 – 0,905. Touto analýzou nebylo získáno variabilní spektrum.

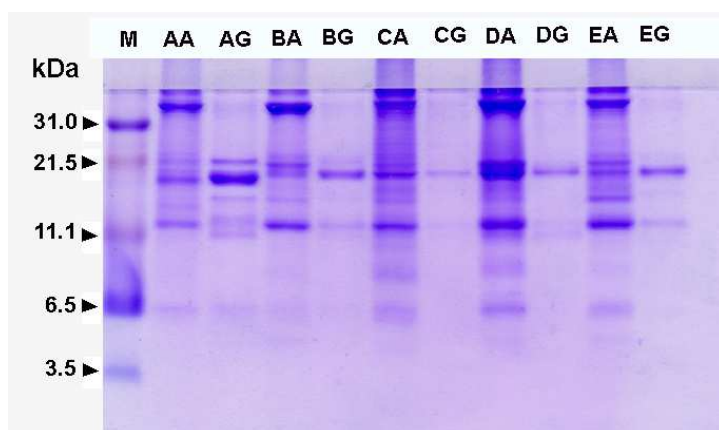
5.4 Frakcionace hlízových bílkovin

Nejrozšířenější frakcí byla frakce albuminová (rozpuštěná ve vodě), která v absolutním vyjádření zaujímala od 1,40 (*S. goniocalyx*) do 3,65 % (*S. stenotomum*) dusíkatých látek v sušině hlíz. Z elektroforetické analýzy vyplývá, že bílkoviny s molekulovou hmotností v oblasti patatinu (40-45 kDa) jsou téměř výhradně zastoupeny v této frakci (obr. č. 12). Relativní podíl této frakce z celkových dusíkatých látek se po odseparování dusíkatých látek nebílkovinného charakteru pohyboval v rozpětí od 31,3 (*S. tuberosum*) do 36,3 (*S. phureja*) %.

Obsah globulinů – bílkovin rozpustných v 5% roztoku K_2SO_4 – se v sušině hlíz pohyboval od 0,53 (*S. goniocalyx*) do 0,84 (*S. phureja*) % a relativní zastoupení této frakce v celkových dusíkatých látkách představovalo interval od 9,1 (*S. stenotomum*) do 12,7 (*S. phureja*) %. Provedená SDS-PAGE analýza odhaluje, že globulinová frakce u všech hodnocených genotypů obsahuje rozdílně intenzivní bílkovinné pruhy s molekulovou hmotností okolo 20 kDa.

Zastoupení ostatních dvou frakcí (prolaminy, gluteliny) bylo minoritní, ale mezi hodnocenými genotypy byly zaznamenány značné rozdíly.

Obr. č. 12: SDS-PAGE albuminů a globulinů na peptidovém gelu



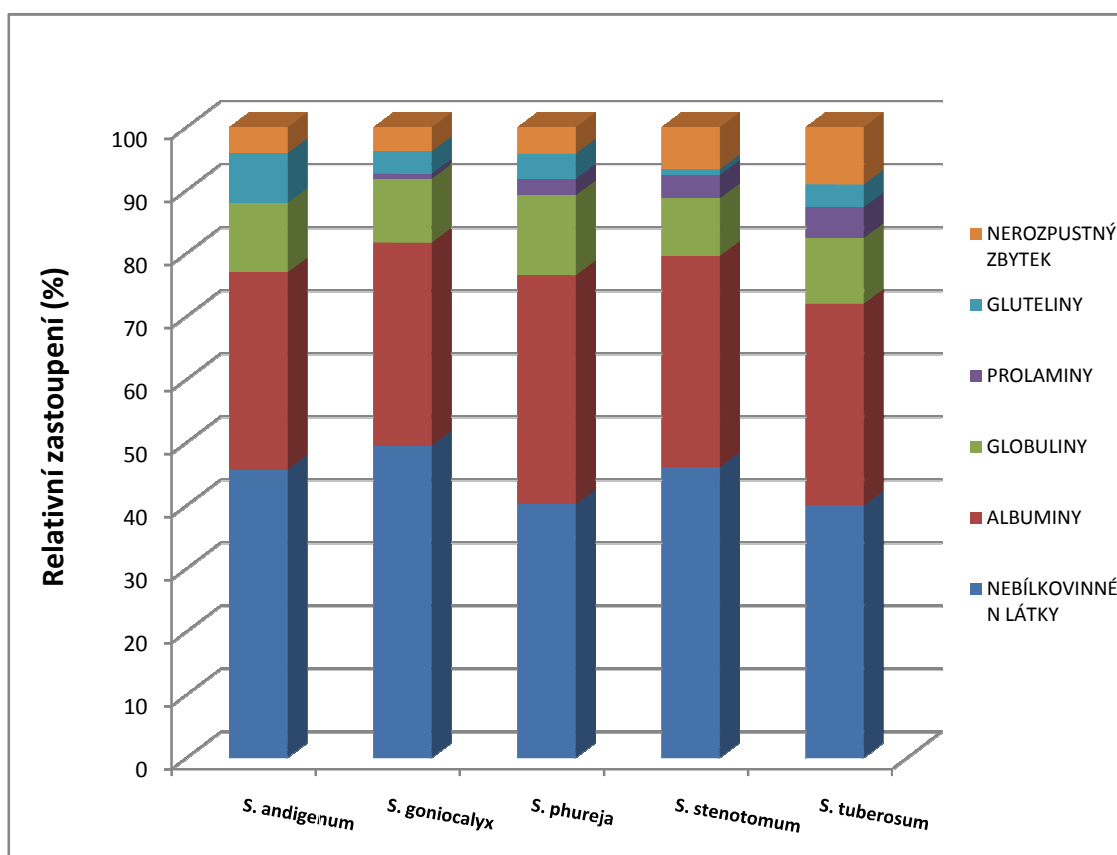
M – hmotnostní standard, AA – *S. andigenum*, albuminy, AG – *S. andigenum*, globuliny, BA – *S. goniocalyx*, albuminy, BG – *S. goniocalyx*, globuliny, CA – *S. phureja*, albuminy, CG – *S. phureja*, globuliny, DA – *S. stenotomum*, albuminy, DG – *S. stenotomum*, globuliny, EA – *S. tuberosum*, albuminy, EG – *S. tuberosum*, globuliny

Tab. č. 8: Obsah bílkovinných frakcí v sušině hlíz (%)

