

VYUŽITÍ MONOLITICKÝCH KOLON PŘI VYSOKORYCHLOSTNÍ CHROMATOGRAFICKÉ SEPARACI BRAMBOROVÝCH INHIBITORŮ PROTEAS

FRANTIŠEK LORENC a JAN BÁRTA

*Katedra speciální produkce rostlinné, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice
lorenc.frantisek@gmail.com*

Došlo 21.11.16, přijato 18.4.17.

Klíčová slova: vysokorychlostní kapalinová chromatografie, monolitické kolony, brambory, inhibitory proteas

Úvod

Systém vysokorychlostní proteinové kapalinové chromatografie (FPLC, fast protein liquid chromatography) je v oblastech analytické chemie a biochemie využíván již poměrně dlouho. Tento střednětlaký chromatografický systém, využívaný nejčastěji při práci s biopolymery, byl poprvé použit v roce 1982 ve Švédsku jako upravený systém HPLC¹. FPLC se odlišuje zejména využitím nižších tlaků, maximálně do hodnoty 5 MPa, a tím pádem je šetrnější při separaci peptidových a proteinových frakcí než systém HPLC².

Při práci se systémem FPLC jsou nejčastěji využívány kolony s ligandy fungujícími na principu gelové permeační chromatografie, afinitní chromatografie, výměně iontů a hydrofobních interakcí. Z hlediska složení stacionární fáze s těmito typy ligandů rozlišujeme kolony náplňové a monolitické. Zatímco stacionární fáze klasických náplňových kolon se skládá z jednotlivých částic média o definované velikosti, kolony s monolitickým ložem jsou vyplněny celistvým kusem pórovitého sorbentu. Monolitické kolony neobsahují mezičásticové prostory, proto musí mobilní fáze nutně protékat póry monolitu. U kolon tohoto typu se nejčastěji vyskytují dva typy pórů. Velké póry (makropory) umožňují rychlý průtok mobilní fáze, přičemž střední póry (mesopory) poskytují dostatečně velký povrch pro vysokou adsorpční kapacitu. Konvektivní průtok póry u monolitických kolon umožňuje při separaci, v porovnání s kolonami standardního typu, u nichž dochází k difuzi, využít vyšší průtokovou rychlost mobilní fáze bez nežádoucího zvyšování tlaku. Dochází tak k účinnější separaci velkých molekul, například proteinů, nukleových kyselin nebo syntetických polymerů^{3–5}.

Inhibitory proteas (PIs, protease inhibitors) představují velmi širokou a heterogenní skupinu proteinů. Liší se

svojí strukturou, molekulovou hmotností, počty podjednotek, isoelektrickými body a mechanismy působení. Jednou z jejich hlavních funkcí, jak již název napovídá, je inhibice endogenních proteas. Inhibují významné proteolytické enzymy, zejména trypsin a chymotrypsin, ale také méně typické proteasy, například papain nebo cathepsin. Inhibitory proteas jsou důležitou součástí přirozené obranné schopnosti rostlin. Uplatňují se v obraně proti mikrobiálním patogenům a hmyzím škůdcům⁶. PIs obsažené v bramborových hlízách mohou dosahovat hodnoty až 50 % celkového obsahu hlízových proteinů, přičemž jako majoritní byl identifikován bramborový inhibitor II a inhibitor Kunitzova typu⁷. V bramborových hlízách, kromě funkcí obranných, plní inhibitory proteas spolu s druhou majoritní skupinou, proteiny patatinového komplexu, také funkci zásobních proteinů⁸. Díky vícestrannému působení lze označit inhibitory proteas jako multifunkční proteiny. Byla potvrzena antimikrobiální aktivita bramborových inhibitorů proteas proti hospodářsky významným fytopatogenním houbám (*Candida albicans*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*) a bakterii *Clavibacter michiganensis*^{9,10}. U rostlinných inhibitorů proteas bylo rovněž prokázáno antikarcinogenní¹¹ a antivirální¹² působení. Všechny tyto vlastnosti umožňují potenciální využití této skupiny proteinů v medicíně, rostlinolékařství, případně potravinářství.

