

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Katedra:

Genetiky a speciální produkce rostlinné

Studijní obor:

Zemědělské biotechnologie

AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor:

Ing. František Lorenc

Školitel:

doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

2018

Autoreferát disertační práce

Doktorand: Ing. František Lorenc
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Název práce: Studium metod izolace a vlastností inhibitorů proteas v hlízách
bramboru
Školitel: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.
Oponenti: Ing. Jaroslav Čepl, CSc.
Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.
doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Ph.D.

Obhajoba disertační práce se koná dne 13. června 2018 od hodin v zasedací místnosti ZR 01 053 v Českých Budějovicích.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

Grantová podpora: GAJU 058/2013/Z
GAJU 151/2014/Z
GAJU 112/2016/Z
GAJU 116/2016/Z

PŘEHLED PUBLIKAČNÍ A GRANTOVÉ ČINNOSTI

Impaktované publikace:

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

Recenzované publikace:

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

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

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

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

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

Monografie:

Pešek M., Gabrovská D., Kimáková T. et al.: **Lorenc F.** Dietární antioxidanty v praxi. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, ISBN 978-80-7394-681-4.

Řešené projekty:

- 1) Hlavní řešitel grantu GAJU 116/2016/Z - Studium antimikrobiálního potenciálu esterifikovaných bramborových proteinů
- 2) Hlavní řešitel grantu GAJU 151/2014/Z - Detailní izolace inhibitorů serinových proteas a jejich následné charakterizace a hodnocení antimikrobiálních aktivit
- 3) Spoluřešitel grantu GAJU 058/2013/Z - Biologicky aktivní látky v potravinách a zemědělských surovinách
- 4) Spoluřešitel grantu GAJU 112/2016/Z - Významné biologicky a sensoricky aktivní látky v potravinách a zemědělských surovinách,

Souhrn výše uvedených výsledků

Články s IF	1
- suma IF	0,387
Recenzované články bez IF	5
Ostatní (metodika, monografie, užitný vzor	1
Články zaslané k opublicování do časopisů s IF	0
Hlavní řešitel grantů	2
- suma finančních prostředků	343 000,- Kč
Spoluřešitel grantů	2

SUMMARY

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

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

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

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

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

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

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

CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cíle práce:

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

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

Hypotézy:

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

MATERIÁL A METODY

Materiál:

Výchozím materiálem byly čerstvé hlízy pěti odrůd bramboru hlíznatého (*Solanum tuberosum* L.). V rámci experimentu byly vybrány dvě odrůdy určené pro přímý konzum - Adéla a Laura a tři odrůdy pro zpracování - Eurostarch, Ornella a Sibü. Pro gravimetrické zjištění obsahu sušiny provedena lyofilizace plátků uvedených odrůd, pro zjištění obsahu dusíkatých látek byla použita mouka z lyofilizovaných a homogenizovaných plátků brambor. Pro samotnou purifikaci bílkovin byla použita bramborová hlízová voda (PFJ, *Potato fruit juice*), která byla získána z bramborové šťávy po odstranění škrobu.

Metody:

Níže uvedené metody byly použity pro studium vlastností výchozího materiálu; purifikaci, separaci a identifikaci bramborových inhibitorů proteas (PIs, *Protease inhibitors*) a zjištění vlastností a aktivit získaných frakcí PIs:

- gravimetrie - stanovení obsahu sušiny na základě rozdílů hmotnosti čerstvých a lyofilizovaných plátků hlíz brambor
- stanovení obsahu dusíku a dusíkatých látek (N x 6,25) pomocí modifikované Dumasovy metody v sušině bramborové mouky pomocí analyzátoru dusíku Rapid N Cube (Elementar, Německo)
- stanovení obsahu celkových polyfenolů (TPP, *Total polyphenols*) v extraktu bramborové mouky pomocí modifikované metody dle Lachmana et al. (2006) využívající Folin-Cicalteauva činidla, jako standard byla použita kyselina gallová
- iontově výměnná chromatografie - purifikace bazických PIs a oddělení od společné frakce kyselých PIs s patatinem za využití gravitačních kolon s mediem Iontosorb DEAE 200 (Iontosorb, ČR); separace bazických PIs na FPLC pomocí kolony s měničem kationtů UNO S6 (Bio-Rad, USA) a separace kyselých PIs na FPLC pomocí kolony s měničem aniontů UNO Q6 (Bio-Rad, USA) optimalizovaná podle metodiky dle Bárty et al. (2013)
- afinitní chromatografie - purifikace kyselých PIs a patatinu pomocí gravitačních kolon s mediem Con A Sepharose 4B (GE Healthcare, USA); separace inhibitorů proteas po

předchozí separaci na iontově výměnných kolonách za pomoci afinitní kolony CHT5-I (Bio-Rad, USA) optimalizovaná podle metodiky dle Bárty et al. (2013)

- gelová permeační a chromatografie hydrofobních interakcí - separace nedělených frakcí PIs po separaci na koloně CHT5-I pomocí kolony gelové permeační chromatografie ENrich SEC 650 (Bio-Rad, USA); separace majoritní frakce odrůdy Siby po separaci na koloně UNO S6 a směsného vzorku proteinového izolátu obsahující PIs pomocí kolon Butyl HP a Phenyl FF (GE, Healthcare)
- SDS-PAGE - elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného byla použita pro identifikaci a separaci proteinových frakcí po chromatografických purifikacích a separacích provedená metodikou dle Čurna (1995)
- stanovení koncentrace proteinů pomocí metody BCA za využití Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, USA) podle modifikované metodiky dle Smith et al. (2005), pro sestavení kalibrační křivky byl použit jako standard albumin
- hmotnostní spektrometrie byla provedena pomocí systému nízkoprůtokové chromatografie RSLCano ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, USA), byly identifikovány a kvantifikovány proteinová spektra v rámci hlízových vod odrůd Adéla a Eurostarch a dílčích frakcí získaných separacemi na iontově výměnných kolonách UNO Q/S
- antimikrobiální aktivity byly zjišťovány pomocí metodiky Hyunth et al. (1996) prostřednictvím biotestů proti houbovým patogenům *Fusarium solani* a *Rhizoctonia solani* u frakcí získaných po dvoustupňové purifikaci a dílčích frakcí po separaci na iontově výměnných kolonách UNO Q/S
- antioxidační aktivity byly stanoveny formou zhášení kyslíkových radikálů ABTS a DPPH (měřeno jako úbytek absorbance) na základě modifikovaných metodik dle Šulce et al. (2007) u frakcí získaných po dvoustupňové purifikaci a dílčích frakcí po separaci na iontově výměnných kolonách UNO Q/S

VÝSLEDKY

Obsah sušiny a dusíkatých látek

U odrůd určených pro přímý konzum (Adéla, Laura) byl obsah sušiny statisticky průkazně menší (v průměru 17,1 %), než u odrůd pro zpracování - Eurostarch, Sibů a Ornella (polopozdní až pozdní), kde činil obsah sušiny v průměru 22,5, čili zhruba o třetinu vyšší.

Tab. 1: Obsah sušiny hlíz vybraných odrůd a obsah dusíku a dusíkatých látek v sušině hlíz

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

Na základě uvedených výsledků jsou patrné výrazné rozdíly v obsahu sušiny mezi odrůdami určenými pro přímý konzum a odrůdami určené pro zpracování na škrob, kdy obsah sušiny u odrůd pro zpracování byl pomocí statistického hodnocení průkazně vyšší.

Obsah dusíkatých látek byl oproti ostatním odrůdám významně vyšší u odrůdy Adéla, v průměru byl látek statisticky prokazatelně vyšší u konzumních odrůd. Pomocí statistického hodnocení byla zjištěna negativní korelace mezi obsahem sušiny a dusíkatých látek čili nepřímá úměrnost mezi těmito parametry při hladině významnosti.