Druh	albuminy	globuliny	prolaminy	gluteliny	nerozpuštěný zbytek
<i>S. andigenum</i>	2,33	0,71	stopy	0,51	0,28
<i>S. goniocalyx</i>	3,65	0,53	0,05	0,19	0,20
<i>S. phureja</i>	1,40	0,84	0,18	0,26	0,28
<i>S. stenotomum</i>	1,52	0,65	0,26	0,06	0,53
<i>S. tuberosum</i>	1,46	0,71	0,34	0,25	0,63

vyjádřeno jako N*6,25

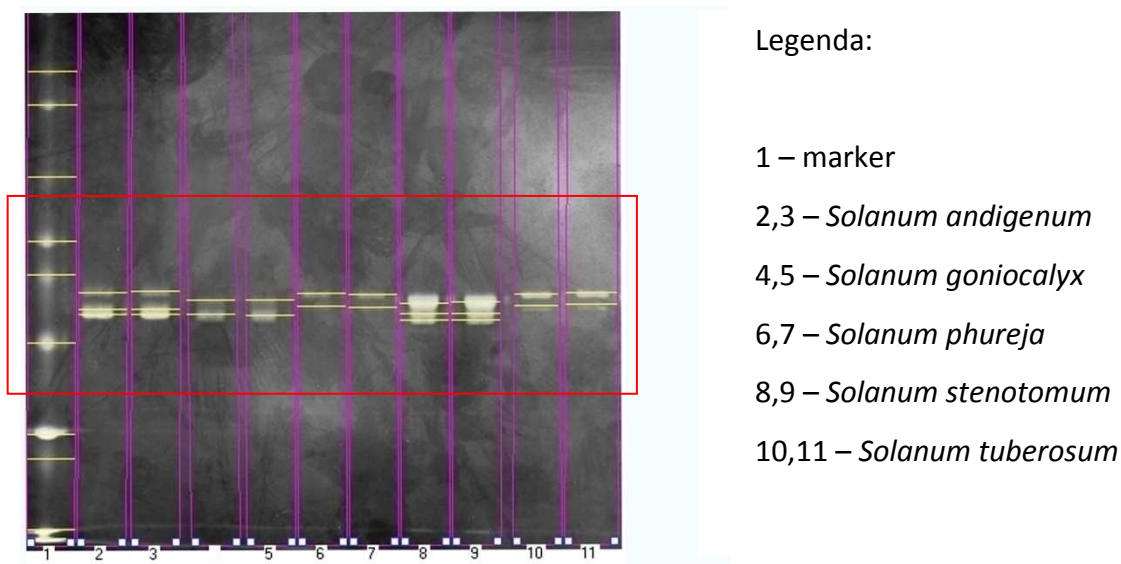
Graf č. 5: Relativní zastoupení bílkovinných frakcí v dusíkatých látkách u hodnocených genotypů



5.5 Purifikace patatinu

Na základě SDS-PAGE byly po chromatografické purifikaci detekovány 2-3 isoformy bílkovin patatinového komplexu v rozpětí 38,3 – 42,4 kDa. U *S. andigenum* a *S. stenotomum* byly detekovány 3 isoformy patatinového komplexu a u druhů *S. goniocalyx*, *S. phureja* a *S. tuberosum* 2 isoformy patatinového komplexu. V porovnání s SDS-PAGE všech vyextrahovaných bílkovin (viz kapitola 5.3.1) ze sušiny hlíz byly zaznamenány menší rozdíly v molekulových hmotnostech, které by mohly znamenat změnu glykosylace během chromatografické purifikace.

Obr. č. 13: Vypurifikovaný patatin na SDS gelu



Tab. č. 9: Záznam programu průběhu analýzy molekulové hmotnosti bílkovin patatinového komplexu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	M (kDa)	<i>S. andigenum</i> (kDa)		<i>S. goniocalyx</i> (kDa)		<i>S. phureja</i> (kDa)		<i>S. stenotomum</i> (kDa)		<i>S. tuberosum</i> (kDa)	
1	55	42,2	42,4	41,0	41,0	42,0	41,8	40,5	40,7	41,8	42,0
2	45	39,8	39,8	39,1	38,9	40,1	39,9	39,1	39,1	40,1	40,3
3	36	39,1	39,1					38,3	38,3		

6. Diskuse

6.1 Obsah dusíkatých látek v sušině hlíz vybraných druhů brambor

Obsah bílkovin v sušině hlíz vybraných druhů rodu *Solanum* se pohyboval přibližně mezi 4-8 %, což odpovídá rozpětí, udávanému v odborné literatuře (BÁRTA and BÁRTOVÁ 2007). Obsah dusíkatých látek značně kolísal a to mezi 4,8 – 34 %. Tyto rozdíly mezi jednotlivými druhy jsou zřejmě způsobeny vlivem genotypu a také velikostí hlíz, kdy hlízy s menší velikostí obsahují větší množství dusíkatých látek (SNYDER and DESBOROUGH 1978). Druh *Solanum goniocalyx*, jehož průměrná hmotnost hlíz byla 52,3 g, obsahoval 4,88 % dusíkatých látek a druh *Solanum phureja*, který měl nejnižší průměrnou hmotnost hlíz, tj. 2,16 g, tvořily dusíkaté látky 33,79 %. Zastoupení bílkovin v dusíkatých látkách se pohybovalo s rozmezí 22 (*Solanum phureja*) – 88 % (*Solanum goniocalyx*). Vyšší obsah bílkovin v celkových dusíkatých látkách by mohl být způsoben genotypem, velikostí hlíz a především se jedná o zajímavou druhovou variabilitu, která potvrzuje potenciál vybraných druhů pro šlechtitelské účely.

6.2 Spektra hlíz bílkovin

S využitím denaturační SDS-PAGE byla v oblasti bílkovin patatinového komplexu (40-45 kDa) zjištěna variabilita v molekulové hmotnosti mezi hodnocenými druhy rodu *Solanum*. Tyto rozdíly v molekulové hmotnosti by mohly být způsobeny rozdílným stupněm glykosylace mezi jednotlivými isoformami patatinu, jak také uvádí POTS 1999.

Separace bílkovin elektroforetickými metodami SDS-PAGE a čipovou elektroforézou zaznamenaly rozdíly zejména v určení počtu isoform bílkovin patatinového komplexu a jejich molekulových hmotností (MW/kDa). Po chromatografické purifikaci a ověření správnosti procesu na SDS-PAGE byly zjištěny 2 isoformy u *Solanum goniocalyx* a *Solanum stenotomum* a 3 isoformy u *Solanum andigenum*, *phureja* a *tuberosum*. Naopak u čipové elektroforézy byly zaznamenány 3 isoformy u *S. andigenum* a *S.*

stenotomum a 2 isoformy u *S. goniocalyx*, *phureja* a *tuberosum*. Rozdíly byly také v molekulových hmotnostech jednotlivých isoform, kdy analýza pomocí čipové elektroforézy vykazovala v průměru o 15 % vyšší hodnoty MW. Toto může být vysvětleno odlišnými podmínkami během separace, pravděpodobně způsobených složenými efekty konformace a tvaru proteinových molekul, společně s rozdíly v interakci specifických proteinů se stěnami kapiláry (BÁRTA et al. 2010). Čipová elektroforéza má oproti analýze SDS-PAGE výhody, jako jsou například kratší doba přípravy na analýzu a doba samotné analýzy (30 minut), automatické vyhodnocení dat, vyšší citlivost, odpadá práce s akrylamidem. Jednoznačné nebylo ani určení počtu isoform s použitím zmíněných technik. Pro přesné určení počtu isoform a jejich MW by byla potřeba detailnější analýza například na 2-D elektroforéze, která by jednoznačně odlišila jednotlivé isoformy.