Pomocí modifikovaného dvoustupňového chromatografického přečištění dle metodiky autorů Racusen a Foote¹³ lze použitím dvou samostatných chromatografických separací oddělit čtyři základní frakce majoritních proteinů brambor. Díky iontové výměnnému, např. celulosovému mediu, lze rozdělit bazické frakce PIs od společného komplexu kyselých PIs a patatinu. Ve druhém kroku lze, za využití nosiče s afinitním ligandem typu Konkavalin A, oddělit kyselé frakce PIs od patatinového komplexu¹⁴. Jednotlivé inhibitory proteas či jejich skupiny lze následně separovat pomocí dalších chromatografických metod, k čemuž je vhodné využití zejména systému vysokorychlostní kapalinové chromatografie (FPLC, fast protein liquid chromatography), přičemž dosud byly standardně využívány zejména náplňové kolony s gelovou maticí.

Cílem tohoto příspěvku je zhodnocení možností separace bramborových inhibitorů proteas s využitím kolon s monolitickou náplní umožňující výměnu iontů – UNO S a Q (Bio-Rad, USA). Kolony UNO obsahují náplně ve formě komprimovaných gelů, konkrétně se jedná o kopolymery methakrylamidových monomerů⁵. Nejprve se provede předseparace hlízových proteinů pomocí gravitačních kolon a následně separace dílčích frakcí inhibitorů proteas na systému FPLC.

Experimentální část

Materiál a chemikálie

Výchozím materiálem pro izolaci proteinů byla hlízová šťáva (PFJ, potato fruit juice) ze dvou rozšířených od-

růd bramboru. Odrůda Adéla, která je určena pro přímý konzum a odrůda Eurostarch využívaná pro průmyslové zpracování, zejména pro výrobu škrobu.

Pro přípravu konzervantu zabraňujícímu oxidativnímu hnědnutí byl použit siřičitan sodný a disiřičitan sodný (Lachner, Česká republika). Pro přípravu chromatografických pufrů a titrací byl použit tris(hydroxymethyl)aminomethan, α -methyl-D-glukosid, MES (Sigma, USA), kyselina chlorovodíková, ethanol, chlorid vápenatý, hydroxid sodný, chlorid manganatý, chlorid hořečnatý, kyselina octová (vše Penta, ČR), hydrogenfosforečnan disodný (Na_2HPO_4), dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4), (oboje Lachner, ČR), dále pak chlorid sodný a octan sodný (Serva, Německo). Pro chromatografické přečištění inhibitorů proteas bylo použito medium Iontosorb DEAE (Iontosorb, Česká republika) a agarosové medium Con A Sepharose 4B (GE Healthcare, UK).

Pro metodu SDS-PAGE byly použity tyto chemikálie: ultra čistá voda, persíran amonný, tris(hydroxymethyl)aminomethan, thioethylen glykol (Sigma, USA), prop-2-enamid 37,5:1 (30 % w/v) (Biotech, ČR), glycin, dodecylsírán sodný (SDS), Coomassie Brilliant Blue (Serva, Německo), glycerol, ethanol, metanol, octová kyselina (vše Penta, ČR).

Použitá instrumentace

Pro chromatografické přečištění na mediích DEAE a Con A Sepharose byly použity gravitační plastové kolony Econo-Pac Chromatography Columns (Bio-Rad, USA). Pro separaci frakcí inhibitorů proteas byl využit systém vysokorychlostní kapalinové chromatografie BioLogic DuoFlow Pathfinder 20 (Bio-Rad, USA). Systém se skládá z pracovní stanice, „maximizéru“, UV/VIS detektoru s deuteriovou lampou umožňujícího měření absorbance při čtyřech vlnových délkách, pH detektoru, kolektoru frakcí a počítače s programem BioLogic DuoFlow. Pro odsolení byla použita smyčka o objemu 5 ml, při separaci proteinových frakcí smyčka o objemu 1 ml.

K odsolení vzorků po předchozích přečištěních byla použita odsolovací kolonka Bio-Scale Mini Bio-Gel P6 desalting cartridge (Bio-Rad, USA). Pro separaci inhibitorů proteas byly použity monolitické kolony s iontově výměnnými ligandy UNO S6 a UNO Q6 (Bio-Rad, USA).

