

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**Zemědělská fakulta**



**Disertační práce**

**České Budějovice 2008**

**Veronika Bártová**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Zemědělská fakulta**  
**Katedra rostlinné výroby**  
**a**  
**Biotechnologické centrum**

**Ing. Veronika Bártová**

**Studium bílkovin brambor (*Solanum tuberosum* L.) - možnosti  
jejich izolace a využití**

**Disertační práce**

Studijní obor: Speciální produkce rostlinná

Školitel: doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Jan Bárta, Ph.D.

**České Budějovice**  
**2008**

## DEDIKACE

Výsledky uvedené v disertační práci vznikly za finanční podpory MZe ČR, MŠMT ČR a GAČR v rámci řešení následujících projektů a výzkumného záměru:

**NAZV QF 4030** „Izolace bílkovin brambor z odpadu při výrobě škrobu a sledování vlivu agroekologických faktorů na jejich kvantitativní a kvalitativní variabilitu“

**MSM 6007665806** „Trvale udržitelné způsoby zemědělského hospodaření v podhorských a horských oblastech zaměřené na vytváření souladu mezi jejich produkčním a mimoprodukčním uplatněním“

**GAČR 521/03/P036** „Studium vlivu odrůdy na kvalitativní a kvantitativní variabilitu bílkovin patatinového komplexu v hlízách brambor (*Solanum tuberosum* L.)“

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli doc. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. a školiteli specialistovi Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za odborné vedení disertační práce a cenné rady, které mi byly poskytnuty v průběhu studia. Za cenné rady a konzultace děkuji také doc. Ing. Jiřímu Divišovi, CSc., vedoucímu katedry rostlinné výroby. Poděkování patří také společnosti Lyckeby Amylex a.s. za všestrannou spolupráci a opakované poskytnutí hlízové vody ze škrobárenského provozu. Mé poděkování v neposlední řadě patří také kolegům pracujícím v laboratoři Biotechnologického centra ZF za pomoc při řešení problémů a za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že má role na přípravě publikací a rukopisů publikací, jenž jsou uvedeny v kapitole „IV. Přehled získaných výsledků“, byla následující:

1. HEŘMANOVÁ V., BARTA J., ČURN V. (2006): Antifungal plant proteins – classification, characterization and potential applications. *Chemické Listy* 100:495-500.

*Shromáždění dostupné literatury pokrývající danou problematiku a příprava publikace.*

2. BARTA J., BARTOVÁ V.: Patatin, the major protein of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers, and its occurrence as genotype effect: processing versus table potatoes. Submitted for publication in *Czech Journal of Food Science*.

*Spolupráce při vedení polního pokusu, extrakce hlízových bílkovin, spolupráce při kvantifikaci SDS-extrahovatelných hlízových bílkovin, příprava SDS-PAGE profilů hlízových bílkovin, zpracování gelů, spolupráce při interpretaci výsledků, spolupráce při shromáždění dostupné literatury, spolupráce při přípravě publikace.*

3. BARTA J., HEŘMANOVÁ V., DIVIŠ J. (2008): Effect of low-molecular additives on precipitation of potato fruit juice proteins under different temperature regimes. Accepted for publication in *Journal of Food Process Engineering*, DOI: 10.1111/j.1745-4530.2007.00167.x.

*Spolupráce při izolaci bílkovin z hlízové vody s využitím nízkomolekulárních činidel, spolupráce při testování zpětné rozpustnosti získaných bílkovinných izolátů, příprava SDS-PAGE profilů nevysrážených a zpětně rozpustných hlízových bílkovin pro kontrolu izolačního postupu, příprava vzorků vysráženého a zpětně nerozpustného podílu pro analýzu obsahu N prostřednictvím automatického analyzátoru, spolupráce při interpretaci výsledků a přípravě publikace.*

4. BARTOVÁ V., BARTA J., ČURN V.: Chemical composition and biochemical properties of protein concentrates isolated from potato fruit juice by ethanol and FeCl<sub>3</sub> precipitation. Ready for submission in *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

*Spolupráce při přípravě bílkovinného izolátu pomocí srážení různými koncentracemi činidel etanolu a FeCl<sub>3</sub>, příprava SDS-PAGE profilů získaných bílkovinných koncentrátů, spolupráce při frakcionaci etanolového izolátu a purifikaci patatinových bílkovin, spolupráce při kvantifikaci obsahu bílkovin v bílkovinných koncentrátech a purifikovaných frakcích, testování antifungálních vlastností purifikovaných frakcí hlízových bílkovin, interpretace získaných výsledků a příprava publikace.*

5. BÁRTOVÁ V., BÁRTA J.: Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice. Accepted for publication in *Research in Agricultural Engineering*.

*Spolupráce při izolaci bílkovin z hlízové vody s využitím etanolového srážení, provedení testů tepelné odolnosti získaných izolátů, analýza zpětné rozpustnosti tepelně ošetřených bílkovinných izolátů, příprava SDS-PAGE profilů rozpustné frakce izolovaných bílkovin, interpretace výsledků, shromáždění dostupné literatury a příprava publikace.*

Za spoluautory pravdivost prohlášení potvrzují:

.....  
doc. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

.....  
Ing. Jan Bárta, Ph.D.