Relativní abundance patatinu, která byla vyhodnocena na základě údajů po provedení čipové elektroforézy, se u vybraných druhů značně lišila. U druhu *Solanum tuberosum* tvořil patatin 20 %, zatímco u druhů *Solanum stenotomum* nebo *Solanum andigenum* téměř 40 %. Nabízí se tedy možnost využití těchto diploidních druhů ve šlechtění rostlin, biotechnologických aplikací a zpracovatelském průmyslu.

Profily získané z nativní PAGE, které jsou definovány hodnotami relativní mobility, nezaznamenaly výrazné rozdíly. Výhodou nativních profilů je především jejich velká genotypová variabilita, což je důležité pro rozlišování odrůd v rámci souborů (BÁRTA and BÁRTOVÁ 2007). Zde se však nepodařilo této variability dosáhnout a počet pruhů 1-3 není zdaleka dostatečným pro odlišení jednotlivých odrůd a charakterizace (druhů). Mohlo to být způsobeno například nevhodně zvolenou koncentrací gelu, popřípadě nevhodnými podmínkami separace.

6.3 Frakcionace hlízových bílkovin

Z frakcionace hlízových bílkovin je patrné, že bílkoviny s molekulovou hmotností v oblasti patatinu jsou téměř výhradně zastoupeny v albuminové frakci. Zjištění nejrozsáhlejšího zastoupení vodorozpustných bílkovin je v souladu s předešlými výsledky (SEIBLES et al. 1979, DESBOROUGH 1983), které byly nalezeny u bílkovin hlíz

druhu *S. tuberosum*. Nicméně, jak vyplývá z literárních zdrojů (SHEWRY 2003, BÁRTA and ČURN 2004), zastoupení nebílkovinných dusíkatých látek v celkovém obsahu dusíkatých látek může být poměrně proměnlivé. Globulinová frakce u všech hodnocených genotypů obsahovala rozdílně intenzivní bílkovinné pruhy s molekulovou hmotností okolo 20 kDa. V této oblasti se vyskytují především inhibitory proteáz (POUVREAU 2004). Lze předpokládat, že se jedná o frakci inhibitorů proteáz, jejichž rozpustnost je ovlivňována vyšší iontovou silou extrakčního činidla. Tento předpoklad by bylo nutné ověřit, nejlépe detailní proteomickou analýzou zahrnující identifikaci majoritních bílkovinných spotů pomocí technik hmotnostní spektrometrie po předchozí dvourozměrné elektroforéze. Pokud by se tento předpoklad potvrdil, tato jednoduchá frakcionace dle rozpustnosti by mohla vést k jednoduché izolaci skupiny bílkovin, které jsou obecně považovány za součást obranného systému rostlin či jejich orgánů.

6.4 Purifikace patatinu

Pomocí iontovýměnné a afinitní chromatografie byly získány bílkoviny patatinového komplexu u všech vybraných druhů rodu *Solanum*. Relativní abundance patatinu se pohybovala v rozpětí 20-39 %, což je ve shodě s odbornými publikacemi (POTS 1999, MACRAE et al. 1998). Rovněž molekulová hmotnost se u všech druhů pohybovala v udávaném rozpětí pro bílkoviny patatinového komplexu 40-45 kDa (POTS 1999, BÁRTA and BÁRTOVÁ 2008, ROZSAHL et al. 1986, JIMÉNEZ-ATIÉNIZAR et al. 2003) vyjma čipové elektroforézy, u které dochází k posunu a zvýšeným hodnotám molekulové hmotnosti o 15 % jak již bylo popsáno v kapitole 6.2. Takto vyizolované bílkoviny patatinového komplexu mohou být pro své vlastnosti, jako je schopnost tvorby pěny a emulzí, využity zejména v průmyslu (kosmetickém, farmaceutickém), ale také v potravinářství (KONINGSVELD et al. 2000).

7. Závěr

Na základě výsledků získaných v rámci řešení diplomové práce lze vyvodit následující závěry:

1. Sušina hlíz se pohybovala v rozpětí 20,27 – 22,17 %. Obsah dusíkatých látek se pohyboval v rozpětí 4,81 % (*Solanum goniocalyx*) až 34,0 % (*Solanum phureja*) nejspíše vlivem genotypu a velikostí hlíz. Obsah bílkovin se pohyboval od 4,21 % (*Solanum goniocalyx*) - 7,86 % (*Solanum phureja*).
2. Spektrum bílkovin získané SDS-PAGE analýzou vykazovalo mezi druhy variabilitu a oblast bílkovin patatinového komplexu, která byla pomocí iontovýměnné a afinitní chromatografie purifikována, se pohybovala v rozpětí 38-43 kDa. Na profilu SDS-PAGE byly v oblasti bílkovin patatinového komplexu zaznamenány 2-3 pruhy představující jednotlivé hmotnostní úrovně patatinu. Dvě isoformy byly zjištěny u *Solanum goniocalyx*, *Solanum phureja* a *Solanum tuberosum*. U druhů *Solanum phureja* a *stenotomum* byly zaznamenány 3 isoformy. Pro přesnější určení počtu isoform a jejich molekulových hmotností by byla potřeba detailnější protetická analýza například na dvourozměrné elektroforéze doplněná hmotností spektrofotometrií. Nativní PAGE nebyla získána variabilní spektra.
3. Spektra získaná analýzou čipové elektroforézy vykazovala o 15 % vyšší hodnoty molekulové hmotnosti (kDa) v porovnání s analýzou SDS-PAGE a lišily se i počty pruhů v oblasti bílkovin patatinového komplexu představující jednotlivé isoformy. Touto analýzou byly zjištěny 2 isoformy bílkovin patatinového komplexu u druhu *Solanum goniocalyx* a *Solanum stenotomum* a 3 isoformy u druhů *Solanum andigenum*, *phureja* a *tuberosum*. Pomocí dat z analýzy čipové elektroforézy byla vypočtena relativní abundance patatinu, která se pohybovala od 19,83 % (*Solanum tuberosum*) – 39,04 % (*Solanum stenotomum*).