Obsah polyfenolů a antioxidační aktivity vybraných odrůd

Zjištěný celkový obsah polyfenolů (*Total polyphenols*, TPP) u jednotlivých odrůd vykazoval bezmála dvakrát vyšší hodnoty TPP konzumních odrůd (v průměru 2,47 g TPP na kg sušiny hlíz) v porovnání s odrůdami pro zpracování (průměrně 1,38 g TPP na kg sušiny hlíz). Obsah polyfenolů u konzumních odrůd byl statisticky významně vyšší u odrůd pro přímý konzum než u odrůd pro zpracování.

Antioxidační aktivita byla prokázána u všech odrůd zhášením kyslíkových radikálů ABTS a DPPH. U hlíz konzumních brambor byla v průměru vyšší než u hlíz pro zpracování.

Stejně jako v případě obsahu polyfenolů, byl tedy zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v antioxidačních aktivitách v případě obou použitých metod mezi odrůdami konzumních brambor a odrůdami pro zpracování. Statistické hodnocení potvrdilo přímou závislost mezi celkovým obsahem polyfenolů a antioxidační aktivitou.

Tab. 2: Obsah polyfenolů a antioxidačních aktivit hlíz vybraných odrůd brambor

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

Hodnocení obsahu bílkovin

Koncentrace a obsah bílkovin v hlízové vodě

U odrůd pro přímý konzum byl výtěžek bílkovin nižší oproti odrůdám pro zpracování (Tab. 3). Celkovým výtěžkům bílkovin v souvislosti s typem odrůdy odpovídá obsah bílkovin v původní PFJ, kromě odrůdy *Laura*, kdy obsah bílkovin v hlízové vodě (PFJ, *Potato fruit juice*) této odrůdy předčil obsah bílkovin v PFJ odrůdy *Eurostarch* rozdílem 0,2 g/l. Průměrný obsah bílkovin byl přesto u odrůd pro zpracování vyšší, než u odrůd pro přímý konzum.

Tab. 3: Obsah a výtěžek bílkovin z PFJ vybraných odrůd

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

V souvislosti s obsahem bílkovin v PFJ byla také zjišťována jejich korelace s obsahem dusíkatých látek, přičemž byla zjištěna nepřímá úměra mezi obsahem dusíkatých látek a obsahem čistých bílkovin v jednotlivých odrůdách.

Ověření výsledků purifikace a obsahu bílkovin v dílčích frakcích

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

Chromatografie na systému FPLC

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

Při využití kolony s kationtovým měničem UNO S6 došlo k rozdělení bazických inhibitorů proteas (frakce „B“) do tří až čtyř samostatných frakcí zastoupení podjednotky (16,4 kDa) bramborového inhibitoru serinových proteas 2. Pomocí kolony s aniontovým měničem UNO Q6 (Obr. 3) došlo k rozdělení převážně kyselých inhibitorů proteas do 3-4 frakcí. Dvě frakce se u obou odrůd po kontrole pomocí SDS-PAGE projeví jako výrazně majoritní. Tyto proteinové frakce mají velikost ~10 kDa a 16-17 kDa.

Při využití kolony CHT5-I došlo pouze k rozdělení zachycené a nezachycené frakce frakce. Zachycená frakce byla vizualizována pouze v podobě jednoho výrazného píku představující komplex většiny bramborových inhibitorů proteas.

Kolona ENRich SEC 650 byla použita pro separaci PIs v režimu analytické chromatografie. Díky rozdílu molekulových hmotností jednotlivých skupin inhibitorů proteas se podařilo rozdělit zachycenou komplexní frakci z předchozí separace na koloně CHT5-I, přičemž došlo k rozdělení PIs do 2 chromatografických píků u odrůdy Adéla a 3 píků u odrůdy Eurostarch.