V Českých Budějovicích dne 23. dubna 2008

.....  
Ing. Veronika Bártová

## SUMMARY

Potato tuber proteins represent exceptional protein source with valuable nutritional value and functional properties. Patatin, the main storage protein of potato tuber, is very promising protein for future utilization in food or biotechnological applications. The proteins presented in tubers of processing potato get during the starch processing into by-product called potato fruit juice (PFJ). In the starch manufactures in the Czech Republic have today been applied any systems for recovering of the valuable potato proteins from potato fruit juice. Next, there is very few information about effect of cultivar and agro-ecological conditions on patatin relative abundance in SDS-extractable protein of potato tubers which is the basic information for future isolation and subsequent utilization of potato proteins produced in starch manufactures.

The aims of the PhD thesis were 1) to understand the cultivar and agro-ecological effect on accumulation of patatin proteins in tubers of processing and table potato cultivars; 2) to analyse utilization of precipitation additives for isolation of potato proteins from PFJ in two temperature regimes; 4) to analyse chemical composition and functional properties of isolated potato proteins by ethanol and FeCl<sub>3</sub> precipitation and 5) to investigate thermal stability of protein concentrates isolated by precipitation with ethanol.

The field trial was carried out on the site České Budějovice during the years 2003-2005. Evaluated were parameters of genotype variability of patatine relative abundance in SDS extractable tuber protein and patatin content in potato tuber dry matter. From the obtained results could be concluded that the effect of cultivar was higher than the effect of growing year for both evaluated patatin characteristics. Patatin relative abundance ranged from 7.16 (cv. Bionta) to 31.29 % (cv. Vaneda). Patatin content in tuber dry matter as well as patatin relative abundance were significantly ( $P < 0.001$ ) higher for processing potato cultivars. The results showed the importance of cultivar in regards to patatin content for future exploitation of potato tuber proteins in food or other applications.

The second part of the PhD thesis was focused on the finding of alternatives for isolation of potato proteins from PFJ. In some German and Dutch starch manufactures is the protein recovery achieved through heat coagulation. This method leads to protein precipitates that exhibit a poor solubility, which hampers potential food applications. The basic requirements on isolated protein concentrate were its re-solubility, preserved of functional properties and lower concentration of problematic compounds such as glycoalkaloids and potassium. For isolation of potato proteins from potato fruit juice was evaluated the effect of

two mineral and two organic acids, four organic solvents (methanol, ethanol, 2-propanol and acetone) and three inorganic metal salts in combination with temperature regimes 0°C and 22°C. For the subsequent analysis were selected precipitation additives ethanol and FeCl<sub>3</sub>, that gave the most promising results. However, ethanol usage for industrial isolation of potato proteins is strongly limited by the temperature regime in contrast to FeCl<sub>3</sub> which could be used in a much wider range of temperature regimes without significant difference in protein yield and re-solubility. On the other hand it is difficult to remove Fe<sup>3+</sup> ions from the Fe<sup>3+</sup>-protein complexes.

The subsequent studies with these two precipitators (ethanol and FeCl<sub>3</sub>) were focused on optimization of their concentration in potato fruit juice and detection of important qualitative parameters of the obtained protein isolates. The optimal concentration of ethanol in potato fruit juice was 4 M resulting in precipitation of 69 % of total protein and 93 % of the protein was re-soluble. Optimal concentration of FeCl<sub>3</sub> in potato fruit juice was 20 mM resulting in precipitation of 86 % of total protein and 85 % of this isolate was re-soluble. Including of two washing steps in precipitation process was able to lower the contents of nutritiously problematic compounds, glycoalkaloids and potassium, in concentrates obtained both, by ethanol and FeCl<sub>3</sub>. Content of total glycoalkaloids in dry matter of ethanol and FeCl<sub>3</sub> protein concentrates was in comparison with content in PFJ significantly lower ( $P < 0.05$ ). Protein isolates, both ethanol and FeCl<sub>3</sub>, exhibited high nutritious value. The value of EAAI (comparison with whole egg standard) was 81.7 % for ethanol protein concentrate and 82.7 % for FeCl<sub>3</sub> protein concentrate. Patatin represented the nutritiously improving protein component (EAAI 86.1 %). The lipid acyl hydrolase activity of patatin was not affected by ethanol precipitation. Patatin purification was possible to realized using ethanol protein isolate and the purified patatin exhibited antifungal activity against fungi species *Fusarium solani*, 1036 and *Alternaria solani*, F-107.

Next, thermal stability and re-solubility of potato tuber proteins was evaluated for the ethanol protein concentrate isolated. Patatin was evaluated as thermal sensitive - temperatures above 30 °C caused its strong insolubility. Thermal stability of potato protease inhibitors (region from 25 to 14 kDa) was higher, although the temperatures above 45 °C caused denaturation and insolubility most of the protease inhibitors.

# OBSAH

<b>I. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>II. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....</b>	<b>9</b>
<b>III. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>10</b>
<b>IV. PŘEHLED ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ.....</b>	<b>44</b>
IV.1. Antifungal plant proteins – classification, characterization and potential applications.....	45
IV.2. Patatin, the major protein of potato ( <i>Solanum tuberosum</i> L.) tubers, and its occurrence as genotype effect: processing versus table potatoes.....	52
IV.3. Effect of low-molecular additives on precipitation of potato fruit juice proteins under different temperature regimes.....	70
IV.4. Chemical composition and biochemical properties of protein concentrates isolated from potato fruit juice by ethanol and FeCl <sub>3</sub> precipitation.....	86
IV.5. Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice.....	108
<b>V. ZÁVĚR.....</b>	<b>120</b>
<b>VI. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>122</b>