

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131-Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie

Vedoucí katedry: prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Purifikace bílkovin patatinového komplexu z hlíz
vybraných odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.)
a následná charakterizace izolovaných patatinových
bílkovin.**

Autor bakalářské práce: Eva Švehlová

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Veronika Bártová, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

České Budějovice 2014

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Eva ŠVEHLOVÁ
Osobní číslo: Z11342
Studijní program: B4131 Zemědělství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Název tématu: Purifikace bílkovin patatinového komplexu z hlíz vybraných odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.) a následná charakterizace izolovaných patatinových bílkovin
Zadávací katedra: Katedra rostlinné výroby a agroekologie


Zásady pro vypracování:

Bakalářská práce (BP) se bude zabývat postupem purifikace bílkovin patatinového komplexu z hlíz vybrané skupiny odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.). Vlastní řešení BP bude spočívat ve vypracování literárního přehledu se vztahem k řešené problematice - zmapování literárně dostupných informací týkající se vlastností patatinových bílkovin, možnosti jejich purifikace a potenciálu praktického využití. V experimentální části bude u vybrané skupiny odrůd brambor připravena hlízová šťáva, ze které budou následně s využitím různých chromatografických postupů purifikovány bílkoviny patatinového komplexu. Po kontrole purifikačního postupu pomocí elektroforetické analýzy budou získané vzorky patatinových bílkovin charakterizovány z hlediska jejich molekulové hmotnosti, počtu hmotnostních isoform, hodnoty jejich pI a relativní abundance. Získané výsledky budou statisticky vyhodnoceny a zpracovány výpočetní technikou do podoby fotodokumentace, tabulek a grafů. Součástí řešení práce bude diskuse získaných výsledků s dostupnými informacemi literárních pramenů.


Rozsah grafických prací: 5 - 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

Bárta J., Čurn V. (2004): Potato tuber proteins - classification, characterization, importance. Chem. 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 J. Food Sci. 26, 347-359.
Bárta, J., Bártová, V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, ISBN 978-80-7394-036-2, 116 p.
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
Literatura získaná na základě vlastní práce s databázovými a dalšími informačními systémy

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Veronika Bártová, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Konzultant bakalářské práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Datum zadání bakalářské práce: 27. března 2013
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2014


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvská 13 ④
370 05 České Budějovice


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

V Českých Budějovicích dne 27. března 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

.....
Datum

.....
Podpis studenta

Poděkování

Děkuji paní Ing. Veronice Bártové Ph.D. za cenné rady, připomínky a odbornou pomoc v laboratoři při zpracování mé bakalářské práce. Děkuji i mé rodině za velkou podporu během celého studia.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá postupem purifikace bílkovin patatinového komplexu z hlíz vybraných odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.). Jako výchozí materiál byla použita hlízová šťáva brambor z odrůd Laura, Sibů a Westamyl. Na základě literárně známých vlastností patatinu byla pro purifikaci zvolena kombinace ionto-výměnné (chromatografické medium DEAE) a afinitní chromatografie s biologickým ligandem se schopností vazby na sacharidickou část patatinové molekuly (chromatografické medium obsahující Concanavalin A). Zvolený způsob izolace patatinových bílkovin umožnil získání patatinové frakce ve vysoké čistotě u všech tří odrůdových vzorků, jak bylo potvrzeno SDS-PAGE analýzou. U všech odrůdových vzorků byla potvrzena antioxidační aktivita v rozmezí 0,007 až 0,086 mg kyseliny askorbové/g proteinu (odrůdové rozdíly byly statisticky rozdílné).

Klíčová slova: hlízy bramboru, bílkoviny, patatin

Abstrakt

The complex of patatin proteins were extracted from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) and its purification process is described in this work. The initial material for patatin protein isolation were potato fruit juices extracted from cultivars Laura, Sibü and Westamyl. Based on the known patatin's properties, the ion-exchange chromatography (DEAE medium) coupled with affinity chromatography was applied. We used the column containing biological ligand of Concanavalin A, which was able to bind the carbohydrates in the molecule of patatin proteins. The used purification process were successful and according to the SDS-PAGE analysis we obtained patatin proteins of a high purity from each the potato cultivars. The antioxidant activity was observed for all samples and range from 0,007 to 0,086 mg ascorbic acid concentration / g protein.

Key words: potato tubers, proteins, patatin

Obsah

Úvod	10
I. Literární část	12
1. Brambory (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	12
1.1 Původ, historie a systematika	12
1.2 Význam a využití	12
1.3 Pěstování	14
1.3.1 Příprava půdy	14
1.3.2 Ošetření během růstu	14
1.3.3 Sklizeň	15
1.3.4 Posklizňová úprava, skladování	15
1.3.5 Vlivy působící na obsah bílkovin v hlíze	16
2. Bílkoviny hlíz bramboru	16
2.1 Látkové složení hlíz	16
2.2 Dusíkaté látky	17
2.3 Hlízové bílkoviny	18
2.4 Inhibitory proteas	18
2.5 Ostatní bílkoviny	20
3. Patatin	20
3.1 Obecná charakteristika	20
3.2 Struktura	21
3.3 Isoformy patatinového komplexu	22
3.4 Enzymová aktivita	22
3.5 Využití vlastností patatinových bílkovin v průmyslových aplikacích ..	24
3.6 Izolace hlízových bílkovin	24
4. Antioxidanty hlíz brambor	25
5. Chromatografie	26
5.1 Historie	26
5.2 Princip, dělení a základní pojmy	26
5.3 Afinitní (biospecifická) chromatografie	28
5.4 Iontově výměnná chromatografie	28
6. Elektroforéza	29
II. Cíle práce	31
III. Materiál a metodika	32

7. Charakteristika vybraných odrůd	32
7.1 Laura – 07S0101917	32
7.2 Sibü – 07S0101760	32
7.3 Westamyl -07S0102007	33
8. Příprava hlízové šťávy	34
8.1 Odstranění škrobu z bramborové šťávy	34
9. Frakcionace bílkovin pomocí chromatografických technik	34
9.1 Frakcionace bílkovin hlízové šťávy pomocí iontovýmenného chromatografického média	35
9.2 Frakcionace bílkovin hlízové šťávy pomocí afinitního chromatografického média	36
9.3 Odsolování získaných patatinových frakcí	38
10. Stanovení obsahu bílkovin pomocí BCA metody	39
11. Elektroforetická analýza patatinových frakcí pomocí SDS-PAGE	39
12. Stanovení antioxidační hodnoty izolovaných patatinových frakcí	42
IV. Výsledky a diskuze	43
13. Purifikace patatinových bílkovin	43
14. Stanovení obsahu čistých bílkovin	45
15. Stanovení antioxidační aktivity	47
V. Závěr	49
VI. Použité zdroje informací	50

Úvod

Brambory (*Solanum tuberosum* L.) jsou velmi využívanou potravinou. Využívají se pro lidskou výživu, kde se konzumují v tepelně upravené formě, pro hospodářská zvířata jako krmivo i v oblasti průmyslové výroby mají své využití, např. pro výrobu škrobu. Hlavní složkou hlízy bramboru v čerstvé hmotě je voda, která tvoří asi 78 %. Další složky hlízy jsou sušina 22 %, škrob 15 %, dusíkaté látky 2 % a bílkoviny 1 % (Bárta, Bártová 2007). I přes nízký obsah bílkovin v hlíze bramboru, jsou právě tyto bílkoviny důležité. Mluví se o jejich nutriční hodnotě, antioxidantních vlastnostech, enzymových aktivitách, možné účasti na obranné fyziologii hlízy a potenciálu jejich využití v řadě průmyslových a biotechnologických aplikacích.

Bílkoviny hlíz bramboru se dělí na tři skupiny. První skupinou jsou inhibitory proteas. Tyto bílkoviny mají molekulovou hmotnost mezi 8 – 22 kDa. Slouží jako zásobní proteiny a jsou významnou součástí obranného systému rostlin (Jongsma 1995). Další složkou bílkovin jsou ostatní bílkoviny, ty mají molekulovou hmotnost mezi 60 – 69 kDa. Nejznámějším zástupcem této skupiny je bramborový lektin, u kterého se uvažuje o využití v biotechnologických aplikacích a genovém inženýrství (Bárta, Bártová 2007).

Poslední složkou bílkovin jsou bílkoviny patatinového komplexu. Jedná se o imunologicky identickou skupinu glykoproteinových bílkovin, jejichž molekulová hmotnost je 40 – 43 kDa (Bárta, Bártová 2007). Samotný patatin se v nativní formě považuje za dimer, s molekulovou hmotností 88 kDa. Díky sacharidové složce je označován za glykoprotein s různým počtem isoform, který má nábojovou heterogenitu (Bárta, Bártová 2007). Má potenciál využití v řadě aplikací mimo jiné i v potravinářském průmyslu.

Samotný patatin můžeme získat pomocí dvoustupňové purifikace, která využívá ionto výměnnou a afinitní chromatografii. Ten pak lze analyzovat nejrůznějšími způsoby. Elektroforetická metoda SDS-PAGE patatin rozdělí na jednotlivé isoformy, u kterých se výsledný počet pruhů liší podle odrůdy nebo

genotypu (Lee et al., 1983). Využití antioxidantních vlastností patatinu připadá v úvahu např. v oblastech produkce masných výrobků, kde patatin má potenciál inhibovat oxidaci lipidů (Lyn, Youling 2005).

I. LITERÁRNÍ ČÁST

1. Brambory (*Solanum tuberosum* L.)

1.1 Původ, historie a systematika

Brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří mezi vyšší dvouděložné rostliny čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) (Minx, Diviš et al., 1994). Jako jediný zástupce této čeledi vytváří hlízy, které vznikají za vhodných podmínek tloušťnutím podzemních stonků neboli stolonů. Hlízy bramboru jsou významný nutriční zdroj (Vokál et al., 2013). Hlízy obsahují v čerstvé hmotě přibližně 78% vody, 22% sušiny, 15% škrobu, 2 % dusíkatých látek a 1% bílkovin (Bárta, Bártová 2007). Další složky, které hlízy obsahují, jsou například cukry, vláknina a popeloviny.

Množení této plodiny v našich klimatických podmínkách je vegetativní, pomocí hlíz (Rybáček et al., 1988). Touto cestou vzniká stále stejná odrůda. Druhým typem množení je generativní, pomocí semen, při kterém vzniká nový genotyp a posléze nová odrůda. Tento typ množení je součástí šlechtitelského procesu (Vokál et al., 2013).

Za místo původu brambor se označuje oblast And (Columbie, Ekvador, Peru a část Chile), kde hlíznaté formy bramboru začali pěstovat a využívat Indiáni (Jůzl et al., 2000; Vokál et al., 2013). Do Evropy se dostal brambor z horské, rovníkové oblasti v bývalé říši Inků a to jako druh *Solanum andigenum* v polovině 16. století (Minx, Diviš et al., 1994). Podle Rybáčka et al., (1988) byly poprvé bramborové hlízy využity jako potraviny v 16. století ve Francii. Naopak Kutnara (1963) uvádí první zmínku ze 17. století a to v Irsku. Pěstování na území Čech je zaznamenáno od poloviny 17. století.

1.2 Význam a využití

Brambory se hlavně využívají jako lidská potrava, surovina pro průmysl i krmivo pro hospodářská zvířata. V průmyslu se například používají na výrobu škrobu, lihu, izolaci bílkovin a výrobu bílkovinných koncentrátů (Jůzl et al., 2000).