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

Hmotnostní spektrometrie

Obsah proteinů v bramborové hlízové vodě

V PFJ odrůd Adéla a Eurostarch byl zastoupen celý komplex bramborových hlízových. Mezi dvě majoritní skupiny proteinů u všech variant podle míry zastoupení patří proteiny patatinového komplexu a inhibitory aspartátových proteas. U vzorků PFJ nedošlo k výraznější změně v relativním zastoupení tří majoritních skupin proteinů, kromě vzorku „Adéla 2014“, kdy byla na místo patatinu majoritní skupina inhibitorů aspartátových proteas. Třetí místo zaujímají proteiny, jež nebylo možno identifikovat. Mezi další přítomné inhibitory proteas patří skupina bramborový inhibitor proteas 2 a ostatní inhibitory serinových proteas (zejména typy 3, 5, 6, 7, 8), inhibitory cysteinových proteas a bramborový inhibitor proteas 1 jsou zastoupeny v malém množství, karboxypeptidasový inhibitor byl v uvedených vzorcích zastoupen pouze ve stopovém množství. Ostatní proteiny nepřesáhly více než 10 % obsahu.

Obsah proteinů v jednotlivých frakcích

Po separaci na koloně UNO S6 bylo identifikováno více skupin bazických bramborových PIs. Mezi jednotlivými frakcemi byly rozdíly v poměru zastoupení skupin PIs, přesto byl však nejčastěji majoritní obsah inhibitorů aspartátových proteas. Frakci, jež nebyla zachycena a separována pomocí uvedené kolony byla u odrůdy Adéla tvořena inhibitory aspartátových proteas a proteiny patatinového komplexu u odrůdy Eurostarch. Majoritní část frakcí tvořily také neidentifikované a necharakterizované proteiny o velikostech 24 a 25 kDa, v menší míře 14 kDa. Mezi další obsažené PIs tvořil největší obsah skupina PCPI, PI-2 a ostatní inhibitory serinových proteas, minoritní, přibližně 5 %, bylo zastoupení PI-1. Nezachycenou frakci u odrůdy Eurostarch tvořily především patatiny (36,7 %) a lipoxygenasa společně s proteiny jež pravděpodobně představují lipoxygenasu (32 %), u odrůdy Adéla tvořily nezachycenou frakci především PAPI (56,8 %). V nezachycené frakci odrůdy Adéla

byl rovněž zaznamenán poměrně vysoký obsah ostatních proteinů tvořený například lyasou, peroxidasami nebo superoxid dismutasou.

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

Antimikrobiální aktivity proteinových frakcí

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

Antioxidační aktivity proteinových frakcí

Mírou zhášení kyslíkových radikálů ABTS a DPPH byly získány výsledky antioxidačního působení jednotlivých frakcí PIs (Tab). Na základě získaných výsledků lze potvrdit antioxidační aktivity získaných frakcí bramborových inhibitorů proteas, zejména u metody využívající radikál ABTS. Byly rovněž srovnány rozdíly mezi antioxidačními aktivitami analyzovaných frakcí. Zatímco u metody využívající radikál DPPH nebyl zaznamenán průkazný rozdíl ve zhášecích aktivitách mezi jednotlivými frakcemi na hladině významnosti, u metody využívající ABTS byl prokázán statisticky významný rozdíl. Mezi

jednotlivými frakcemi se v případě vyšší koncentrace projevily rozdíly v hodnotách antioxidačních aktivit. Nejvyšší antioxidační aktivita byla zjištěna u frakcí „B“ obou odrůd při koncentraci 60 mg/ml. Lze tedy potvrdit nárůst antioxidační aktivity se zvyšující se koncentrací proteinů v případě metody využívající radikál ABTS.