4. Frakcionací bílkovin byla zjištěna jako nejrozšířenější frakce u všech druhů albuminová frakce (rozpustná ve vodě), která v relativním zastoupení zaujímala 31-36 %. V této frakci jsou zastoupeny bílkoviny patatinového komplexu. Druhou nejrozšířenější frakcí byla u všech druhů frakce globulinová (rozpustná v 5% K_2SO_4), která v relativním zastoupení zaujímala 9,1-12,7 %. V této frakci byly zastoupeny bílkoviny s molekulovou hmotností 20 kDa, pokud by se po detailnější proteomické analýze potvrdil předpoklad, že se skutečně jedná o inhibitory proteáz, tak by tato jednoduchá frakcionace dle rozpustnosti mohla vést k jednoduché izolaci skupiny bílkovin, které jsou obecně považovány za součást obranného systému rostlin či jejich orgánů. Ostatní frakce (prolaminová, glutelinová) byly zastoupeny v minoritním množství.

Poznatky, kterých bylo v této diplomové práci dosaženo, by bylo potřeba dále rozvinout o výsledky podrobnějších proteomických analýz a do souboru hodnocených druhů zahrnout více genotypů jednotlivých druhů rodu *Solanum*, jak pro nás netradičních diploidních druhů, tak i tetraploidních, například porovnání jednotlivých odrůd *Solanum tuberosum*.

8. Seznam použité literatury

Al-Saikhan, M.S, Howard, L.R., Miller, J.C. (1995): Antioxidant Activity and Total Phenolics in different genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.), Journal of Food Science, 60 : 341-343.

Barel, G., Ginzberg, I. (2008): Potato skin proteome is enriched with plant defence components, Journal of Experimental Botany, 59 : 3347-3357.

Bárta, J., Bártová, V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.), vědecká monografie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, s. 116, ISBN 978-80-7394-036-2.

Bárta, J., Bártová, V. (2008): Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, and in its Occurrence as Genotype Effect : Processing Versus Table Potatoe, Czech Journal of Food Sciences, 5 : 347-359.

Bárta, J., Bártová, V., Čurn, V. (2010): Analýza proteinů pomocí automatické čipové elektroforézy a porovnání s metodou SDS-PAGE, Chemické listy, 104 : 33-40.

Bárta, J., Čurn, V. (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) – klasifikace, charakteristika, význam, Chemické listy, 98 : 373-378.

Bauw, G., Nielsen, H.V., Emmersen, J., Nielsen, K., Jorgensen, M. , Welinder, K. (2006): Patatins, Kunitz Protease Inhibitors and other Major Proteins in Tuber of Potato cv. Kuras, FEBS Journal, 273 : 3569-3584.

Bradshaw, J.E. (2007): Potato-Breeding Strategy, Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives, Elsevier, Oxford, s. 157-177, ISBN-978-0-444-51018-1.

Bradshaw, J.E., Mackay, G.R. (1994): Breeding strategies for clonally propagated potatoes, in Potato Genetics, CAB International Wallingford, s. 552, ISBN – 0-85198-869-5.

Burlingame, B., Mouillé, B., CHarrondiére, R. (2009): Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes, Journal of Food Composition and Analysis, 22 : 494-502.

Čermák, V. (2009): Přehled odrůd 2009 Brambor, ÚKZUZ, Brno, s. 112, ISBN 978-80-7401-015-6.

Desborough, S. L. (1983): Isozyme in Plant Genetics and Breeding (S. D. Tanksley and T. J. Orton, eds.), díl B, Amsterdam, Elsevier, s. 167.

Franco-Lara, L., Barker, H. (1999): Characterisation of resistance to potato leafroll virus accumulation in *Solanum phureja*, Euphytica, 108(2) : 137-144.

Hanusová, L., Čurn, V. (2007): Inhibitory proteases v hlíze bramboru, Chemické listy, 101 : 536-541.

Hawkes, J.G. (1990): The Potato, Evolution, Biodiversity and Genetic Resources, Belhaven Press, London, s. 259, ISBN 1-85293-045-4.

Hawkes, J.G. (1994): Origins of cultivated potatoes and species relationships, in Potato Genetics, CAB International Wallingford, s. 3-42, ISBN – 0-85198-869-5.

Hermosa, M.R., Turra, 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.

Huamán, Z., Spooner, D.M. (2002): Reclassification of Landrace Populations of Cultivated Potatoes (*Solanum* Sect. *Petota*), American Journal of Botany, 89(6) : 947-965.

Chanput, W., Theerakulkait, C., Nakai, S. (2009): Antioxidative properties of partially purified barley hornin, rice bran protein fractions and their hydrolase, Journal of Cereal Science, 49 : 422-428.

Jellis, G.J., Richardson, D.E. (1987): The production of new potato varieties: technological advances, University of Cambridge, s. 358, ISBN – 0-512-324-580.

Jideani, I.A., Owusu, R.K., Muller, H.G. (1994): Protein of acha (*Digitaria exilis* Stapf): Solubility fractionation, gel filtration, and electrophoresis of protein fractions, Food Chemistry, 51 : 51-59.

Jiménez-Atiénzar, 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, Journal of Lipid, 38(6) : 677-82.

Jin, L.P., Qu, D.Y., Xie, K.Y., Bian, C.S., Duan, G.S. (2004) – Potato Germplasm, Breeding Studies in China, Kunming, China, s. 175-178.

Judd, R.C. (2002): SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of peptides. In: Walker, J.M., The protein protocols handbook, s. 73-79.

Jůzl, M., Zrůst, J., Hlušek, J. (2008): Rizikové látky v bramboru (*Solanum tuberosum*) a ve výrobcích z hlíz - monografie, Brno: Mendelova Zem. a Les. Uni v Brně, s. 139, ISBN – 978-80-7375-167-8.

Koningsveld van G. A., Gruppen, H., Jongh, de H. H. J., Wijngaards, G., Boekel, van M.A.J.S., Waltra, P., Voragen, A. G. J. (2002): The solubility of potato proteins from industrial potato fruit juice as influenced by pH and variol additives, *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82 : 134-142.

Koningsveld, van G.A., Walstra, P., Voragen, A.G.J., Kuijpers, I.J., Boekel, van M.A.J.S., Gruppen, H. (2006): Effect of Protein Composition and Enzymatic Activity on Formation and Properties of Potato Protein Stabilized Emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17) : 6419-6427.

Kormuťák, A., Heldák, J., Šubová, D. (1999): Soluble proteins and isoesterases as taxonomic markers tested on nine wild *Solanum* species and eight Slovakian potato varieties, *Potato Research*, 42 : 619-626.