Příprava mobilních fází

Jako mobilní fáze pro FPLC byly v jednotlivých chromatografických procesech použity tyto systémy pufrů: Tris-HCl, MES a Na-acetátový. Pro přípravu startovacích pufrů byla použita směs 2,5 % (v/v) 1 mol dm^{-3} Tris-HCl (pH 7,4) a MES (pH 6,0) pufru a 97,5 % (v/v) ultra čisté vody. Pro eluční pufr byla použita směs 2,5 % (v/v) 1 mol dm^{-3} Tris-HCl (pH 7,4) nebo MES (pH 6,0) pufrů, 10 % (v/v) 5 mol dm^{-3} NaCl a 87,5 % (v/v) ultra čisté vody. Pro odsolení vzorků byla jako mobilní fáze použita ultra čistá voda. Všechny pufrы použité při FPLC byly

filtrovány pomocí membránových filtrů 0,22 μm (Millipore, USA) a vodovodní vývěvy. Následně byly pufrы odplyněny pomocí vodovodní vývěvy.

Příprava vzorku

PFJ byla získána pomocí kuchyňského odšťavňovače. Následně byla centrifugována ($2 \times$ při 4166 g, 30 min, 4 °C), filtrována přes filtrační papír a upravena pomocí 1 mol dm^{-3} Tris-HCl na hodnotu pH 7,4.

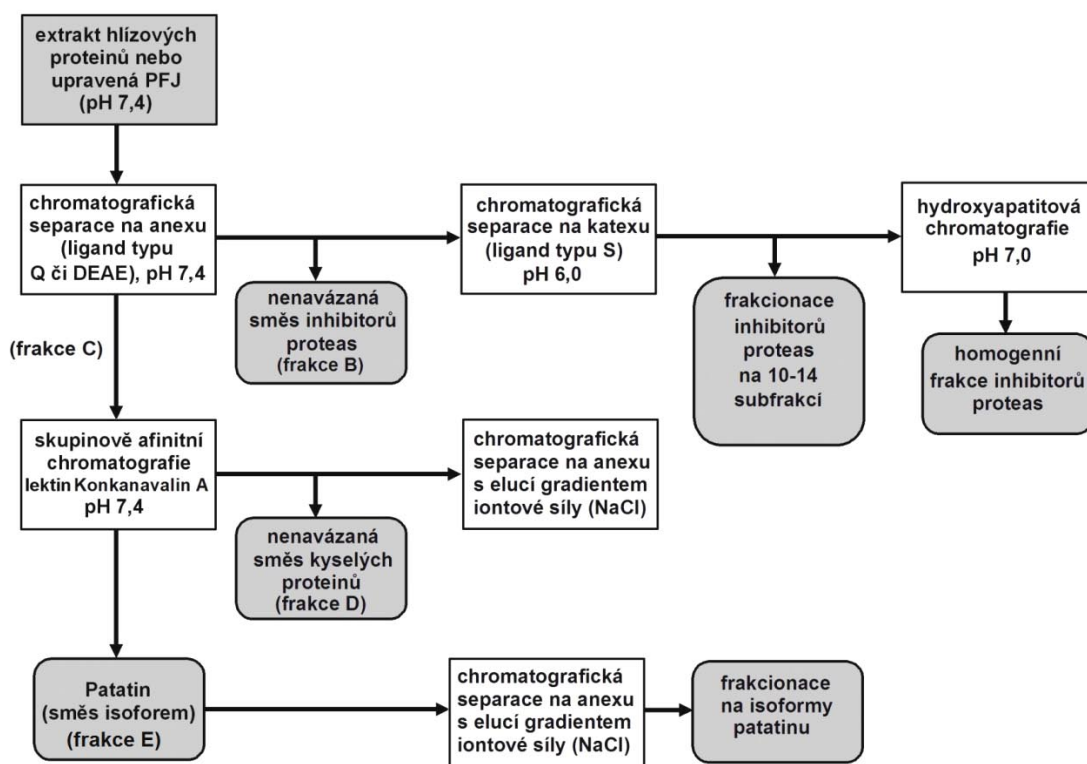
Chromatografická přečištění a separace

Dvoustupňové chromatografické přečištění bylo použito jako předseparační krok před vlastní separací PIs na systému FPLC. Přečištění bylo provedeno dle modifikované metodiky autorů Racusena a Foota¹³ (viz obr. 1). 40 ml upravené PFJ (pH 7,4 pomocí 2 mol dm^{-3} NaOH) bylo naneseno na chromatografickou kolonu obsahující 100 ml media DEAE Iontosorb 100-250 (Iontosorb, ČR).