Brambory rozdělujeme do tří základních kategorií (Prugar et al., 2008):

A) Podle komerčního využití produktu

- Konzumní brambory rané – jsou brambory sklizené s nevyzrálou slupkou před dosažením fyziologické zralosti. Hlízy musí být větší než 28 mm a sklizené do konce června. Při obchodování se nemusí uvádět varný typ. Limitní obsah dusičnanů je 500 mg/kg.
- Konzumní brambory nové – jsou brambory dovážené od 1. ledna do 15. května. Tyto brambory jsou např. z oblasti Maroka a Egypta.
- Konzumní brambory ostatní – jsou brambory sklizené od 1. července. Velikost hlízy musí být větší než 35 mm. Při obchodování musí být uveden varný typ, název odrůdy a země původu.
- Průmyslové brambory – využívány ve škrobárenství, lihovarnictví a sušárnách. Obsah škrobu u těchto brambor musí být nejméně 15%, nejlépe více jak 18%.

B) Podle délky vegetační doby (Jůzl et al., 2000)

- Velmi rané odrůdy – vegetační doba 90 – 100 dní.
- Rané odrůdy – vegetační doba 100 – 110 dní.
- Polorané odrůdy – vegetační doba 110 – 130 dní.
- Polopozdní odrůdy – vegetační doba nad 130 dní

C) Podle varného typu (Prugar et al., 2008)

- Varný typ A, AB – pevné až velmi pevné hlízy. Hlízy jsou velmi málo moučnaté s jemnou strukturou. Nerozvaňují se, proto jsou vhodné pro přípravu salátů i jako příloha.
- Varný typ B, BA, BC – středně pevné až kypré hlízy. Hlízy jsou středně moučnaté s polojemnou strukturou. Jsou vhodné pro přípravu těst, kaší, hranolek i lupínků. Také se hodí do polévek a jako příloha.
- Varný typ C, CB – tyto brambory mají kypré hlízy. Hlízy jsou silně moučnaté se středně hrubou strukturou. Jsou silně rozvaňivé a proto se hodí pro výrobu kaší a těst.

Brambory využívané pro výrobu škrobu obsahují v průměru 1,28 % patatinu v sušině hlíz, brambory konzumní v průměru 1,03 % patatinu v sušině hlíz (Bárta, Bártová 2008). Obsah patatinu se liší podle odrůdy a je závislý na klimatických podmínkách.

1.3 Pěstování

1.3.1 Příprava půdy

Brambory se řadí mezi zlepšující a odplevelující plodiny (Vokál et al., 2000). Proto se používají pro brambory jako předplodina vojtěška, jetel, víceleté traviny, ale i kukuřice, krmná řepa nebo luskoviny (Jůzl et al., 2000; Vokál et al., 2013). Jejich pěstování se často v důsledku hnojení chlévským hnojem řadí mezi dvě obiloviny (Jůzl et al., 2000).

Pro pěstování brambor se nejlépe hodí pozemky s lehčí až středně těžkou půdou, nízkou svažitostí a pH v rozmezí 5,5 – 6,5 (Jůzl et al., 2000; Vokál et al., 2013). Zároveň je důležité půdu na podzim dobře připravit. Nejprve se provede podmítka, která je důležitá pro udržení půdní vláhy a zničení plevelů. Poté se provede orba do hloubky 25 – 35 cm, při které se zapraví organické hnojivo (Minx, Diviš et al., 1994).

Na jaře se obvykle provádí kypření do hloubky 15 – 20 cm podle druhu půdy (Jůzl et al., 2000). Při sázení by se mělo dbát na stejnou hloubku sázení, která zvyšuje šance na rovnoměrné a rychlé vzcházení hlíz (Minx, Diviš et al., 1994). Důležitá je také včasná ochrana proti plevelům, chorobám a škůdcům.

1.3.2 Ošetření během růstu

Důležité je zajistit kyprý stav ornice, zničení plevelů, udržet dobrou prosévatelnost ornice a zajištění bezztrátových výnosů (Minx, Diviš et al., 1994). Před vzejitím se provádí mechanická kultivace, která se skládá ze systému vláčení a poorávek v určitých časových rozpětí (Vokál et al., 2000). Důležitým krokem je ochrana proti chorobám a škůdcům, kdy při napadení dochází ke ztrátám na výnosu

(Vokál et al., 2013). Aplikují se registrované chemické, fyzikální a biologické postřiky, ale využívá se i agrotechnických opatření (Vokál et al., 2013). Předjetím proti napadení je i využití odolných odrůd.

Při regulaci zaplevelení je důležité střídání plodin v osevním postupu a použití selektivních přípravků v daných kulturách (Vokál et al., 2013). Herbicidy se aplikují ještě před vzejitím brambor (Vokál et al., 2000). V případech, že se herbicid nedá použít, se po vzejití využívá plečkování, to zabraňuje zaplevelení i provzdušňuje půdu (Vokál et al., 2000). Posledním krokem prováděným před přípravou na sklizeň je nahrnování, ve kterém se může aplikovat i herbicid (Vokál et al., 2000).

1.3.3 Sklizeň

Před sklizní dochází k ukončení vegetace. Ta se ukončí odstraněním natě před jejím přirozeným dozráním a odumřením (Vokál et al., 2013). Odstranění natě je možné mechanicky, prováděné 5 – 10 dní před sklizní (Minx, Diviš et al., 1994). Dalším typem zničení natě je desikace, využití chemických přípravků. Tento způsob se využívá pro předčasné ukončení vegetace. Sklizeň musí proběhnout nejdéle 30. den po desikaci (Minx, Diviš et al., 1994). Dá se využít i spojení desikace a mechanického ničení.

Samotná sklizeň se provádí několika způsoby. Při přímé sklizni se využívá jednořádkový sklízeč, dvouřádkový sklízeč nebo vyorávací nakladač (Jůzl et al., 2000). Při ručním sběru se využívá vyorávač s rozmetacím kolem nebo dvouřádkový vyorávač. Posledním způsobem je dělená sklizeň. Ta spočívá ve vyorání hlíz, které se nechají uschnout a pak se ručně sbírají (Jůzl et al., 2000).

1.3.4 Posklizňová úprava, skladování

Posklizňová úprava zahrnuje oddělení nežádoucích příměsí (kameny, natě, špatné hlízy,...) a roztřídění hlíz podle velikosti (Vokál et al., 2013). Jednotlivé hlízy jsou pak uschovány do skladů podle velikosti a druhu, odkud putují k odběrateli. Při skladování je důležité dbát na co nejmenší mechanické poškození (Vokál et al.,

2013). Hlízy jsou ve skladech baleny podle požadavků spotřebitele, nejčastěji od 2,5 do 25 kg (Vokál et al., 2013). Cílem skladování je uchovat hlízy v požadované kvalitě s co nejmenšími ztrátami (Vokál et al., 2013).

1.3.5 Vlivy působící na obsah bílkovin v hlíze

Jedním z vlivů působících na obsah bílkovin v hlíze bramboru je odrůda (Bárta, Bártová 2007). Obsah bílkovin u jednotlivých odrůd se dá zvýšit pomocí šlechtění. Dalším z vlivů je hnojení dusíkem. Nejvíce používané je organické hnojení chlévským hnojem, ale používají se i zelená, stájová a průmyslová hnojiva (Vokál et al., 2000). Důležitou funkci zastává i správná funkce fotosyntézy, délka vegetační doby, velikost a vyzrállost hlíz.

2. Bílkoviny hlíz bramboru

2.1 Látkové složení hlíz

Jedná se o nutričně nejhodnotnější bílkoviny rostlinného původu (Bárta, Čurn 2004). Největší zastoupení v hlízách má voda a to v 70 – 82 % hmotnosti hlízy (Vokál et al., 2013). Další významnou složkou hlíz je polysacharid škrob, který se v hlízách vyskytuje v rozmezí 12 – 24 % čerstvé hmoty (Prugar et al., 2008; Vokál et al., 2013). Škrob ale není jediným sacharidem, který se v hlízách vyskytuje. Své zastoupení tu mají i glukóza, fruktóza a sacharóza, jejichž množství je 0,5 % (Minx, Diviš et al., 1994). Mezi další složky patří popeloviny, bílkoviny, ale i třeba tuk (Jůzl et al., 2000). Jejich procentuální vyjádření jak v sušině, tak v čerstvé hmotě najdete v tabulce číslo 1.

Tab. 1 - Látkové složení hlíz bramboru (Vokál et al., 2013)

Složení (látka)	Vyjádření v čerstvé hmotě (%)	Vyjádření v sušině (%)
Voda	68 – 83	–
Sušina	17 – 32	100
Škrob	11 – 26	60 – 80
Celkový cukr	0,5	2,1
Vláknina	1 – 2	4 – 10
Dusíkaté látky	1 – 3	6 – 15
Bílkoviny	0,5 – 2	3 – 8
Volné aminokyseliny	0,1 – 1	0,5 – 4
Lipidy	0,1	0,4
Popeloviny	1,1	4,6

2.2 Dusíkaté látky

Obsah dusíkatých látek v hlízách je asi 2 %, který zahrnuje bílkoviny, aminokyseliny, amidy a anorganické sloučeniny (Vokál et al., 2000). Procentuální vyjádření jednotlivých dusíkatých složek v hlíze, je asi takové: 50 % bílkoviny, 15 % volné aminokyseliny, 23 % amidy a 12 % ostatní dusíkaté látky (Bárta, Bártová 2007).

Ze základních 20 aminokyselin jsou nejvíce v hlízách zastoupeny amidy kyselin asparagové a glutamové (Bárta, Bártová 2007). Ty představují zásobní zdroj dusíku. Tomu napomáhá i arginin. Významnou složkou jsou také dusičnany, zdraví škodlivé látky, jejichž obsah není vysoký. Pohybuje se kolem 4 %. Množství dusičnanů je ovlivněno genotypem, prostředím, odrůdou i hnojením (Rybáček et al., 1988). Množství je dáno i normou. Tato norma pro konzumní brambory rané je 500 mg/kg hlíz a 300 mg/kg hlíz u brambor konzumních pozdních (Prugar et al., 2008). Snížení jejich obsahu až o 50 % se dá pomocí kuchyňských úprav (loupání, vaření).

2.3 Hlízové bílkoviny

Bílkovina hlíz brambor není homogenní složkou (Bárta, Bártová 2007). Dělí se podle rozpustnosti na albuminovou, globulinovou, glutelinovou a prolaminovou frakci (Rybáček et al., 1988). Globulinová frakce je také označována jako tuberin, albuminová frakce jako tuberinin (Bárta, Bártová 2007). Jejich zastoupení se mezi autory liší. Např. Seibles (1979) uvádí podíl albuminové frakce 75 % a 25 % globulinové frakce. Linder et al., (1960) uvádí podíl albuminové frakce 50 %, globulinové 26 % a 22 % zbytek bílkovin.

Další dělení těchto bílkovin je podle charakteristik vycházejících z analýz elektroforetickými metodami. Nejpoužívanější a nejvýznamnější je technika SDS-PAGE (Bárta, Bártová 2007). Jde o elektroforézu na polyakrylamidovém gelu, která dělí bílkoviny podle jejich molekulové hmotnosti.

Charakterizací hlízových bílkovin pomocí SDS-PAGE lze rozlišit následující skupiny: patatin (20 – 40%), inhibitory proteas (20 – 30%) a ostatní bílkoviny (20 – 30%). Mezi ně patří např. syntasa škrobu nebo hlízový lektin (Prugar et al., 2008).