Lawrence, P.K., Koundal, K.R. (2002): Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects, *Electronic Journal of Biotechnology*, 5 : 93-109.

Lee, L., Hannapel, D., Mignery, G., Shumway, J., Park, W. (1983): Control of tuber protein synthesis in potato, *Plant Molecular Biology, UCLA Symposium*, New York, s. 355-365.

Lehesranta, S.J., Davies, H. V., Shepherd, L.V.T., Nunan, N., McNicol, J.W., Auriola, S., Koistinen, K.M., Suomalainen, S.S., Kokko, H.I., Karenlampi, S.O. (2005): Comparasion of Tuber Proteomes of Potato (*Solanum* ssp.) Varieties, Landraces and Genetically Modified Lines, *Plant Physiology*, 138 : 1690-1699.

Lisińska, G., Leszczyński, W. (1989): *Potato science and technology*, Elsevier, s. 393, ISBN- 1-85166-307.

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(15) : 4389-4393.

Macrae, A. R., Visicchion J. E., Lanot A. (1998): Application of potato lipid acyl hydrolase for the synthesis of monoacylglycerols, Journal of the American Oil Chemists Society, 75 : 1489-1494.

Martinez-Villaluenga, C., Gulewicz, P., Frias, J., Gulewicz, K., Vidal-Valverde, C. (2008): Assessment of protein fractions of three cultivars of *Pisum sativum* L.: effect of germination, European Food Research and Technology, 226 : 1465-1478.

Míča, B., Bečka, J. (1984): Obsah dusičnanů a jejich podíl v celkovém obsahu dusíku v hlízách brambor z různých stanovišť, Acta of Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, 37(2) : 107-118.

Míča, B., Vokál, B., Penk, J. (1991): Dusičnany v bramborách a možnosti snížení jejich obsahu, Praha, MZE ČR, s. 75, ISBN- 80-7084-039-0.

Peyer, C., Boney, P., Staudacher, E. (2004): Purification and characterization of β -xylosidase from potatoes (*Solanum tuberosum*), Biochemica et Biophysica Acta, 1672 : 27–35.

Pots, A.M. (1999): Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein, PhD. thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen, the Netherlands, s. 123.

Povreau, L., Gruppen, H., Piersma, S.R., Broek Van Den, L.A.M., Koningsveld Van, G.A., Voragen, A.G.J. (2001): Relative Abundance and Inhibitory Distribution of Protease Inhibitors in Potato Juice from cv. Elkana, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 : 2864-2874.

Racusen, D., Weller, D.L. (1984): Molecular weight of patatin, a major potato tuber protein, *Journal of food Biochemistry*, 3 : 103-107.

Ross, H. (1986): Potato Breeding – problems and perspectives, *Journal of Plant Breeding*, 13 : 132.

Ryan, C. A. (1990): Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens, *Annual Review of Phytopathology*, 28 : 425-429.

Rybáček, V. (1988): *Brambory*, Státní zemědělské nakladatelství Praha, s. 358.

Rydel, T. J., Williams, J. M., Krieger, E., Moshiri, F., Stallings, W., C., Browen, S. M., Pershing, J.C., Purcell, J.P., Alibhai, M.F. (2003): The Crystal Structure, Mutagenesis, and Activity Studies Reveal The Patatin is a Lipid Acyl Hydrolase with a SER-ASP Catalytic Dyad, *Biochemistry*, 42 : 6696-6708.

Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N., Kawakita, K. (1996): A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appear to be patatin, *Plant Cell Physiology*, 37(3) : 347-353.

Seppala, U., Alenius, H., Turjanmaa, K., Reunala, T., Polosuo, T., Kalkkinen, N. (1999): Identification of patatin as a novel allergen for children with positive skin prick test responses to raw potato, *Journal of Allergy and Clin. Immunology*, 103 : 165-171.

Shewry, P.R. (2003): Tuber Storage Proteins, *Annals of Botany*, 91 : 755-769.

Singh, J., Kaur, L. (2009): *Advances in Potato Chemistry and Technology*, Elsevier Inc., s. 508, ISBN – 978-0-12-374349-7.

Snyder, J., Desborough, S. (1978): Protein, starch, and non-protein nitrogen accumulation in high protein hybrids and low protein cultivars, American Journal of potato search, 55(8) : 453-465.

Tonón, C., Daleo, G., Oliva, C. (2001): An acid beta-1,3 glucanase from potato tubers appears to be patatin, Plant Physiology and Biochemistry, 93(10) : 849-854.

Velíšek, J., Hajšlová, J. (2009): Chemie potravin (1.díl), Tábor - OSSIS, s. 580, ISBN - 978-80-86659-15-2.

Vodrážka, Z. (2002): Biochemie, Praha: Academia, s. 191, ISBN- 80-200-0600-1.

Vokál, B., Cvrček, M., Čepl, J., Čížek, M., Domkářová, J., Fér, J., Hausvater, E., Králíček, J., Prugar, J., Rasocha, V., Zrůst, J. (2000): Brambory, Agrospoj Praha, s. 245.

Zrůst, J. (2004): Faktory ovlivňující obsah nutričně významných a škodlivých látek v hlízách a výrobcích z brambor, Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha, s. 84.

Internetové zdroje:

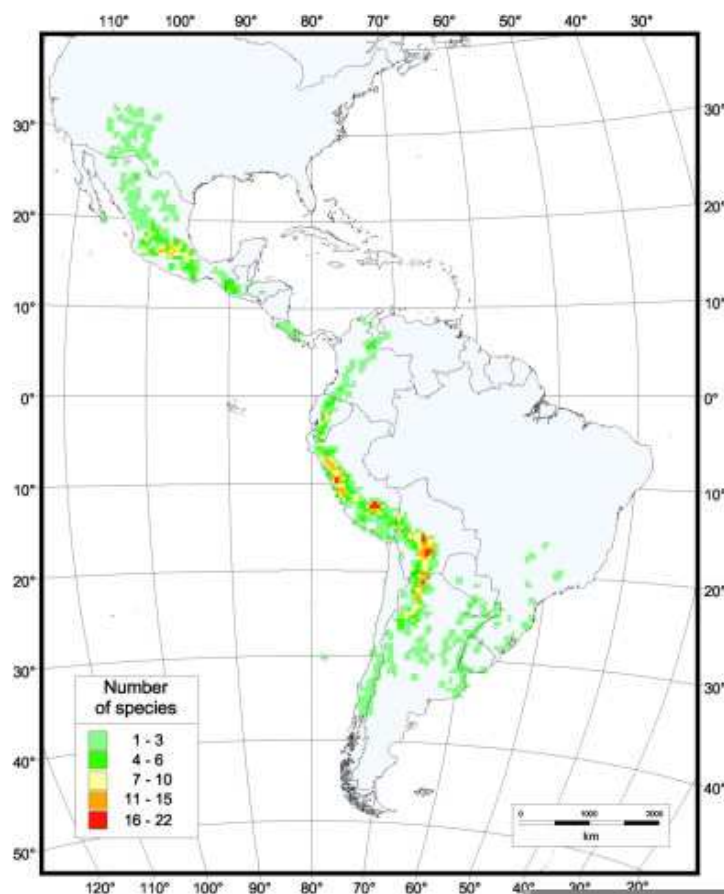
www.katalogbrambor.cz, 17. 4. 2011

www.faostat.fao.org, 21. 4. 2011

9. Přílohy

9.1. Mapa výskytu kulturních a planých druhů brambor a fotografická dokumentace

Obr. č. 14 : Oblasti rozšíření netradičních kulturních druhů rodu *Solanum*



zdroj: <http://www.eu-sol.net/public/plant-histories/potato-history/wild-potatoes>, autor: Spooner David