Byly získány frakce „B“ (propad pod kolonou s náplní DEAE Iontosorb) obsahující frakce bazických inhibitorů proteas a frakce „C“ (zachycená frakce) zahrnující směs kyselých inhibitorů proteas a proteinů patatinového komplexu. Frakce „C“ byla z kolony eluována a v dalším kroku nanesena na gravitační kolonky s mediem Con A Sepharose 4B (GE Healthcare, UK) pro odstranění patatinu. V této fázi byly zároveň získány frakce „D“ (propad) představující kyselý inhibitor proteas a frakce „E“ (zachycená frakce) obsahující proteiny patatinového komplexu – eluát z kolony s náplní Con A Sepharose. Frakce „B“ a „D“ získané přečištěním byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (cit.¹⁵) a zakonzentrovány pro následnou chromatografickou separaci na systému vysokorychlostní kapalinové chromatografie (FPLC).

Před samotnou chromatografickou separací byl objem získaných proteinových frakcí zakonzentrován lyofilizací, rozpuštěn ve vodě a odsolen pomocí odsolovací kolonky fungující na principu gelové permeační chromatografie Bio-Scale Mini Bio-Gel P6 desalting cartridges. Odsolené frakce byly opět zakonzentrovány lyofilizací a rozpuštěny ve směsi vody a startovacího pufru v poměru 1:1 (v/v) na koncentraci 10 mg proteinu/1 ml roztoku. Poté byla provedena chromatografická separace pomocí FPLC na koloně s kationtovým měničem UNO S6 (Bio-Rad, USA) pro rozdělení frakcí bazických inhibitorů proteas a na koloně s aniontovým měničem UNO Q6 k separaci jednotlivých frakcí kyselých inhibitorů proteas. Náplň těchto typů kolon tvoří bližší nespecifikovaný polymerní materiál, který je předmětem patentové ochrany. Frakce byly sbírány v čase pomocí kolektoru frakcí do skleněných vialek a následně přeneseny do 20 ml scientilačních dóz a zamrazeny. Také bylo odebráno množství potřebné pro analýzu SDS-PAGE.

Frakce získané separací na FPLC byly analyzovány elektroforézou na 15% polyakrylamidovém gelu.



Obr. 1. Schéma chromatografické předseparace frakcí hlízových proteinů pomocí medií Iontosorb DEAE (frakce „B“ a „C“) a Con A Sepharose 4B (frakce „D“ a „E“)

SDS-PAGE

Pro analýzu SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS)) byl použit systém vertikální elektroforézy Hoefer SE 600 (Hoefer, USA). Pro analýzu purifikovaných frakcí byl použit 10% separační gel, pro analýzu frakcí získaných pomocí separace na FPLC byl použit 15% separační gel. Zaostřovací gel byl v obou případech 3,75%. Vzorky byly nanášeny na gel v množství 40 μl , přičemž vznikly směsním 80 μl původního vzorku a 20 μl vkladacího pufru 0,0625 mol dm^{-3} Tris-HCl, pH 6,8; 25 % (v/v) glycerol; 2 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) bromfenolová modř. Těsně před použitím se k 19 objemovým dílům tohoto pufru přidal 1 díl thioethylenglykolu). Směs vzorku a pufru byla v termostatu zahřata na teplotu 99 °C po dobu 3 min, poté ochlazena a dále byly vzorky aplikovány na gel v množství 10 μl . Jako hmotnostní marker byl použit Blue Protein ladder 3,5–245 kDa (Central European Biosystems, ČR), který byl nanášen neředěný na gel v množství 5 μl . Vlastní separace byla provedena za podmínek napětí 150 V prvních 30 min a následně při napětí 200 V po dobu 4–6 hodin. Jako elektroodvodový pufr byl použit systém Tris (0,025 mol dm^{-3}) – glycin (0,192 mol dm^{-3}) obsahující