2.4 Inhibitory proteas

Rostlinné inhibitory proteas jsou významnou součástí obranného systému rostlin, sloužící jako obrana vůči napadení rostliny patogeny či hmyzem (Jongsma 1995). Tyto inhibitory zároveň slouží jako zásobní bílkoviny rostlin.

Jednou z klasifikací inhibitor proteas je klasifikace podle místa proteas, které inhibují (Bárta, Bártová 2007).

- a) Serinové – serin či histidin v aktivním místě proteasy
- b) Cysteinové – cystein v aktivním místě
- c) Aspartátové – aspartátová skupina v aktivním místě
- d) Metalloproteasové – s kovovým iontem v aktivním místě

Dalším dělením inhibitorů proteas je dělení podle molekulové hmotnosti, stavby molekuly, hodnoty isoelektrického bodu a počtu sulfidických můstků v molekule.

1. Bramborový inhibitor I: skládá se z pěti podjednotek o velikosti 7,7 – 7,9 kDa. Existuje 8 forem. Isoelektrický bod je v rozmezí pH 5,1 – 7,8. Ve šťávě brambor představuje 4,5 % z celkových bílkovin, 2 % trypsinové a 19 % chymotrypsinové aktivity inhibitorů proteas (Bárta, Bártová 2007).
2. Bramborový inhibitor II: skládá se z 2 podjednotek, jedná se tedy o dimer o velikosti 10,2 kDa. Zahrnuje 7 isoform. Isoelektrický bod je v rozmezí pH 5,5 – 6,9. Ve šťávě brambor představuje 22 % z celkových bílkovin, 82 % trypsinové a 50 % chymotrypsinové aktivity inhibitorů proteas (Bárta, Bártová 2007).
3. Bramborový cysteinový inhibitor: je tvořen 9 různými inhibitory. Rozmezí velikosti jednotlivých inhibitorů je 20,1 – 22,8 kDa. Isoelektrický bod je v rozmezí pH 5,8 – 9. Představuje přibližně 12 % celkových bílkovin (Bárta, Bártová 2007).
4. Bramborový aspartátový inhibitor proteas: je tvořen 6 různými inhibitory. Rozmezí velikosti jednotlivých inhibitorů je 19,9 - 22 kDa. Isoelektrický bod je v rozmezí pH 6,2 – 8,7. Představuje přibližně 6 % celkových bílkovin, 9 % chymotrypsinové a 2 % trypsinové inhibiční aktivity (Bárta, Bártová 2007).
5. Bramborové inhibitory proteas Kunitzova typu: jsou tvořeny 2 bílkovinami o velikosti 20,2 kDa. Isoelektrický bod je v rozmezí pH 8 - 9. Představuje přibližně 4 % celkových bílkovin, 2 % chymotrypsinové a 3 % trypsinové aktivity bramborové šťávy (Bárta, Bártová 2007).

6. Ostatní serinové inhibitory proteas: jsou tvořeny 2 zástupci. Rozmezí velikosti jednotlivých inhibitorů je 21 a 21,8 kDa (Suh et al., 1990; Valueva et al., 1997). Isoelektrický bod je v rozmezí pH 7,5 – 8,8. Představuje přibližně 1,5 % celkových bílkovin, 2 % chymotrypsinové a 3 % trypsinové aktivity bramborové šťávy (Bárta, Bártová 2007).
7. Bramborový karboxypeptidasový inhibitor proteas: je tvořen jednou bílkovinou. Jeho velikost je 4,3 kDa. Představuje přibližně 1 % celkových bílkovin. Je tepelně odolný a aktivní vůči karboxypeptidase A (Bárta, Bártová 2007).

2.5 Ostatní bílkoviny

Do této skupiny patří zbylé bílkoviny, které díky svým vlastnostem nelze řadit mezi patatin či inhibitory proteas (Pots et al., 1999). Mají také vyšší molekulovou hmotnost. Do této skupiny patří hlízový lektin, polyfenoloxidas o velikosti 60 a 69 kDa, protein kinasa, enzymy s účastí na syntéze škrobu a fosforylasové izoenzymy (Bárta, Bártová 2007).

Bramborový lektin (*Solanum tuberosum* agglutinin – STA) je nejvýznamnějším zástupcem ostatních bílkovin. Uvažovalo se o využití lektinu v genovém inženýrství a biotechnologických aplikacích (Bárta, Bártová 2007). Jedná se o chimerickou bílkovinu, která se váže na chitin (Kieliszewski et al., 1994). Skládá se z lektinové domény a glykoproteinové domény, které jsou navzájem spojeny doménou se 60 aminokyselinovými zbytky (Damme et al., 2004; Kieliszewski et al., 1994). V nativním stavu je hmotnost bramborového lektinu 100 kDa.

3. Patatin – bílkoviny patatinového komplexu

3.1 Obecná charakteristika

Jedná se o imunologicky identickou skupinu glykoproteinových bílkovin (Bárta, Bártová 2008). Molekulová hmotnost je 40 – 43 kDa a hodnota isoelektrického bodu v rozmezí pH 4,6 – 5,2 (Pots et al., 1999). Rozdílnou molární

hmotnost způsobuje glykosylace v kombinaci s mutacemi v primární sekvenci řetězce (Bárta, Bártová 2008). Poprvé byly izolovány pomocí iontovýměnné a afinitní chromatografie v roce 1980 (Racusen, Foote 1980).

Nachází se v centrálních vakuolách parenchymatických buněk (Sonnewald et al., 1989). Zaujímají 20 – 40 % rozpustných bílkovin bramborových hlíz. Jejich hlavní funkcí je pravděpodobně zásobní funkce (Rosahl et al., 1986). V jednom haploidním genomu brambor se nachází 10-18 kopií patatinového genu (Twell, Ooms 1988). Obsah patatinu závisí na agro-ekologických podmínkách, vývoji hlízy, době skladování a na kultivaru odrůdy (Hannapel 1991).

Z hlediska genové exprese se dělí na dvě třídy. Dohromady zahrnují 50 – 70 genů, z nichž 98 % je homogenních (Twell, Ooms 1988). Jsou lokalizovány v jediném lokusu na chromosomu 8 (Ganal et al., 1991; Stupar et al., 2006).

- a) Třída I – vyskytuje se i exprimuje v hlíze. Obsahuje domény A-box a B-box, které vážou bílkoviny jádra, u kterých se předpokládá funkce transkripčních faktorů (Bárta, Bártová 2007; Grierson et al., 1994).
- b) Třída II – se vyskytuje hlavně v kořenech. V hlízách se tato třída vyskytuje 50 – 100 krát méně než třída I. Exprimuje se v celé rostlině v nízkých hladinách (Bárta, Bártová 2007).

3.2 Struktura

Patatin je v nativní formě považován za dimer s přibližnou molekulovou hmotností 88 kDa (Racusen, Weller 1984). Skládá se z 366 aminokyselin, jejichž pozitivní a negativní konce jsou náhodně rozmístěné po celé sekvenci (Bárta, Čurn 2004). Řetězec obsahuje 17 zbytků tyrosinu, 2 zbytky tryptofanu a 2 zbytky asparaginu (Bárta, Bártová 2007). Asparaginové zbytky umožňují glykosylaci.

Patatin obsahuje sacharidovou část, která zaujímá asi 4 % z celkové hmotnosti molekuly (Sonnewald et al., 1989; Pots et al., 1999). Nativní patatin má

cylindrický tvar (Pots et al., 1999). Sekundární struktura patatinu může být α -helikální i β -řetězec. Jeho terciární struktura z hlediska nativních vlastností je nevratně zničena při teplotě 55 – 75°C a hodnotě pH méně než 5 (Bárta, Bártová 2007; Koningsveld et al., 2001).

3.3 Isoformy patatinového komplexu

Patatin je řazen mezi jeden bílkovinný druh, přestože u něj byla objevena nábojová heterogenita (Bárta, Bártová 2007). Jednotlivé isoformy jsou imunologicky stejné a vizuálně se projevují jako proužek při elektroforetické analýze, kterou je například metoda SDS-PAGE (Bárta, Čurn 2004). Počet pruhů je rozdílný, záleží na odrůdě, ale i třeba genotypu (Lee et al., 1983). Existuje až 15 imunologicky identických glykoproteinových isoform, které mají podobnou hodnotou isoelektrického bodu a přibližnou molekulovou hmotností monomeru 40 kDa (Sonnewald et al., 1989). Za existenci identických isoform mohou bodové mutace v primární struktuře bílkoviny a glykosylace.

3.4 Enzymová aktivita

1. Aktivita nesespecifické lipid acyl hydrolasy

U patatinu byla objevena esterasová aktivita pro tvorbu vosků i pro deacylace lipidů (Dennis, Gilliard 1974). Jedná se o vysokou aktivitu vůči substrátům, jako jsou fosfolipidy, monoacylglyceroly a p-nitrofenylové estery karboxylových kyselin (Bárta, Bártová 2007). Střední aktivita byla zjištěna vůči galaktolipidům a zcela negativní proti diacyl a triacyl glycerolům (Andrews et al., 1988). Aktivita se liší podle odrůdy. Otázkou je, zda aktivita způsobuje odolnost vůči patogenům, protože tvoří ve vodě nerozpustné vosky, které zabraňují pronikání patogenů do rostliny (Bárta, Bártová 2007; Pots et al., 1999). Tato obranná schopnost zatím nebyla prokázána.

2. Aktivita cytosolové fosfolipázy A1 a A2

Enzym s fosfolipasovou aktivitou má hmotnost 40 kDa a jeho isoelektrický bod je 4,75 (Bárta, Bártová 2007). Tento enzym je považován za patatin (Senda et al., 1996). Aktivita fosfolipázy A2 je vyšší. Jde o lipolytický enzym, který katalyzuje hydrolýzu esterové vazby mastných kyselin v pozici sn-2 u diacylfosfolipidů (Bárta, Bártová 2007). Nejvyšší aktivita je v pH 7,5 – 9, pod pH 6 je aktivita minimální. Aktivita patatinu závisí na jeho umístění v rostlině. Neaktivní je ve vakuolách, v cytosolu je aktivní.

3. Aktivita β - 1,2 – xylosidasy

Získává se pomocí chromatografických technik. Bílkovina s touto aktivitou patří k bílkovinám patatinového komplexu. Molekulová hmotnost bílkoviny je 39 – 40 kDa. Její isoelektrický bod v 5,1 a pH pro optimální aktivitu při 50°C je 4 – 4,5 (Bárta, Bártová 2007). Izolovaná β – 1,2 – xyloxidasa má schopnost uvolňovat z *N* – glykanů xylosidasové molekuly vázané β – 1,2 vazbou na β – manosu. Dále byla zjištěna vysoká homologie *N* – koncové sekvence proti isoformám patatinových bílkovin. β – 1,2 – xyloxidasa izolovaná z hlíz brambor má optimální čistotu a rozsah aktivit pro komerční použití. Přesná fyziologická funkce této bílkoviny není známa, předpokládá se možná účast na obranném systému hlízy (Peyer et al., 2004).