Obr. č. 14: *Solanum andigenum*

Foto: Jan Bárta



Obr. č. 15: *Solanum goniocalyx*

Foto: Jan Bárta



Obr. č. 16: *Solanum phureja*

Foto: Jan Bárta



Obr. č. 17: *Solanum stenotomum*

Foto: Ing. Jan Bárta



Obr. č. 18: *Solanum tuberosum*, odrůda Desireé

Foto: Jan Bárta

9.2 Složení jednotlivých pufrů a roztoků

Extrakční pufr

0,0625M Tris-HCl (pH=6,8) + 2 % SDS + 5 % BME (Merkaptoethanol)

BME se přidává těsně před použitím do nanášecího pufru, u nativní PAGE se provádí extrakce bez BME

Nanášecí pufr

složení pro 5 ml nanášecího pufru: 5 ml 1M Tris-HCl (pH=6,8) + 2,3 g SDS + 10 ml glycerolu + 5 mg BCP

Vanový pufr

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

Odbarvovací roztok

na 1 l : 250 ml etanolu + 100 ml kyseliny octové + 650 ml H₂O

Fixační roztok

na 1 l: 450 ml etanolu + 30 ml glycerolu + 500 ml H₂O

Regenerační pufr (kyselý)

50 mM Na-acetátu, pH 4.5 + 0,5 M NaCl + 1 mM MnCl₂ + 1 mM CaCl₂

Regenerační pufr (basický)

50 mM Tris-HCl, pH 8.5 + 0,5 M NaCl + 1 mM MnCl₂ + 1 mM CaCl₂

Uchovávací pufr

100 mM Na-acetát, pH 6 + 1 M NaCl + 1 mM MnCl₂ + 1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂ + 20 % ethanol

Borátový pufr

na 1l: 9,4 g kyseliny borité (61,832 g/mol) rozpustit v 1 l H₂O

Tab. č. 10: Složení pufrů pro 2. stupňovou chromatografickou purifikaci patatinu

Komponenta (ml)	DEAE startovací 25 mM Tris-HCl, pH 7.4	DEAE eluční Con A startovací 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0,5 M NaCl	Con A eluční 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0,5 M NaCl + 100 mM α-methyl-D-glukosid
1 M Tris-HCl, pH 7.4	25	25	25
5 M NaCl	0	100	100
1M α-methyl-D-glukosid	0	0	100
dH ₂ O	975	875	775

9.3 Frakcionace hlízových bílkovin u vybraných druhů z rodu *Solanum tuberosum*

Příspěvek byl publikován na konferenci 11. - 12.11 2010 v Brně pořádané Výzkumným ústavem pícninářským, spol. s.r.o., Troubsko a Zemědělským výzkumem spol. s.r.o., Troubsko a je také zařazen po vědecké přílohy časopisu Úroda.

FRAKCIONACE HLÍZOVÝCH BÍLKOVIN U VYBRANÝCH DRUHŮ Z RODU *SOLANUM*

Fractionation protein tubers for selected species from the genus *Solanum*

¹Brabcová A., ¹Bárta J., ¹Bártová V., ²Horáčková V., ¹Čurn V.

¹Department of Plant Production and Agroecology

²Potato Research Institute Havlíčkův Brod, Ltd.

Abstrakt

Příspěvek se zabývá frakcionací bílkovin hlíz u vybraných genotypů z rodu *Solanum* (*S. andigenum*, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum*, *S. tuberosum*). Postupnou extrakcí bramborové mouky pomocí vody, 5% (w/v) roztoku K₂SO₄, 70% (v/v) etanolem a 0,03 M NaOH byly získány frakce dusíkatých látek, jež byly následně kvantitativně a kvalitativně determinovány. Byly nalezeny rozdíly mezi hodnocenými genotypy ve složení frakcí dusíkatých látek (bílkovin), ale u všech hodnocených genotypů převažovaly vodorozpustné dusíkaté látky (přes 70 %), zahrnující i majoritní patatinové bílkoviny. Pomocí roztoku K₂SO₄ lze odseparovat významné komponenty bílkovinného spektra s molekulovou hmotností okolo 20 kDa.

Klíčová slova: frakcionace bílkovin, *Solanum*, patatin, inhibitory proteas

Abstract

The presented contribution deals with possibility of potato tuber protein fractionation using selected genotypes from genus *Solanum* (*S. andigenum*, *S. goniocalyx*, *S. phureja*, *S. stenotomum*, *S. tuberosum*). The fractions of tuber nitrogenous matters were obtained by subsequent extraction of potato flour using water, 5% (w/v) K₂SO₄, 70% (w/v) ethanol and 0.3 M NaOH. The obtained fractions were determined from the qualitative and quantitative point of view. Important differences in nitrogenous (protein) fractions of the evaluated potato genotypes were found. However, the water-soluble fraction dominated (above 70 %) for all of the studied genotypes. This fraction included also patatin, the major protein of potato tubers. Important components of potato proteins spectrum with molar mass about 20 kDa is possible to obtained in high purity using the solution of K₂SO₄.