0,1 % (w/v) SDS. Po separaci byly gely vyjmuty, opláchnuty ve vodě a separované proteiny byly přes noc obarveny pomocí roztoku složeného z 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) methanolu, 10 % (v/v) 99,8% octové kyseliny a 40 % (v/v) destilované vody. Následné vymytí detekčního roztoku z pórů gelů, tzv. „odbarvení“ bylo provedeno odbarvovacím roztokem 25 % (v/v) ethanolu, 10 % (v/v) 99,8% octové kyseliny, 65 % (v/v) destilované vody po dobu 6 h a pomocí destilované vody (2 \times 400 ml) za podmínek aktivního třepání gelů o velmi nízké intenzitě na upravené třepačce. Po odbarvení byly gely vyhodnoceny pomocí fotodokumentačního zařízení Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA).

Výsledky a diskuse

Dvoustupňové přečištění a výtěžek proteinů

Pomocí dvoustupňového přečištění hlízových proteinů došlo k rozdělení čtyř frakcí. Využitím media Iontosorb s ligandem DEAE došlo k separaci bazických inhibitorů proteas (frakce „B“) od společné frakce patatinu a kyselých inhibitorů proteas (frakce „C“). Po prvním kroku

Tabulka I

Výtěžky proteinů [mg] proteinových frakcí získaných dvoustupňovým přečištěním v uvedených objemech

Odrůda	Výtěžek proteinů ve frakci			
	„B“ [mg ve 100 ml]	„C“ [mg ve 100 ml]	„D“ [mg ve 120 ml]	„E“ [mg ve 240 ml]
Adéla	82	96	60	38
Eurostarch	144	129	74	84

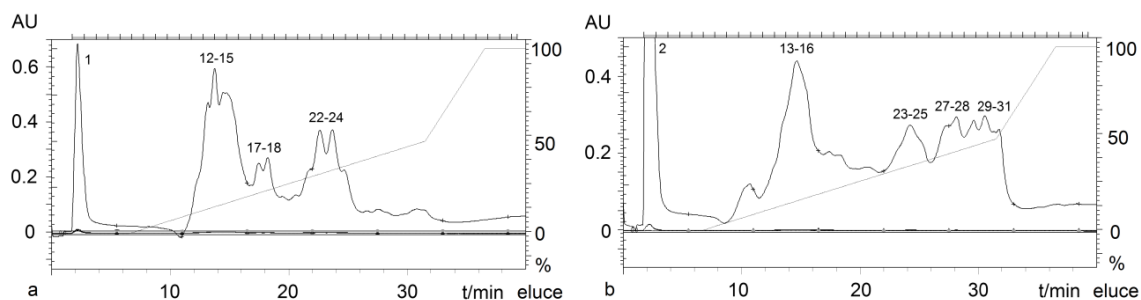
přečištění proteinů pomocí media s ligandem DEAE byly u frakce „B“ pomocí SDS-PAGE potvrzeny zejména frakce inhibitorů proteas o velikosti ~8–20 kDa a proteiny patatinového komplexu (~40–42 kDa), které byly přítomny u frakcí „C“. Frakce „C“ byla v dalším kroku rozdělena do samostatné frakce kyselých inhibitorů proteas (frakce „D“) a frakce „E“ představující přečištěnou frakci proteinů patatinového komplexu. Pouvreau u odrůdy Elkana použila pro prvotní separaci hlízových proteinů kolonu fungující na principu gelové permeační chromatografie Superdex 75 prep grade (GE Healthcare, USA)⁷. Došlo k rozdělení inhibitorů proteas do 4 samostatných frakcí. Proteiny patatinového komplexu byly v tomto případě zachyceny společně s bramborovým inhibitorem I (PI-1). K rozdělení obou frakcí došlo tepelnou koagulací. Došlo tak k oddělení nativního termolabilního inhibitoru proteas

a termolabilního koagulovaného patatinu. Pomocí námi použité metody byly získány inhibitory proteas i patatin v nativním stavu.