4. Aktivita kyselého β – 1,3 – glukanasasy

Izolace kyselého β – 1,3 – glukanasasy z hlíz brambor proběhla pomocí iontovýmenné a afinitní chromatografie. Tento enzym je řazen mezi bílkoviny patatinového komplexu (Tonón et al., 2001). Hmotnost je 40 kDa a isoelektrický bod se nachází v rozmezí 4 – 4,5. Byla prokázána homogenita *N* – terminální sekvence aminokyseliny s bílkoviny patatinového komplexu (Bárta, Bártová 2007). Výskyt β – 1,3 – glukanasasy je u vyšších rostlin obvykle spojena s obranou vůči napadení a šíření patogenů (Selitrennikoff 2001; Tonón et al., 2001). β – 1,3 – glukanasasa izolována z hlíz brambor je schopna se vázat na stěny hub

a následně je degradovat, a to včetně významného houbového patogena brambor *Phytophthora infestans* (Tonón et al., 2001).

3.5 Využití vlastností patatinových bílkovin v průmyslových aplikacích

Patatin má schopnost vytvářet pěnu a emulzi. Tyto vlastnosti patatinu mají své potencionální využití v kosmetickém a potravinářském průmyslu (Bárta, Bártová 2007). Pěna je obecně definována jako dvoufázový systém, ve kterém je odlišná plynná fáze obklopena spojitou fází (Philips et al., 1990). Existují studie, které dávají předpoklad využití patatinu pro tvorbu emulzí a syntézu speciálních monoglycerolů (Macrae et al., 1998).

V potravinářství slouží hlavně pro zvýraznění chuti a vylepšení výživové hodnoty, především u instantních polévek, omáček i sušených výrobků z brambor (Bárta, Čurn 2004). Bylo by také možné využít antioxidační aktivitu patatinových bílkovin, například ve výrobcích z vařeného hovězího masa, kde patatin také inhibuje oxidaci lipidů (Lyn, Youling 2005).

3.6 Izolace hlízových bílkovin

Jedním z možných zdrojů hlízových bílkovin pro potřeby jejich průmyslové izolace a následného využití je tzv. hlízová voda. Jejich obsah v sušině hlízové vody je přibližně 27 % (Bárta, Bártová 2007). Bílkoviny lze izolovat pomocí tepelné koagulace injekcí páry a po předchozím okyselení. Tato metoda představuje relativně vysoké nároky na energii, ale je to metoda izolace hlízových bílkovin běžně používaná v Německu a v Nizozemí (Zwijnenberg et al., 2002). Výsledný a upravený produkt této metody se používá jako bílkovinné krmivo pro domácí a hospodářská zvířata (Bárta, Bártová 2007; Zwijnenberg et al., 2002).

Samotný patatin můžeme získat pomocí dvoustupňové purifikace. To lze například z hlízové šťávy nebo roztoku získaného extrakcí hlízových pletiv v lyofilizovaném stavu. Prvním krokem je iontovýměnná chromatografie na anexu (anex je celulosové médium s ligandem DEAE) (Bárta et al., 2013). Dalším krokem

této izolace je afinitní chromatografie pro purifikaci glykoproteinů. Ta se provádí na agarosovém médiu s biologickým ligandem – lektinem Konkanavalinem A. Zachycení patatinu na Konkanavalinu A je výhodné z důvodu biokompatibility dvou molekul – ligandu a sacharidu/glykoproteinu (Bárta et al., 2013). Posledním krokem této izolace je odsolování patatinu například pomocí gelové filtrace (Bárta et al., 2013).

4. Antioxidanty hlíz brambor

Brambory jsou jedním z nejvýznamnějších zdrojů antioxidantů. Antioxidanty zachycují volné radikály a ukončují řetězovou reakci, při níž může dojít k poškození částí buněk, jako je například buněčná membrána nebo DNA (Čepl 2008). Pokud by k poškození došlo, buňky by špatně fungovaly nebo by umřely, můžou volné radikály způsobovat různá onemocnění. Mezi nejčastěji uváděné onemocnění patří rakovina, nemoci cév a srdce, předčasné stárnutí i poruchy imunitního systému (Čepl 2008). Antioxidanty obsažené v hlízách brambor jsou: polyfenoly (anthokyaniny, L-tyrosin, kyselina chlorogenová a kávová), karotenoidy (lutein, zeaxanthin a β karoten), tokoferoly (vitamín E), kyselina L-askorbová (vitamín C) a selen (Čepl 2008). V menší míře vykazují antioxidační aktivitu i proteiny. Nejvíce antioxidantů obsahují červeně a modře zbarvené odrůdy brambor (Šulz et al., 2007).

Tab. 9: Obsah antioxidantů v hlíze brambor (Vokál et al., 2013)

Antioxidant	Obsah mg/kg v hlíze
Polyfenoly	1226 – 4405
L-askorbová kyselina	170 - 990
Karotenoidy	4,5
α -tokoferol	0,5 - 2,8
Selen	0,01

5. Chromatografie

5.1 Historie

Prvním objevitelem kapalinové kolonové chromatografie byl ruský botanik Cvět (Drbal, Křížek 1999). Ten na počátku 20. století rozdělil chloroplastové pigmenty z rostlinných extraktů na sloupci uhličitanu vápenatého (Káš et al., 2005).

Tato metoda je jednou z nejvýznamnějších v oblasti analytických separačních metod (Drbal, Křížek 1999). V posledních letech dosáhly chromatografické metody velkého rozšíření, lze pomocí nich zjistit jak kvalitativní tak kvantitativní složení směsi (Káš et al., 2005). Pro přesnou a hlavně úplnou identifikaci zkoumané složky je vhodné spojit tuto metodu ještě s dalšími, např. se spektrometrií (Káš et al., 2005)

5.2 Princip, dělení a základní pojmy

Principem dělení látek pomocí chromatografických technik je opakovaný transport složek do stacionární fáze a zpět do mobilní (Káš et al., 2005).

Chromatografie se skládá ze dvou fází, mobilní (pohyblivá fáze) a stacionární (nepohyblivá fáze) (Drbal, Křížek 1999). Mobilní fáze je kapalina nebo plyn. Stacionární fáze je rozdílná podle druhu chromatografie (např. částice tuhé fáze), díky odlišnosti substrátu se tato fáze nazývá sorbent (Káš et al., 2005). Sorbentem je myšlena naplněná kolona, přes kterou prochází určitou rychlostí mobilní fáze (Drbal, Křížek 1999).

Jedním z hlavních dělení chromatografických metod je podle skupenství fází, a to na plynovou a kapalinovou chromatografii (Drbal, Křížek 1999). Plynová chromatografie pracuje nejčastěji v systému plyn-kapalina, ale i v systému plyn-pevná látka. Kapalinová chromatografie pracuje v systému kapalina-kapalina nebo pevná látka-kapalina (Káš et al., 2005).

Další dělení závisí na separačním mechanismu, tzn. na charakteru interakce dělené látky se stacionární fází (Káš et al., 2005). Jedná se např. o iontově výměnné, adsorpční, gelové nebo rozdělovací chromatografie (Drbal, Křížek 1999).

Kapalinová chromatografie se ještě dělí podle eluční síly mobilní fáze a podle způsobu zavádění vzorku na kolonu (Drbal, Křížek 1999). Nejvíce se používá tzv. eluční vyvíjení, kdy dochází k postupnému dělení směsi na koloně (Drbal, Křížek 1999; Štulík et al., 2005).

Tab. 2: Nejdůležitější chromatografické metody (Káš et al., 2005)

Mobilní fáze	Separační mechanismus	Metoda	Užívaná zkratka
Plyn	síťový efekt	plynová chromatografie na molekulových sítěch	GSC
	Adsorpce	plynová adsorpční chromatografie	
	Rozdělování	plynová rozdělovací chromatografie	GLC
Kapalina	síťový efekt	gelová permeační chromatografie	GPC
	Adsorpce	kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
	Rozdělování	kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
	Chemisorpce	iontová výměnná chromatografie	IEC
	specifická interakce biomolekul	afinitní chromatografie	

5.3 Afinitní (biospecifická) chromatografie

Afinitní chromatografie patří mezi nepostradatelné metody v biomedicině a v biotechnologiích (Štulík et al., 2005). Jde o separační techniku patřící mezi adsorpční chromatografii, která dokáže specificky rozpoznat jiné molekuly (Káš et al., 2005). Je založena na specifických a reversibilních interakcích mezi dvěma biologicky aktivními látkami – analytem a ligandem (Káš et al., 2005). Příkladem může být interakce mezi enzymem a inhibitorem, protilátkou a antigenem nebo obecně enzym se substrátem či enzym s kofaktorem (Štulík et al., 2005).

Pro stacionární fázi afinitní chromatografie se využívají kolony s nosičem, který obsahuje kovalentně vázaný ligand (Štulík et al., 2005). Na kolonu se aplikuje vzorek, separovaná látka se na koloně zadrží, protože vytvoří vazbu molekula-ligand (Káš et al., 2005). Látky, které nemají afinitu k ligandu, projdou přes kolonu, aniž by se zadržely. Poté se uvolní navázaná molekula specifickou či nespecifickou elucí. Specificky se uvolní například volným ligandem, nespecificky změnou pH či změnou teploty (Káš et al., 2005; Štulík et al., 2005).

Na nosič ve stacionární fázi jsou vysoké požadavky. Daný nosič musí být hydrofilní, mechanicky i chemicky odolný (Káš et al., 2005). Také musí být nerozpustný v používaném rozpouštědle, mít specifický povrch a dostatečnou permeabilitu (Štulík et al., 2005). Nejčastěji se jako nosič využívá bílkovina, agarosa, organické polymery a další (Štulík et al., 2005).

5.4 Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie patří mezi separační metody, její podstatou jsou elektrostatické interakce (Štulík et al., 2005). Stacionární fáze obsahuje měniče iontů (ionexy). Měníče kationtů, obsahující záporně nabití ionty se nazývají katexy. Měníče aniontů, obsahující kladně nabití ionty se nazývají anexy (Káš et al., 2005). Tyto měniče se dále dělí na slabé a silné měniče, podle stupně disociace v závislosti na pH. Slabé anexy ztrácejí náboj při pH nad 9, slabé katexy při pH pod 6 (Káš et al., 2005).

Tab. 3: Základní dělení ionexů (Štulík et al., 2005)

Funkční skupina	Ionex
karboxylová (-COOH)	slabý měnič kationtů
sulfoskupina (-SO ₃ H)	silný měnič kationtů
aminoskupina (-NH ₂)	slabý měnič aniontů
tetraalkylamoniová (-N ⁺ (R) ₃)	silný měnič aniontů

Jako matrice stacionární fáze se používají syntetické pryskyřice, celuloza nebo gely na bázi polyakrylamidu, dextranů nebo agarosy (Káš et al., 2005). Mobilní fázi tvoří vodné tlumivé roztoky, ty obsahují ionty (tzv. protiionty), které jsou v dynamické rovnováze s ionty měniče (Štulík et al., 2005). Pokud mají tyto protiionty vyšší koncentraci, dochází k rychlejší eluci analytů z kolony (Štulík et al., 2005)

Samotná separace probíhá ve dvou krocích. Nejprve dojde k navázání (sorpci) separované látky na ionex, poté k desorpci navázané látky z kolony (Káš et al., 2005). To lze provést buď v kolonách, nebo vsádkově. Důležité pro provedení na kolonách je výška a průměr kolony. Separovaná látka musí být zachycena v horní části kolony a průměr se odvíjí od požadované kapacity ionexové náplně (Káš et al., 2005). Vzorek se rozpustí v ekvilibračním pufru a nanese na kolonu, kde se zachytí. Pro vymytí vzorku z kolony se používá eluční pufr se změněným složením, např. úpravou pH (Káš et al., 2005).