ZÁVĚR

Tato disertační práce pojednává o jedné ze dvou majoritních skupin hlízových proteinů, inhibitech proteas. V rámci literární části této práce byly uvedeny obecné informace a vlastnosti bramborových inhibitorů proteas. Byl popsán současný stav poměrně intenzivního výzkumu této skupiny proteinů a vzhledem k jejich specifickým vlastnostem a aktivitám také možnosti jejich potenciální využití v budoucnosti. Z širšího hlediska pojednává literární přehled, obecně, o hlízových bílkovinách ve formě izolátů a možnostech jejich výroby a uplatnění ve výživě lidí a krmivářství, případně dalších aplikacích. Experimentální část této práce je zaměřena především na studium možností izolace a separace bramborových inhibitorů proteas za využití různých přístupů chromatografické separace, zjišťovány byly rovněž vlastnosti výchozího materiálu a aktivity získaných frakcí PIs.

Na základě navržených cílů a hypotéz této práce byl u výchozího materiálu zjišťován obsah sušiny, dusíkatých látek, bílkovin a celkových polyfenolů a případný rozdíl v těchto parametrech mezi jednotlivými odrůdami. Následně byla provedena chromatografická purifikace bramborových PIs a jejich rozdělení na systému FPLC pomocí kolon využívajících různých principů chromatografické separace. Posledním cílem bylo studium antimikrobiálních a antioxidačních aktivit získaných frakcí PIs.

Na základě výsledků této práce byly utvořeny následující závěry:

Vlastností výchozího materiálu

Bylo prokázáno rozdílné průměrné zastoupení sušiny mezi konzumními odrůdami (17,1 %) a odrůdami pro zpracování (22,5 %). Obsah dusíkatých látek byl v průměru naopak vyšší u odrůd konzumních brambor (10,5 %) oproti odrůdám pro zpracování (7,2 %), a byl nepřímo úměrný obsahu sušiny. Obsah čistých proteinů v PFJ byl však naopak průměrně vyšší u odrůd pro zpracování (14,5) oproti odrůdám pro přímý konzum (12,1) a negativně tedy koreluje s obsahem dusíkatých látek. Výsledky těchto vlastností a vzájemné vztahy mezi nimi zjištěné v rámci této práce byly dříve prokázány v jiných výzkumech. Nejvíce zastoupenými proteiny v PFJ odrůda Adéla a Eurostarch byly patatiny a inhibitory aspartátových proteas. Významný podíl tvořily také necharakterizované proteiny patřící pravděpodobně mezi inhibitory aspartátových nebo serinových proteas.

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

Hodnocení chromatografické separace a identifikace proteinů

Pomocí dvoustupňové chromatografické purifikace došlo k předpokládanému rozdělení hlízových proteinů z PFJ do čtyř skupin - frakcí bazických inhibitorů proteas, společnou skupinu patatinu a kyselých inhibitorů proteas, kyselých PIs, a patatinu. Úspěšnost purifikace byla potvrzena pomocí SDS-PAGE.

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

Studium vybraných vlastností bramborových PIs

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

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

8. SEZNAM LITERATURY

- Bárta J., Bártová V., Zdráhal Z., Brabcová A., Kamenová A., Diviš J. (2013): Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor – CERTIFIKOVANÁ METODIKA. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, ISBN 978-80-7394-405-6
- Čurn V. (1995): Studium uplatnění metod elektroforézy bílkovin ve šlechtění řepky olejné. Disertační práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
- Huynh Q. K., Borgmeyer J. R., Smith C. E., Bell L. D., Shah D. M (1996): Isolation and characterization of a 30 kDa protein with antifungal activity from leaves of *Engelmannia pinnatifida*. *Biochemical Journal*, 316: 723-727.
- Lachman J., Hamouz K., Dvořák P., Orsák M. (2005): The effect of selected factors on the content of protein and nitrates in potato tubers, *Plant, Soil and Environment*, 51: 431-438.
- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A.K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85.
- Šulc M., Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Dvořák P., Horáčková V. (2007): Výběr a zhodnocení vhodných metod pro stanovení antioxidační aktivity fialových a červených odrůd brambor. *Chemické listy*, 101: 584-591.

Ostatní zdroje:

GE Healthcare, USA
<https://www.gelifesciences.com>

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