Keywords: protein fractionation, *Solanum*, patatin, protease inhibitors

Úvod

Nejdůležitější dusíkatou složkou bramborových hlíz jsou bílkoviny, které nepředstavují homogenní složku. Frakcionací dle Osborna lze získat čtyři frakce: albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny (Chanput et al. 2009, Jideani et al. 1994). Názory na zastoupení jednotlivých frakcí se dle autorů liší, avšak shodují se na nejvyšším zastoupení snadno rozpustných albuminů (ve vodě) a globulinů (v roztoku solí). Seibles et al. (1979) uvádí podíl 75 % pro albuminovou frakci a 25 % pro globulinovou frakci. V současné době převažuje klasifikace bílkovin dle molekulové hmotnosti (Bárta & Čurn 2004). Pots (1999) pomocí techniky SDS-PAGE definoval na základě získaných spekter tři významné skupiny hlízových bílkovin: patatin, inhibitory proteas a ostatní bílkoviny. Patatin (nebo-li patatinový komplex) je skupina imunologicky identických glykoproteinových isoformů o velikosti 40-43 kDa. V hlíze jsou lokalizovány v parenchymatických buňkách a představují 20-40 % z celkového množství bílkovin v hlízách. Primárně je patatin pokládán za zásobní bílkovinu, ale byly u něj nalezeny také některé enzymové aktivity (Bárta & Bártová 2008) naznačující, že tyto bílkoviny mohou souviset s obranou hlíz. Inhibitory proteas zahrnují bílkoviny o velikosti 8,1 až 25 kDa a dle Pouvreau et al. (2001) jsou děleny do sedmi tříd. Představují 20-30 % z extrahovatelných bílkovin a plní roli zásobních bílkovin s možnou účastí na obranných

mechanismech. Všechny dostupné studie hodnotící zastoupení bílkovinných frakcí byly prováděny na hlízách odrůd druhu *Solanum tuberosum*. Informace o bílkovinných frakcích u ostatních zástupců rodu *Solanum* nejsou dostupné. Cílem tohoto příspěvku bylo poskytnout alespoň základní srovnání bílkovinných frakcí (respektive frakcí dusíkatých látek) mezi vybranými zástupci brambor rodu *Solanum*.

Materiál a Metody

Vstupním materiálem pro frakcionaci bílkovin byla lyofilizovaná sušina hlíz vybraných kulturních druhů brambor *Solanum stenotomum* (EVIGEZ 07S0300001), *Solanum phureja* (EVIGEZ 07S0300136), *Solanum goniocalyx* (EVIGEZ 07S0300109), *Solanum andigenum* (EVIGEZ 07S0300235) a kulturního druhu *Solanum tuberosum* odrůda Desiree (EVIGEZ 07S0100243). Rostlinný materiál byl primárně získán z Genové banky bramboru (Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, s.r.o.), poté na ZF JU přemnožen ve skleníkových podmínkách. Frakcionace bílkovin byla provedena na principu Osbornovy metody dle modifikovaného postupu uvedeného v práci Martinez-Villaluga et al. (2008) postupným „odmýváním“ jednotlivých frakcí bílkovin extrakčními činidly čímž vzniklo 5 frakcí: 1. frakce albuminů a ve vodě rozpustných nebílkovinných látek, 2. frakce globulinů rozpustných v 5% roztoku K₂SO₄, 3. frakce prolaminů rozpustných v 70% etanolu, 4. frakce glutelinů rozpustných v 0,03M NaOH, 5. frakce byla tvořena nerozpustným zbytkem. Supernatanty jednotlivých frakcí byly analyzovány na peptidové SDS-PAGE. Použita byla desková vertikální elektroforéza (model SE 600, Hoefer) s diskontinuálním uspořádáním matrice, použit byl 16% separační gel (modifikováno dle práce Judd 2002). Detekce bílkovin na gelu byla provedena pomocí roztoku obsahujícího barvivo Coomassie Brilliant Blue R-250. Centrifugované pelety po postupném paralelním odmývání jednotlivých frakcí byly lyofilizovány (ALPHA Martin Christ, Německo), gravimetricky vyhodnoceny a pomocí modifikované Dumasovy metody (přístroj Flash EA 1112, ThermoQuest, USA/Itálie) byl stanoven obsah N. Ze získaných dat byl vypočten obsah N v jednotlivých frakcích (vyjádřeno jako dusíkaté látky: N x 6,25) a byl stanoven jejich relativní podíl v dusíkatých látkách hlíz.

Výsledky a diskuze

Z dosažených výsledků (tab. 1, obr. 1) je patrné, že u všech hodnocených druhů představují nejrozsáhlejší frakci dusíkaté látky rozpustné ve vodě. V absolutním vyjádření zaujímala tato frakce od 4,28 (*S. goniocalyx*) do 5,85 % (*S. stenotomum*) dusíkatých látek v sušině hlíz (tab. 1). Relativní podíl vodorozpustné frakce z celkových dusíkatých látek se pohyboval v rozpětí od 71,9 (*S. tuberosum*) do 82,4 (*S. stenotomum*) % (obr. 1).

Tabulka 1: Obsah bílkovinných frakcí v sušině hlíz (%).

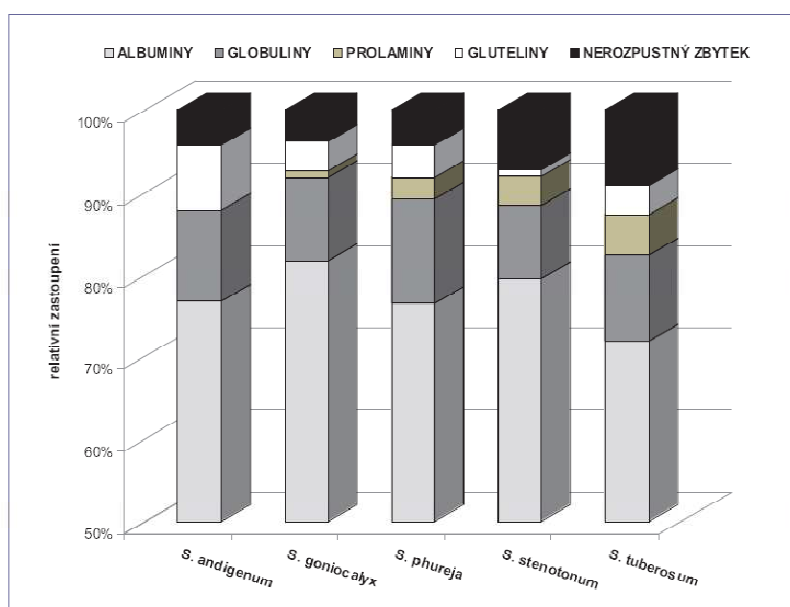
Druh	albuminy + NPN ¹	globuliny	prolaminy	gluteliny	nerozpustný zbytek	dusíkaté látky (součet frakcí)
<i>S. andigenum</i>	4,98	0,71	stopy	0,51	0,28	6,48
<i>S. goniocalyx</i>	4,28	0,53	0,05	0,19	0,20	5,24
<i>S. phureja</i>	5,05	0,84	0,18	0,26	0,28	6,60
<i>S. stenotomum</i>	5,85	0,65	0,26	0,06	0,53	7,35
<i>S. tuberosum</i>	4,94	0,71	0,34	0,25	0,63	6,86