Hlavním využitím této metody je separace látek, které nesou náboj, např. proteiny, peptidy, nukleové kyseliny i polysacharidy (Štulík et al., 2005).

6. Elektroforéza

Elektroforéza je klasická metoda používaná k rozdělení makromolekul (Čurn et al., 2008). Tato metoda využívá pohybu nabitých částic v elektrickém poli k jedné z elektrod (Čurn et al., 2008; Štulík et al., 2005). Skládá se ze dvou elektrod umístěných do rezervoárů elektrolytu, kterým většinou bývá tlumivý roztok (Drbal, Křížek 1999). Rezervoáry jsou spojeny médiem obsahující elektrolyty a celý systém

je uzavřen ve schránce, aby nedocházelo k odparu elektrolytického roztoku z porézního média (Drbal, Křížek 1999).

Vzorek se pohybuje na pevném podkladu, mezi které patří celulosa, filtrační papír a různé typy gelů, např. polyakrylamidový či agarosový (Káš et al., 2005). Pohyb makromolekuly závisí na relativní molekulové hmotnosti, na celkovém náboji a tvaru (Čurn et al., 2008). Například DNA je kyselina, proto se v elektrickém poli pohybuje od záporné elektrody ke kladné elektrodě (Čurn et al., 2008).

Při elektroforéze na celulosových nosičích se nanese kapka vzorku na filtrační papír, případně na acetát celulosy navlhčeného v roztoku pufru (Káš et al., 2005). Konce filtračního papíru se ponoří do oddělených elektrodových prostorů, které obsahují vhodný pufr a pustí se stejnosměrný proud. Elektroforéza trvá několik hodin, poté se výsledný elektroforeogram vysuší a vyhodnotí (Káš et al., 2005).

Nejpoužívanější elektroforéza je gelová. Používají se porézní gely, což umožňuje separaci makromolekul na principu síťového efektu a na základě elektroforetické pohyblivosti dělených látek (Káš et al., 2005). Gel vyplňuje vymezený prostor (např. místo mezi dvěma skly), čímž dochází ke zpoždění velkých molekul oproti malým molekulám. Nejčastěji využívaným gelem je gel polyakrylamidový. Tento druh gelu je průhledný, inertní, mechanicky pevný, schopný přípravy nosiče různých vlastností (Káš et al., 2005).

II. CÍLE PRÁCE

1. Získání patatinového komplexu z hlíz vybraných odrůd brambor pomocí chromatografických metod.
2. Odsolení získaných patatinových frakcí.
3. Stanovení obsahu bílkovin pomocí BCA metody
4. Elektroforetická analýza patatinových frakcí pomocí SDS-PAGE
5. Stanovení antioxidační hodnoty izolovaných patatinových frakcí

III. MATERIÁL A METODIKA

7. Charakteristika vybraných odrůd

7.1 Laura – 07S0101917

Poloraná konzumní odrůda. Hlízy jsou dlouze oválné s červenou slupkou a tmavě žlutou dužinou. Odrůda je odolná vůči hád'átku bramborovému, virovým chorobám i obecné strupovitosti. Odrůda byla registrována v roce 2001.



(Katalog odrůd brambor 2002; www.katalogbrambor.cz; www.genbank.vurv.cz)

7.2 Sibü – 07S0101760

Polopozdní až pozdní průmyslová odrůda, vhodná pro výrobu škrobu. Vyznačuje se vysokou výnosností a škrobnatostí hlíz. Hlízy jsou krátce oválné, větší s bílou dužinou a žlutou slupkou. Oproti nati rostou hlízy pomalu a jejich počet není veliký. Odrůda je odolná proti hád'átku bramborovému, virovým chorobám, plísni bramborové, obecné strupovitosti. Ale je náchylná na rakovinu bramboru, konkrétně rase 1. Odrůda byla registrována v roce 1999.



(Katalog odrůd brambor 2002; www.katalogbrambor.cz; Vokál 2000; www.genbank.vurv.cz)

7.3 Westamyl – 07S0102007

Polopozdní, až pozdní odrůda určená k výrobě škrobu. Hlízy jsou krátce oválné se žlutou slupkou a středně žlutou dužinou. Vyznačuje se velmi vysokým výnosem škrobu. Odrůda je odolná vůči háďátku bramborovému, plísni bramborové, rakovině brambora a mechanickému poškození. Odrůda byla registrována v roce 2005.



(Katalog odrůd brambor 2002; www.katalogbrambor.cz; www.genbank.vurv.cz)

8. Příprava hlízové šťávy

Pro přípravu hlízové šťávy bylo použito 10 čistých hlíz od každé odrůdy. Hlízy byly pečlivě umyty, usušeny, zváženy a následně byla z těchto hlíz pomocí domácího odšťavňovače získána hlízová šťáva. K získané hlízové šťávě byl bezprostředně přidán jako konzervant siřičitan sodný (koncentrace 10 g/l) v poměru hlízová šťáva/siřičitan sodný 100:2. Hlízová šťáva byla následně stočena (4°C, 20 min., 3600 g) a zfiltrována.

Tab. 4: Hmotnosti hlíz použitých odrůd

Odrůda	Hmotnost 10 hlíz [kg]	Průměrná hmotnost jedné hlízy [g]
Laura	0,959	95,9
Sibu	0,842	84,2
Westamyl	0,634	63,4

8.1 Odstranění škrobu z bramborové šťávy

Hlízová šťáva byla rozlita do 4 nádob a stočena na centrifuze po dobu 20 minut a 4500 g. Poté byla hlízová šťáva přefiltrována a usazený škrob vylit. Pomocí 1 M Tris-HCl se pH bramborové šťávy upravilo na hodnotu 7,4. Touto úpravou získala bramborová šťáva záporný náboj, který je důležitý při zachytávání proteinů na gavační koloně DEAE, jejíž iontoměniče mají kladný náboj.

9. Frakcionace bílkovin pomocí chromatografických technik

Hlízové bílkoviny přítomné v tzv. hlízové šťávě zvolených odrůd (Laura, Sibu, Westamyl) se separovaly a následně izolovaly pomocí trojstupňové chromatografické separace.

V prvním kroku se využila iontovýměnná chromatografie, v druhém kroku afinitní chromatografie a posledním krokem bylo odsolení získaných izolátů s využitím kolony s náplní SEPHADEX^(tm) G – 25 (princip gelové filtrace) (Bárta et al., 2013)

Iontovyměnná chromatografie probíhala na 10 ml gravitačních kolonkách s chromatografickou náplní DEAE 52 – Cellulose Servacel, afinitní chromatografie na 10 ml gravitační koloně Con A Sepharose 4 B, Amersham.

9.1 Frakcionace bílkovin hlízové šťávy pomocí iontovyměnného chromatografického média

- ekvilibrace kolony
- úprava pH vzorku
- nanesení vzorku na kolonu
- zachycení propadu (nenavázaný protein) - **FRAKCE B**
- promytí kolony k odstranění dalších nenavázaných složek
- eluce a zachycení navázaného proteinu - **FRAKCE C**
- regenerace kolony

Tab. 5: Přehled pracovních kroků na gravitační koloně DEAE 52 – Cellulose Servacel (50 ml)

Krok	Název	Popis	Čas	frakce
1.	II. Ekvilibrace kolony a kontrola pH	250 ml startovacího pufru, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4	60 - 70 minut	
2.	Nanesení vzorku s upraveným pH	50 ml vzorku s upraveným pH se nanese na kolonu pipetou (30 ml centrifugované šťávy + 1 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4 + dH ₂ O do objemu 50 ml)	15 - 20 minut	B
3.	Promývání kolony - vymytí nenavázaných složek	250 ml startovacího pufru, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4	50 - 60 minut	
4.	Isokratická eluce navázaných složek	2x50 ml elučního pufru, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M NaCl	20 - 25 minut	C
5.	Regenerace kolony	100 ml 2 M NaOH	25 minut	
6.	I. Ekvilibrace kolony	250 ml startovacího pufru, 25 mM Tris-HCl, pH 7,4	50 - 60 minut	

9.2 Frakcionace bílkovin hlízové šťávy pomocí afinitního chromatografického média

- ekvilibrace kolony
- úprava pH vzorku
- nanesení vzorku na kolonu - **FRAKCE C**
- zachycení propadu (nenavázaný protein) - **FRAKCE D**
- promytí kolony k odstranění dalších nenavázaných složek
- eluce a zachycení navázaného proteinu - **FRAKCE E (PURIFIKOVANÝ PATATIN)**
- regenerace kolony střídavou aplikací kyselého a bazického pufru

Tab. 6: Přehled pracovních kroků na gavitální koloně Con A Sepharose 4B, Amersham (50 ml)

Krok	Název	Popis	Poznámka	Frakce
1.	I. Ekvilibrace kolony a kontrola pH	25 ml startovacího pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M NaCl		
2.	II. Ekvilibrace kolony a kontrola pH	35 ml startovacího pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M NaCl		
3.	Nanesení vzorku s upraveným pH	15 ml vzorku s upraveným pH (1 M HCl na pH 7,4 se nanese na kolonu pipetou)	při nanesení vzorku zavřít kohout kolony na 10 minut a médium se vzorkem řádně, ale pomalu!!! promíchat skleněnou tyčinkou	C
4.	I. Promývání kolony - vymytí nenavázaných složek	25 ml startovacího pufru		D
5.	II. Promývání kolony - vymytí nenavázaných složek	25 ml startovacího pufru		
6.	isokratická eluce navázaných složek	3x10 ml elučního pufru (25 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,5 M NaCl)	při 1. aplikaci objemu elučního pufru je nutné zavřít kohout kolony na 10 minut a médium se vzorkem řádně, ale pomalu !!! promíchat skleněnou tyčinkou	E
7.	regenerace kolony			
7.1.	1. regenerace	20 ml bázičkého pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,5 + 0,5 M NaCl)	promíchat médium	
	1. regenerace	20 ml kyselého pufru (50 mM Na-acetát, pH 4,5 + 0,5 M NaCl)	promíchat médium	
7.2.	2. regenerace	20 ml bázičkého pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,5 + 0,5 M NaCl)	promíchat médium	
	2. regenerace	20 ml kyselého pufru (50 mM Na-acetát, pH 4,5 + 0,5 M NaCl)	promíchat médium	
7.3.	3. regenerace	20 ml bázičkého pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8,5 + 0,5 M NaCl)	promíchat médium	
	3. regenerace	20 ml kyselého pufru (50 mM Na-acetát, pH 4,5 + 0,5 M NaCl)	promíchat médium	

Tab. 7: Příprava pufrů k regeneraci kolony Con A

Látka	Kyselý pufr (ml)	Bazický pufr (ml)
1 M Na-acetát pH 4,5	25	-
1 M Tris-HCl pH 8,5	-	25
5 M NaCl	50	50
1 M MnCl ₂	0,5	0,5
1 M CaCl ₂	0,5	0,5
1 M MgCl ₂	0,5	0,5

DEAE eluční Con A startovací pufr – slouží k promytí kolonek před použitím:

25 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4

100 ml 5 M NaCl

875 ml dH₂O

DEAE eluční pufr – slouží k vymytí patatinu z kolony:

100 ml 1 M α – methyl – D – glucosid

100 ml 5 M NaCl

25 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4

775 dH₂O

9.3 Odsolování získaných patatinových frakcí

Odsolování vzorků bylo provedeno na odsolovacích kolonkách. Před použitím bylo důležité každou kolonku propláchnout 30 ml promývacího pufru, aby se odstranil uchovávací pufr. Uchovávací pufr obsahuje etanol, který sráží proteiny, což je nežádoucí jev. Proteklá směs se vylila do odpadu. Po promytí se na kolonky nanese 2,5 ml vzorku, proteklý obsah byl opět vylit. Po tomto kroku bylo důležité sběrnou nádobu řádně vypláchnout destilovanou vodou, aby následující prošlý roztok neobsahoval sůl. Dále bylo nanese 3,5 ml promývacího pufru, tato proteklá kapalina je výsledný odsolený vzorek, je důležité ho uchovat pro další práci. Na kolonky bylo ještě nanese 15 ml promývacího pufru pro konečné pročištění.