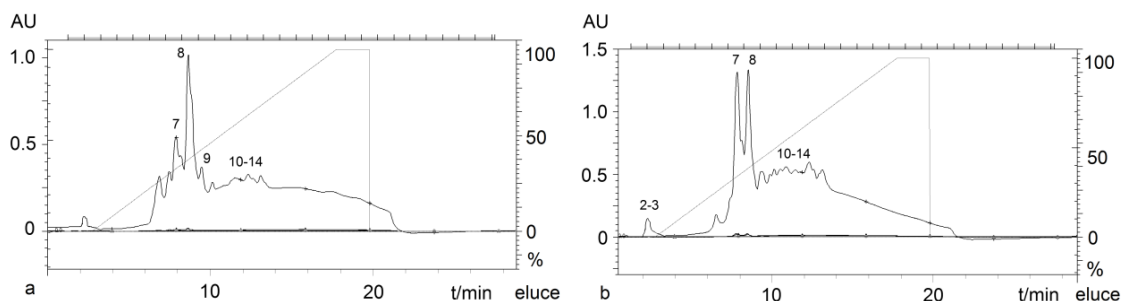
Doplňkovou analýzou byla formou metody BCA změřena koncentrace proteinů u jednotlivých purifikovaných frakcí a následně vypočítán výtěžek proteinů (tab. I). Výchozí výtěžek proteinů z PFJ ve výchozím objemu 40 ml zjištěný metodou BCA činil přibližně 368 mg u odrůdy Adéla a 435 mg u odrůdy Eurostarch.

Separace na systému FPLC

Vzorky byly úspěšně odsoleny na odsolovací kolonce. Pro následné zakoncentrování a separaci byly použity frakce s vysokým obsahem proteinů a zároveň nízkou vodivostí představující odsolené frakce. Při využití kolony s kat-



Obr. 2. Chromatografická separace na koloně UNO S6; a – odrůda Adéla, b – odrůda Eurostarch, průtok 4 ml min⁻¹, detekce: UV/VIS 214 nm, čísla v poli – označení sbíraných a dále analyzovaných proteinových frakcí



Obr. 3. Chromatografická separace na koloně UNO Q6; a – odrůda Adéla, b – odrůda Eurostarch, průtok 4 ml min⁻¹, detekce: UV/VIS 214 nm, čísla v poli – označení sbíraných a dále analyzovaných proteinových frakcí

iontovým měničem UNO S6 (obr. 2) došlo k rozdělení bazických inhibitorů proteas (frakce „B“) do tří až čtyř samostatných frakcí. V obdobné studii týkající se separace bramborových PIs byly použity iontově výměnné náplňové kolony Source 15 S, což vedlo k rozdělení bazických inhibitorů proteas (pI 7–9) do sedmi frakcí⁷.

Kontrola separací pomocí SDS-PAGE (obr. 3a,b) potvrdila zastoupení několika skupin PIs. Přítomné frakce byly ověřeny metodou SDS-PAGE. Podle elektroforetických analýz a analýz hmotnostní spektrometrií provedených Pouvreau bylo v oblasti PIs s hodnotou isoelektrického bodu v bazické oblasti potvrzeno zastoupení inhibitoru cysteinových proteas (PCPI) a jeho isoforem, inhibitoru aspartátových proteas (PAPI) a komplex inhibitorů Kunitzova typu (PKPI). Všechny tyto skupiny zahrnují PIs o velikosti přibližně 20–21 kDa (cit.⁷). Naše výsledky ukazují majoritní zastoupení inhibitorů proteas v oblasti okolo 17–20 kDa, což odpovídá komplexům inhibitorů cysteinových a aspartátových proteas, případně minoritní zastoupení podjednotky (16,4 kDa) bramborového inhibitoru proteas II (obr. 4a,b).