vyjádřeno jako N x 6,25; ¹NPN – nebílkovinné dusíkaté látky

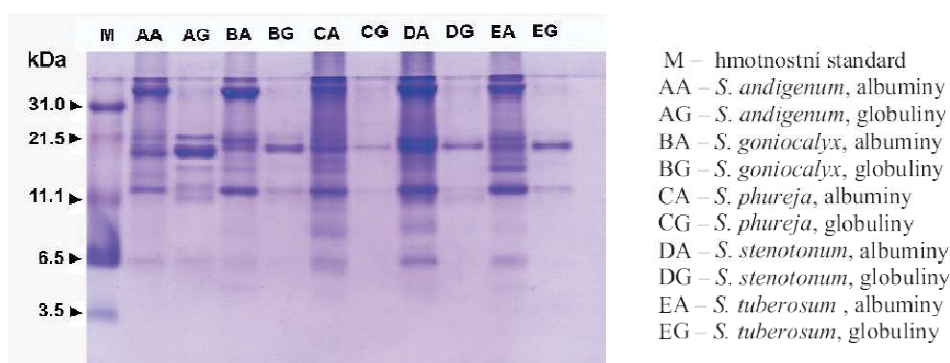
I přesto, že v této studii nebyl u vodorozpustné frakce odseparován bílkovinný (albuminový) podíl od dusíkatých látek nebílkovinného charakteru, lze albuminovou frakci bílkovin považovat za nejrozsáhlejší, což potvrzuje i provedená elektroforetická analýza (obr. 2). Z této analýzy je patrné, že bílkoviny s molekulovou hmotností v oblasti patatinu (40-45 kDa)

jsou téměř výhradně zastoupeny v této frakci. Zjištění nejrozsáhlejšího zastoupení vodorozpustných bílkovin je v souladu s předešlými výsledky (Seibles et al. 1979; Desborough 1983), které byly nalezeny u bílkovin hlíz druhu *S. tuberosum*. Nicméně jak vyplývá z literárních zdrojů (Shewry 2003; Bárta & Čurn 2004), zastoupení nebílkovinných dusíkatých látek v celkovém obsahu dusíkatých látek může být poměrně proměnlivé. Bude proto nutné i u této studie provést analýzu jejich zastoupení v obsahu celkových dusíkatých látek a ověřit tak existenci případných druhových rozdílů.

Obrázek 1: Relativní zastoupení bílkovinných frakcí v dusíkatých látkách u hodnocených genotypů.



Obrázek 2: SDS-PAGE albuminů a globulinů na peptidovém gelu.



Obsah globulinů – bílkovin rozpustných v 5% roztoku K_2SO_4 – se v sušině hlíz pohyboval od 0,53 (*S. goniocalyx*) do 0,84 (*S. phureja*) % a relativní zastoupení této frakce v celkových dusíkatých látkách představovalo interval od 9,1 (*S. stenotomum*) do 12,7 (*S. phureja*) %. Provedená SDS-PAGE analýza odhaluje, že globulinová frakce u všech hodnocených genotypů obsahuje rozdílně intenzivní bílkovinné pruhy s molekulovou hmotností okolo 20 kDa. V této oblasti se vyskytují především inhibitory proteas (Pouvreau 2004). Lze

předpokládat, že se jedná o frakci inhibitorů proteas, jejichž rozpustnost je ovlivňována vyšší iontovou silou extrakčního činidla. Tento předpoklad je pochopitelně nutné ověřit, nejlépe detailní proteomickou analýzou zahrnující identifikaci majoritních bílkovinných spotů pomocí technik hmotnostní spektrometrie po předchozí dvourozměrné elektroforéze. Pokud se tento předpoklad potvrdí, tato jednoduchá frakcionace dle rozpustnosti by mohla vést k jednoduché izolaci skupiny bílkovin, které jsou obecně považovány za součást obranného systému rostlin či jejich orgánů. Zastoupení ostatních dvou frakcí (prolaminy, gluteliny) bylo minoritní, ale mezi hodnocenými genotypy byly zaznamenány značné rozdíly (tab.1, obr. 1). Tento trend vykazuje i obsah tzv. „nerozpustného“ zbytku dusíkatých látek.

Závěr

Z prezentovaných výsledků vyplývá, že zastoupení bílkovinných frakcí je u hodnocených genotypů rozdílné, ale základní předpoklad převahy vodorozpustné frakce bílkovin byl potvrzen. Z výsledků také vyplynulo, že postupná frakcionace pomocí vody a 5% roztoku K₂SO₄ může být jednoduchým způsobem separace významných komponent bílkovinného spektra hlíz genotypů brambor. Na toto zjištění je nutné navázat detailními analýzami.

Použitá literatura :

- Bárta J., Čum V. (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Klasifikace, charakteristika, význam. *Chemické listy* 98: 373-378.
- 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.
- Chanput W., Theerakulkait C., Nakai S. (2009): Antioxidative properties of partially purified barley hormin, rice bran protein fractions and their hydrolase. *Journal of Cereal Science* 49: 422-428.
- Desborough S. L. (1983): Isozyme in Plant Genetisc and Breeding Breeding (S. D. Tanksley and T. J. Orton, eds.), díl B, Amsterdam, Elsevier, 167 p.
- Jideani I.A., Owusu R.K., Muller H.G. (1994): Protein of acha (*Digitaria exilis* Stapf): Solubility fractionation, gel filtration, and electrophoresis of protein fractions, *Food Chemistry* 51: 51-59.
- Judd R.C. (2002): SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of peptides. In: Walker J.M. The protein protocols handbook, 73-79 pp.
- Martinez-Villaluenga C., Gulewicz P., Frias J., Gulewicz K., Vidal-Valverde C. (2008): Assessment of protein fractions of three cultivars of *Pisum sativum* L.: effect of germination. *European Food Research and Technology* 226: 1465-1478.
- Pots A.M. (1999): Physico-chemical properties and thermal aggregation of patatin, the major potato tuber protein. PhD. thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, the Netherlands, 123 p.
- Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S.R., Brock van den L.A.M., Koningsveld van G.A., Voragen A.G.J. (2001): Relative Abundance and Inhibitory Distribution of Protease Inhibitors in Potato Juice from cv. Elkana, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2864-2874.
- Seibles T.S. (1979): Studies on potato proteins. *American Journal of potato research* 56: 415-425.
- Shewry P.R. (2003): Tuber storage proteins. *Annals of Botany* 91:1-15.

Výsledky byly získány v rámci řešení výzkumných projektů GAJU 064/2010/Z, GAČR 522/09/1693 a NAZV Q191A069.

Kontaktní adresa:

Bc. Adéla Brabcová

Oddělení pěstování rostlin, Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Studentská 13, 370 05 České Budějovice

e-mail: brabcova.adela@gmail.com