Pufr sloužící k promytí odsolovacích kolonek:

25 mM Tris-HCl, pH 7,4

975 dH₂O

10. Stanovení obsahu bílkovin pomocí BCA metody

Metoda BCA se používá ke spektrofotometrickému stanovení bílkovin. Hlavním reagentem je kyselina bicinchoninová (4,4'-dikarboxy – 2,2'-bicinchonin, BCA), která reaguje s měďnatými ionty (Bárta a kol., 2008). Jde o alkalickou redukci měďnatého iontu na měďný protein s následnou chelatací měďného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku červeného zbarvení (Peč a kol., 2008).

Vzorek byl rozpuštěn ve stanoveném obsahu vody a bylo provedeno příslušné ředění. Z každého vzorku byl odebrán obsah 0,1 ml, k němu byly přidány 2 ml pracovní reagentie a vše bylo důkladně promícháno. Takto připravená směs byla zahřáta na 37°C po dobu 30 minut. Po ochladnutí na pokojovou teplotu byl obsah převeden do kyvet a změřen proti kyvetě s destilovanou vodou při 562 nm. Z výsledných hodnot byla pomocí kalibrační křivky změřena koncentrace bílkovin.

Rozpuštění vzorku:

Laura: 10 mg + 0,5 ml dH₂O

Sibu: 57,7 mg + 0,5 ml dH₂O

Westamyl: 10 mg + 0,5 ml dH₂O

Ředění vzorků:

10x: 10 μl vzorku + 90 μl dH₂O

100x: 1 μl vzorku + 99 μl dH₂O

11. Elektroforetická analýza patatinových frakcí pomocí SDS-PAGE

Metoda je založená na separaci denaturovaných hlízových bílkovin pomocí SDS-PAGE. SDS-PAGE je polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného (Bártová et al., 2009). Detergent SDS je aniont, tudíž se váže

na proteinové molekuly a komplexy vzniklé SDS metodou, jejichž náboj je negativní. Tímto vznikne nábojově uniformní směs proteinů ve vzorkách (Bártová et al., 2009). Přítomností 2- merkaptoethanolu se zredukuje disulfidické vazby, dojde k denaturaci bílkovin. Metoda probíhá na polyakrylamidovém gelu, kde se vzniklý komplex detergent-polyeptid rozdělí podle molekulové hmotnosti (Bártová et al., 2009).

Pro metodu SDS-PAGE byla použita diskontinuální desková denaturační elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Skla byla vertikálně upevněna do stojanu a byly připraveny pufry. Nejprve byl nalit separační gel, po zatuhnutí 10 % separačního gelu byl nalit 4 % zaostřovací gel. Do připraveného gelu byly zandány vzorkovací hřebeny a gel se nechal zatuhnout. Po vyjmutí vzorkovacích hřebenů byl povrch gelu upraven *n*-butanolem (odstraní vzniklé bubliny na gelu). Do vzniklých jamek byl nanesen elektrodový pufr a pod jeho hladinu byly aplikovány barvené vzorky a hmotnostní marker. Po zaběhnutí vzorků do gelu byl gel vyjmut ze stojanu a dán do elektroforetické vany, kde byl zalit ředěným vanovým puffem (vanový pufr SDS-PAGE + dH₂O v poměru 1:9)

Separace probíhala při proudu 40 mA na gel, napětí 200 V a při teplotě 4°C po dobu 4-5 hod (1 cm od spodního okraje gelu). Po proběhlé elektroforetické separaci byla provedena detekce bílkovin barvením gelů v roztoku Coomassie Brilliant Blue přes noc (směs methanol, ledová kyselina octová, voda v poměru 5:1:4 + 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250). Po detekci bylo odbarveno nespecifické pozadí (použita směs ethanol : kyselina octová : voda v poměru 2,5:1:16,5; s výměnou během odbarvení 2 - 3 x) a provedena fixace a dehydratace ve směsi 45 % ethanolu + 3 % glycerolu po dobu 2-3 hodin. Následně byly gely sušeny v celofánu na skle při laboratorní teplotě na vzduchu po 2 - 3 dny (Bártová et al., 2009)

Barva: 100 µl bromfenolové modři + 68 µl merkaptoethanolu

Vzorek pro nanesení na gel: 40 µl vzorku + 10 µl barvy

Vanový pufr: 50 ml vanového puffu SDS-PAGE + 450 ml dH₂O

Tab. 8: Příprava gelů pro SDS-PAGE

Reagencie (μl)	Separáčnı gel (10 %)	Zaostřovací gel (3,75 %)
redestilovaná voda	42	12,15
AC/BIS	26,6	2,5
pufr A	10	-
pufr B	-	5
SDS	800	200
siřičitan sodný	60	20
persíran amonný	400	150
TEMED	40	20

- AC/BIS: 30 g akrylamid + 0,8 g BIS/ 100 ml
uchovávat ve tmě a v chladu, roztok stálý cca 3 týdny
- Pufr A: 36,3 g Tris (Trizma), 48 ml 1 M HCl, pH 8,8 / 100 ml
uchovávat ve tmě a v chladu, stálé
- Pufr B: 6 g Tris (Trizma), 48 ml 1 M HCl, pH 6,8 / 100 ml
uchovávat ve tmě a v chladu, stálé
- Na₂SO₃: nasycený vodný roztok
- (NH₄)₂S₂O₈: 15 % roztok
lze uchovávat ve tmě a v chladu 1 týden
- SDS: 10 % roztok
uchovávat ve tmě asi jeden měsíc
- Elektrodový pufr 1: 14,4 g glycin, 3 g Tris (Trizma), pH 8,3 / 1000 ml
připravovat před použitím
esterázy, nativní bílkoviny
- Elektrodový pufr 2: 144 g glycin, 30,3 g Tris (Trizma), 10 g SDS, pH 8,3 / 1000 ml
připravovat jako 10x koncentrovaný roztok, uchovávat ve tmě a v chladu
SDS-bílkoviny (pro stanovení BPK)

12. Stanovení antioxidační hodnoty izolovaných patatinových frakcí

Antioxidační aktivita je schopnost sloučeniny inhibovat oxidační degradaci různých sloučenin, například zabraňovat peroxidaci lipidů (Šulz et al., 2007). ABTS test je založen na sledování inaktivace radikálového kationtu $ABST^+$, který vzniká oxidací 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu). $ABTS^+$ má silnou absorpci v oblasti 600 – 750 nm. Proto může být antioxidační aktivita stanovena spektrofotometricky (Šulz et al., 2007).

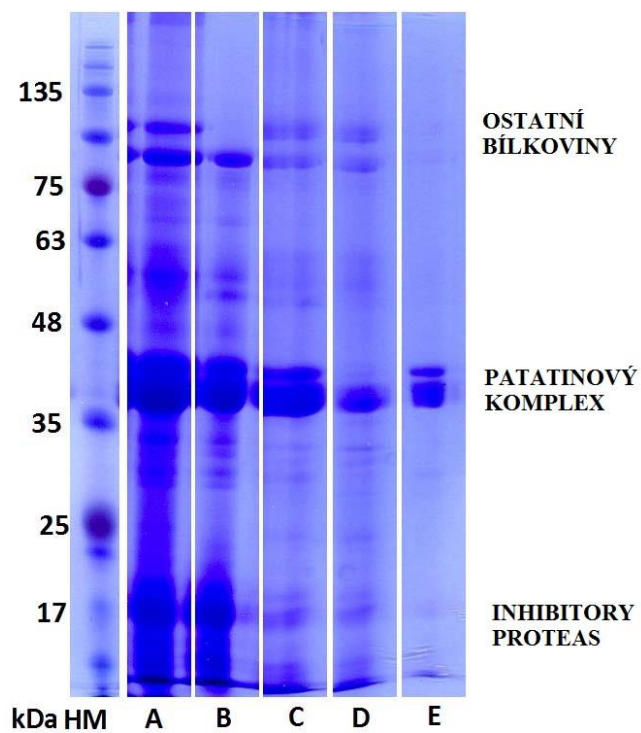
Pro měření antioxidační aktivity byla použita metoda využívající eliminaci syntetického radikálu ABTS. 54,9 mg ABTS bylo rozpuštěno ve 20 ml 0,5 mM fosfátového pufru (pH 7) a aktivován kationt radikálu ABTS přidáním 1 g MnO_2 za občasného míchání. Doba aktivace byla 30 minut. Následně byl roztok centrifugován (5 min, 7000 g), zfiltrován přes stříkačkový filtr (PTFE 0,25 μm) a naředěn fosfátovým pufrem na absorpci (t_0) $0,800 \pm 0,01$. Absorbance roztoku byla změřena spektrofotometricky (BioMate 5, ThermoElectron, UK) při vlnové délce $\lambda=734$ nm. Antioxidační aktivita byla převedena dle kalibrační křivky standardu (askorbová kyselina, $R^2=0,9880$).

IV. VÝSLEDKY A DISKUZE

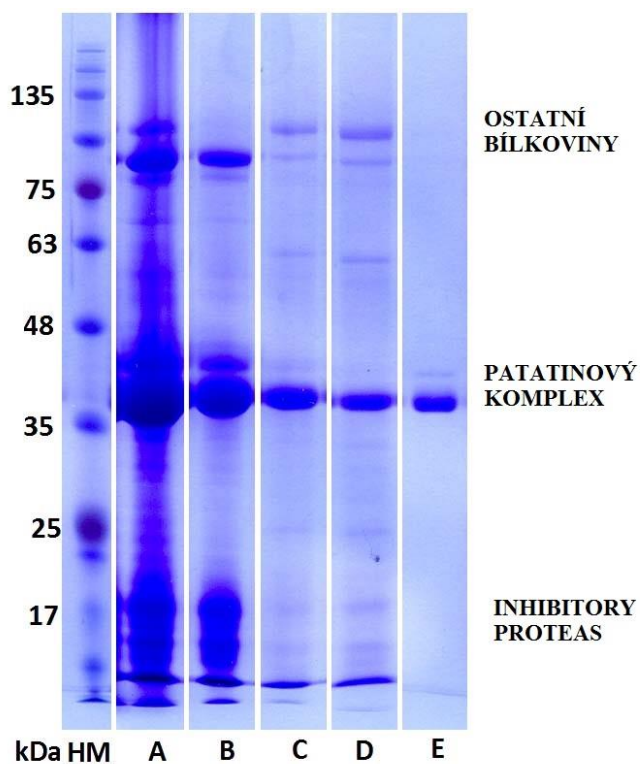
13. Purifikace patatinových bílkovin

1. Hlízová šťáva – frakce A
↓
2. Ionověměnná chromatografie – frakce B
↓
3. Zachycení nenavázaného proteinu – frakce C
↓
4. Afinitní chromatografie – frakce D
↓
5. Purifikovaný patatin – frakce E
↓
6. Odsolení – frakce E

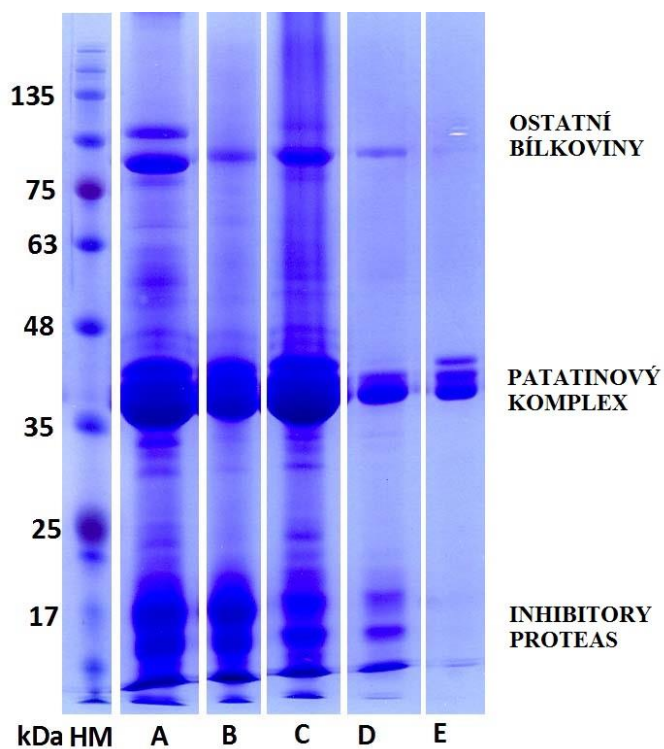
Obr. 1: SDS-PAGE analýza postupu purifikace patatinových bílkovin z hlízové šťávy odrůdy Laura (frakce A – E)



Obr. 2: SDS-PAGE analýza postupu purifikace patatinových bílkovin z hlízové šťávy odrůdy Sibü (frakce A – E)



Obr. 3: SDS_PAGE analýza postupu purifikace patatinových bílkovin z hlízové šťávy odrůdy Westamyl (frakce A – E)



Jak je patrné ze záznamu elektroforetické analýzy SDS-PAGE (viz obr. 1-3), zvolený systém izolace patatinových bílkovin byl úspěšný a u všech třech odrůd byly získány patatinové vzorky o vysoké čistotě. U odrůdy Laura byly vypurifikovány dvě isoformy, viditelné jako dva proužky u frakce E (viz. obr. 1). U odrůdy Siby byly vypurifikovány dvě isoformy, viditelné jako dva proužky u frakce E (viz. obr. 2). U odrůdy Westamyl byly vypurifikovány čtyři isoformy, viditelné jako čtyři proužky u frakce E (viz. obr. 3). Během elektroforetické analýzy je zřetelná postupná změna složení spektra hlízových bílkovin – po zachycení patinové frakce na iontovýměnném médiu DEAE došlo k odseparování převážně bazické frakce proteinů. Chromatografické médium s biologickým ligandem ConA následně umožnilo „dočištění vzorků“ od zbývajícího podílu kyselých proteinů, které se z DEAE kolony vymyly spolu s patatinovou frakcí.

Své výsledky bych chtěla porovnat s internetovým portálem Katalog odrůd brambor registrovaných v ČR (KOB), zřízený ZF JČU. Ten uvádí u metody SDS-PAGE počet patatinů u odrůdy Laura 2C, u odrůdy Siby 2C a u odrůdy Westamyl 4B. Počet isoform patatinu u metody SDS-PAGE na portálu KOB je tedy shodný s experimentální částí mé bakalářské práce.

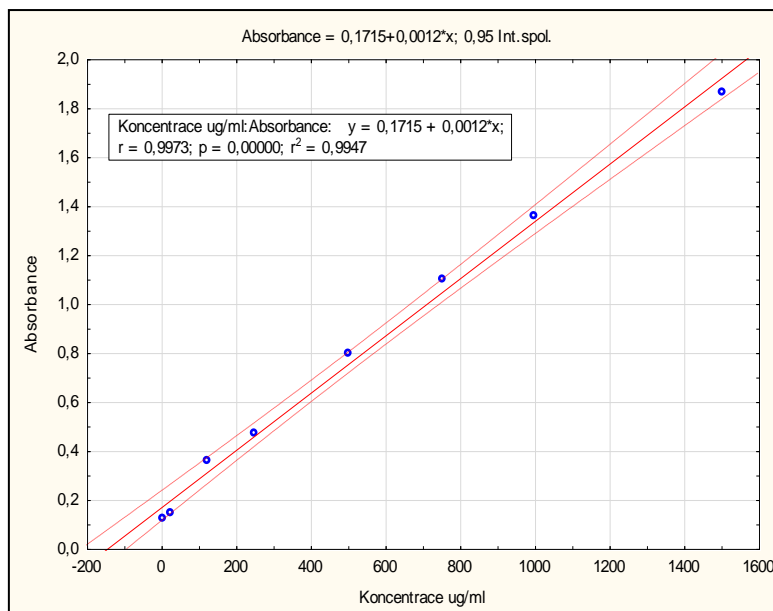
14. Stanovení obsahu čistých bílkovin

Metodou BCA byl stanoven obsah bílkovin ve vzorku brambor. Z koncentrace BSA ($\mu\text{g/ml}$) a absorbance roztoku byla sestavena kalibrační řada. Z takto vytvořené kalibrační řady byl u jednotlivých odrůd vypočten obsah proteinu ve vzorku izolovaného patatinu v mg/ml a čistota izolovaného proteinu v %.

Tab. 10: Kalibrační řada ($r^2 = 0,999$)

Koncentrace BSA μg/ml	Absorbance
0	0,12
25	0,152
125	0,357
250	0,469
500	0,795
750	1, 097
1000	1, 365
1500	1, 867

Obr. 4: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinů



Tab. 11: Naměřené hodnoty a koncentrace vzorků

Odrůda	Obsah proteinu ve vzorku izolovaného patatinu (mg/ml)	Čistota izolovaného proteinu (%)
Sibu	50,5	88,6
Laura	9,6	95,5
Westamyl	10,7	100

U odrůdy Sibu byl obsah proteinu ve vzorku izolovaného patatinu 50,5 mg/ml s 88,6% čistotou izolovaného proteinu. Odrůda Laura obsahovala 9,6 mg/ml proteinů

ve vzorku izolovaného patatinu, čistota izolovaného proteinu byla 95,5%. U odrůdy Westamyl byl stanoven obsah proteinu ve vzorku izolovaného patatinu 10,7 mg/ml s čistotou izolovaného proteinu 100%.

V práci Bárta, Bártová (2008) se uvádí průměrná relativní abundance patatinu v hlíze odrůdy Siby 25,54 %, u odrůdy Westamyl 26,76 %. V důsledku obsahu patatinu v daných odrůdách a jejich antioxidační aktivity, by se odrůdy mohly využívat v potravinářském průmyslu. Antioxidační aktivita je prospěšná pro zdravý organismus člověka, proto je možné odrůdy použít pro výrobu emulgátorů, které jsou často přidávané do potravin, případné využití je i tělová kosmetika.

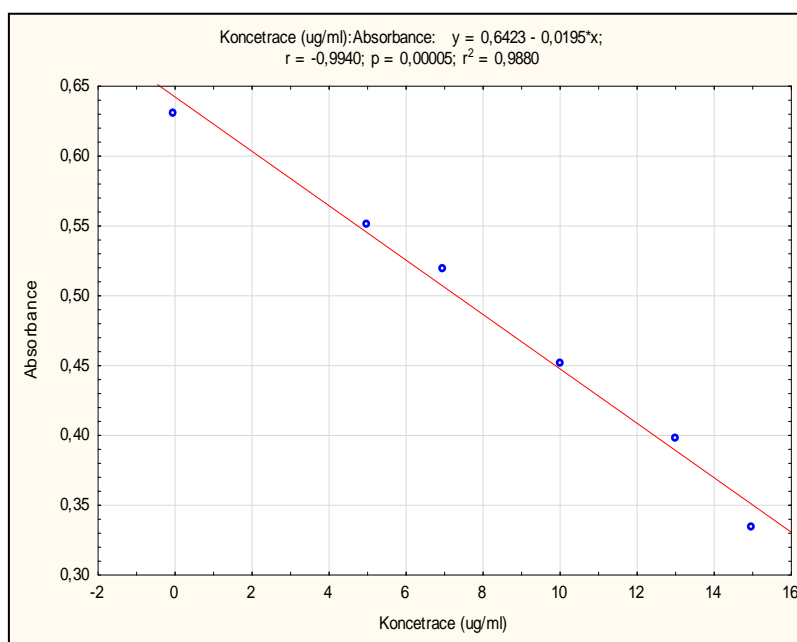
15. Stanovení antioxidační aktivity

Pomocí kalibrační řady kyseliny askorbové v závislosti na absorbanci roztoku byly vypočteny jednotlivé koncentrace vzorků, ze které byla následně vypočtena antioxidační aktivita patatinu. Ta byla vyjádřena jako ekvivalent antioxidační aktivity kyseliny askorbové (mg kys. askorbové/g sušiny proteinu).

Tab. 12: Kalibrační řada

Koncentrace askorbové kyseliny [$\mu\text{g/ml}$]	Absorbance
0	0, 63
5	0, 55
7	0, 518
10	0, 452
13	0, 397
15	0, 333

Obr. 5: Kalibrační křivka pro stanovení antioxidační aktivity patatinových bílkovin



Tab. 13: Naměřené hodnoty odrůd

Odrůda	Antioxidační aktivita patatinu (mg kys. askorbové/g sušiny proteinu)
Sibu	0,0071 ^{a*}
Laura	0,086 ^b
Westamyl	0,056 ^c

*ANOVA, TUKEY HSD test, hladina významnosti $\alpha = 0,05$; odlišná písmena značí statisticky průkazný rozdíl

Antioxidační aktivita patatinových bílkovin u odrůdy Westamyl má hodnotu 0,056 mg kyseliny askorbové na gram sušiny proteinu. Patatinové bílkoviny izolované z hlíz odrůdy Sibu vykazovala nejnižší antioxidační aktivitu. Obsah antioxidantů byl 0,056 mg kyseliny askorbové na gram sušiny proteinu. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena u patatinového izolátu odrůdy Laura. Antioxidační aktivita této odrůdy byla 0,086 mg kyseliny askorbové na gram sušiny proteinu.

Lyn, Youling (2005) ve své práci zkoumali inhibici oxidačních látek ve vepřovém mase pomocí myofibrilárního proteinu, kde potvrdili antioxidační aktivitu patatinu při zpracování výrobků z vařeného masa. Šulz et al. (2007) uvádí u brambor s vyšším obsahem barviv vyšší antioxidační aktivitu než u žlutomasých, protože barviva se podílejí na antioxidační aktivitě.

V. ZÁVĚR

Z hlízové šťávy jednotlivých odrůd se pomocí chromatografických technik získala frakce E, tedy vypurifikovaný patatin. Ten byl dále použit pro elektroforetickou analýzu SDS-PAGE, která na základě rozdílné rychlosti migrace proteinových vzorků v elektrickém poli rozdělila proteiny v hlíze bramboru. U bílkovin patatinového komplexu byly touto metodou stanoveny jednotlivé isoformy. Patatinová frakce odrůdy Laury obsahovala dvě isoformy, odrůda Siby také dvě isoformy a odrůda Westamyl isoformy čtyři. Dále byl zkoumán obsah čistých bílkovin metodou BCA. Obsah čistých bílkovin se pohyboval v rozmezí 9,6 – 50,5 mg/ml proteinů ve vzorku izolovaného patatinu. Čistota izolovaného proteinu byla v rozmezí 88,6 – 100%. Zkoumána byla také antioxidační aktivita patatinu v miligramech kyseliny askorbové na gram sušiny proteinu. Nejnižší antioxidační aktivita byla naměřena u odrůdy Siby, a to 0,0071 mg kyseliny askorbové na gram sušiny proteinu; nejvyšší u odrůdy Laura, a to 0,086 mg kyseliny askorbové na gram sušiny proteinu.

VI. POUŽITÉ ZDROJE INFORMACÍ

1. Literatura

- ANDREWS D. L., BEAMS B., SUMMERS M. D., PARK W. D. (1988). Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem J*, 252: 199-206
- BÁRTA J., ČURN V. (2004). Potato tuber proteins – classification, characterization, importance. *Chem. Listy*, 98: 373-378
- BÁRTA J. A KOL. (2013): Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor: Certifikovaná metodika. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ISBN 978-80-7394-405-6, 39 s.
- BÁRTA J., BÁRTOVÁ V. (2007): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.). 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ISBN 978-80-7394-036-2, 116 s.
- 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 J. Food Sci*, 26: 347-359
- BÁRTOVÁ V. A KOL. (2009): Využití bílkovin hlíz analyzovaných na SDS-PAGE pro charakterizaci odrůd bramboru (*Solanum tuberosum* L.): Metodika pro praxi. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ISBN 978-80-7394-158-1, 32 s.
- ČURN V. A KOL. (2008): Metodika izolace DNA a analýzy molekulárních markerů pro účely popisu genových zdrojů a identifikace odrůd brambor (*Solanum tuberosum* L.). České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ISBN 978-80-7394-135-2, 54 s.
- DAMME VAN E. J. M., BARRE A., ROUGÉ P., PEUMANS W. J. (2004). Potato lectins: an updated model of a unique chimeric plant protein. *The Plant Journal*, 37: 34-35
- DENNIS S., GALLIARD T. (1974). Wax ester formation catalyzed by isoenzymes of lipolytic acyl hydrolase. *Phytochemistry*, 13: 2469- 2473

- DRBAL K., KŘÍŽEK M. (1999). Analytická chemie. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN 80-7040-352-7, s. 186
- GANAL M. W., BONIERBALE M. W., ROEDER M. S., PARK W. D., TANKSLEY S. D. (1991). Genetic and physical mapping of the patatin genes in potato and tomato. *Mol Gen Genet*, 225: 501-509
- GRIERSON C., DU J. S. DE TORRES ZABALA M., BEGGS K., SMITH C. HOLDSWORTH M., BEVAN M. (1994). Separate cis sequence and trans factors direct metabolic and development regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J*, 5: 815-826
- HANNAPEL D., J. (1991). Distribution of potato tuber proteins during development. *American Potato Journal*, 68: 179 - 190
- JONGSMA, M. A. (1995): The resistance of insect to plant proteinase inhibitors. Centre for Plant Breeding and Reproduction. Wageningen, Wageningen university.
- JŮZL M. A KOL. (2000): Rostlinná výroba -III: (Okopaniny). 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, ISBN 80-7157-446-5, s. 108-215
- KÁŠ J., KODÍČEK M., VALENTOVÁ O. (2005): Laboratorní techniky biochemie. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 80-7080-586-2, s.258
- KIELISZEWSKI, M. J. ET AL. (1994). Potato lecitin: a modular protein sharing sequence similarities with the extensin family, the hevein lectin family, and share venom disintegrins (plateles aggregation inhibitors). *The Plant Journal*, 5 (6): 849-861
- KONINGSVELD VAN G.A., GRUPPEN H., JONGH DE H.H.J., BOEKEL VAN M.A.J.S., WALSTRA P., VORAGEN A.G.J. (2001). The solubility of potato proteins from industrial fruit juice as influenced by pH and various additives. *J Sci Food Agric*, 82: 134-142
- KUTNAR F. (1963): Malé dějiny brambor. Havlíčkův Brod, Východočeské nakladatelství, 153 s.
- LEE L., HANNAPEL D., MIGNERY G., SHUMWAY J., PARK W. (1983): Control of tuber protein synthesis in potato. In: Golberg R. B. (ed). *Plant Molecular Biology*, pp 355-365, UNCLA Symp., Alan R. Liss, New York

- LINDER K., JASHIK S., KORPACZY I. (1960). Amino acid composition and biological value of potato protein fraction. *Qual Plant Mater Veg* , 7: 289-294
- LYN L., YOULING L.X. (2005). Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *J Agric Food Chem*, 53: 9186-9192
- MACRAE A.R., VISICCHION J.E., LANOT A. (1998). Application of potato lipid acyl hydrolase for the synthesis of monoacylglycerols. *JAACS*, 75: 1489-1494
- MINX L., DIVIŠ J. A KOL. (1994): Rostlinná výroba - III: (okopaniny). Vyd. 1. Praha: Vysoká škola zemědělská. ISBN 80-213-0154-6, s. 76-140
- PEČ P. A KOL. (2008): Laboratorní cvičení z biochemie. Olomouc: Univerzita Palackého. s. 19-36
- PEYER C., BONEY P., STAUDACHER E. (2004). Purification and characterization of β -xylosidase from potatoes (*Solanum tuberosum*). *BBA-Protein Proteom* ,1672: 27-35
- PHILIPS L. G. *et al.* (1990). Development of a standardized method for measurement of foaming properties of food proteins. *J Food Sci*, 55: 1441-1444
- POTS A. M., GRUPPEN H., DIEPENBEEK VAN R., LEE VAN DER J. J., BOEKEL VAN M. A. J. S., WIJNGAARDS G., VORAGEN A. G. J. (1999). The effect of storage of whole potatoes of three cultivars on the patatin and protease inhibitor content; a study using capillary electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *J Sci Food Agric* ,79: 1557-1564
- PRUGAR J. A KOL. (2008): Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský. ISBN 978-808-6576-282, s. 241-257
- RACUSEN D., FOOTE M. (1980). A major soluble glycoprotein of potato. *J Food Biochem*, 4: 43-52
- RACUSEN D., WELLER D. L. (1984). Molecular mass of patatin, a major potato tuber protein. *J Food Biochem*, 8: 103-107

- ROSAHL S., SCHMIDT R., SCHELL J., WILLMITZER L. (1986). Isolation and characterization of a gene from *Solanum tuberosum* encoding patatin, the major storage protein of potato tubers. *Mol Gen Genet*, 203: 214-220
- RYBÁČEK ET AL. (1988). *Brambory*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. ISBN 07-134-88, 360 s.
- SEIBLES T. S. (1979). Studies of potato proteins. *Am Potato J*, 56: 415-425
- SELITRENNIKOFF C. P. (2001). Antifungal proteins. *Appl Environ Microb*, 7: 2883-2894
- SENDA K., YOSHIOKA H., DOKE N., KAWAKITA K. (1996). A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell Physiology*, 37: 347-353
- SONNEWALD U., STURM A., CHRISPEELS M. J., WILLMITZER L. (1989). Targeting and glycosylation of patatin, the major tuber protein in leaves of transgenic tobacco. *Planta*, 179: 171-180
- STUPAR R. M., BEAUBIEN K. A., WEIWEI J., JUNGI S., LEE M-K., WU CH., ZHANG H-B., JUANY J. (2006). Structural diversity and differential transcription of the patatin multicopy gene family during potato tuber development. *Genetics*, 172: 1263-1275
- SUH S. -G., PETERSON J. E., STIEKEMA W. J., HANNAPEL D. J. (1990). Purification and characterisation of the 22 - kilodalton potato tuber proteins. *Plant Physiol*, 373: 477-482
- ŠTULÍK K. ET AL. (2005). *Analytické separační metody*. Praha: Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum. ISBN 80-246-0852-9, 264 s.
- ŠULC M. ET AL. (2007). Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chem. Listy*, 101: 584 - 591
- TONÓN C., GUEVARA G., OLIVA C., DALEO G. (2001). Isolation of a potato acid 39 kDa β -1,3-glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance. *J Phytopathol*, 150: 189-195

- TWELL D., OOMS G. (1988). Structural diversity of the patatin family in potato cv. *Désirée*. *Mol Gen Genet*, 212: 325-336
- ÚBS-ČR (2002): Katalog odrůd brambor 2002. Havlíčkův Brod: Tiskárny Havlíčkův Brod a.s.
- VALUEVA T. A., REVINA T. A., MOSOLOV V. V. (1997). Potato tuber proteinproteinase inhibitors belonging to the Kunitz soybean inhibitor family. *Biochemistry-Moscow* ,62: 1367-1374
- VOKÁL B. ET AL. (2000): Brambory. Praha: Agrospoj, 245 s.
- VOKÁL B. ET AL. (2013): Brambory: šlechtění, pěstování, užití, ekonomika. 1. vyd. Praha: Profi Press s.r.o., ISBN 978-80-86726-54-0, 168 s.
- ZWIJNENBERG H. ET AL. (2002). Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. *Desalination* , 144: 331-334

2. Internet

- ČEPL J. (2008): Brambory – zdravá potravina. Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod [online, cit. 2015-04-14]. Dostupné z http://www.brambor.info/spotrebitele/zdrava_potravina.htm
- Evigez – Laura [online, cit. 2015-04-06]. Dostupné z http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/asp2/default_c.htm
- Evigez – Sibů [online, cit. 2015-04-06]. Dostupné z http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/asp2/default_c.htm
- Evigez – Westamyl [online, cit. 2015-04-06]. Dostupné z http://genbank.vurv.cz/genetic/resources/asp2/default_c.htm
- Katalogový list odrůdy - Laura. KOB - Katalog odrůd brambor: registrovaných v ČR [online]. 2009. vyd. [cit. 2014-09-02]. Dostupné z: <http://www.katalogbrambor.cz/katalog/detail/105>
- Katalogový list odrůdy - Laura. KOB - Katalog odrůd brambor: registrovaných v ČR [online]. 2009. vyd. [cit. 2014-10-06]. Dostupné z: <http://www.katalogbrambor.cz/fotogalerie/Laura-05.jpg>

- Katalogový list odrůdy - Sibů. KOB - Katalog odrůd brambor: registrovaných v ČR [online]. 2009. vyd. [cit. 2014-09-02]. Dostupné z: <http://www.katalogbrambor.cz/katalog/detail/151>
- Katalogový list odrůdy - Sibů. KOB - Katalog odrůd brambor: registrovaných v ČR [online]. 2009. vyd. [cit. 2014-10-06]. Dostupné z: <http://www.katalogbrambor.cz/fotogalerie/Sibu-05.jpg>
- Katalogový list odrůdy - Westamyl. KOB - Katalog odrůd brambor: registrovaných v ČR [online]. 2009. vyd. [cit. 2014-09-02]. Dostupné z: <http://www.katalogbrambor.cz/katalog/detail/155>
- Katalogový list odrůdy - Westamyl. KOB - Katalog odrůd brambor: registrovaných v ČR [online]. 2009. vyd. [cit. 2014-10-06]. Dostupné z: <http://www.katalogbrambor.cz/fotogalerie/Westamyl-05.jpg>