V dalším kroku byla provedena frakcionace kyselých inhibitorů proteas (frakce „D“) 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 (obr. 4c,d) a potvrzují zastoupení bramborového inhibitoru proteas II (PI-2) a bramborového inhibitoru proteas I (PI-1) v této oblasti^{16,17}. U odrůdy Eurostarch (obr. 4d) došlo také k pravděpodobnému zachycení některých isoforem PAPI a PCPI. Podle analýz provedených v rámci srovnávané práce, po separaci na koloně s aniontovým měničem, převažuje v rámci kyselých PIs právě výrazné zastoupení bramborového inhibito-

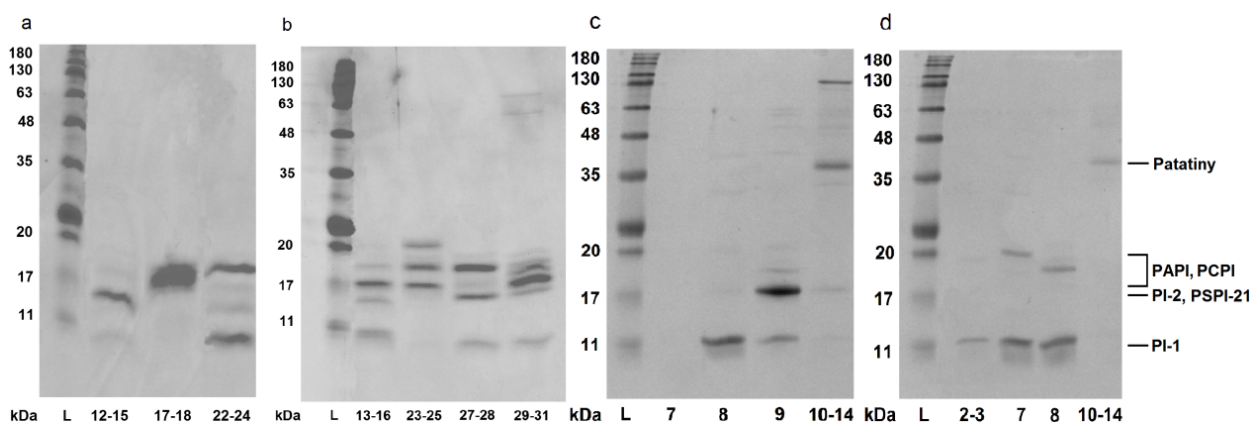
ru II (PI-2), dále pak bramborového inhibitoru I (PI-1) a některých isoforem PCPI a PAPI (cit.⁷).

Bramborový inhibitor proteas II patří do skupiny inhibitorů serinových proteas I3 Kunitzova typu a je tvořený dvěma polypeptidovými řetězci o velikosti 16,5 a 4,5 kDa (cit.^{7,16}). Možné je také rozdělení proteinu PI-2 do dvou frakcí o velikosti 10 kDa znázorněné na příslušných elektroferogramech (obr. 4c,d). Metodou SDS-PAGE došlo dle vyhodnocené molekulové hmotnosti také k možnému zachycení inhibitoru cysteinových proteas – multicystatinu s molekulovou hmotností 85 kDa (obr. 4c)¹⁸. Pro bližší identifikaci bílkovin v jednotlivých separovaných frakcích by bylo vhodným doplňkem k analýzám SDS-PAGE použití hmotnostní spektrometrie.

Závěr

Dle dosažených výsledků byla potvrzena vysoká využitelnost iontově výměnných kolon s monolitickou náplní při separaci bramborových inhibitorů proteas. Díky možnosti využití vyššího průtoku u použitých kolon (až 8 cm³ min⁻¹), které monolitické kolony tohoto typu umožňují ve srovnání s kolonami využívající gelové filtrace, a díky využití gradientové eluce, bylo možné zefektivnit separaci frakcí PIs. Lze tedy dosáhnout srovnatelných výsledků za lepší podmínek, zejména zkrácení časů separací. Jednotlivé frakce PIs je možné následně snadno vizualizovat pomocí SDS-PAGE. Pro detailní identifikaci jednotlivých inhibitorů proteas a jejich isoforem by bylo vhodné využít techniky hmotnostní spektrometrie.

Tato práce byla finančně podporována Grantovou agenturou Jihočeské univerzity (projekt GAJU 151/2014/Z a GAJU 112/2016/Z).



Obr. 4. Ověření frakcí pomocí SDS-PAGE po separaci na koloně UNO S6; a – odrůda Adéla, b – odrůda Eurostarch a po separaci na koloně UNO Q6; c – odrůda Adéla, d – odrůda Eurostarch. Patatiny – proteiny patatinového komplexu, PAPI – inhibitory aspartátových proteas, PCPI – inhibitory cysteinových proteas, PI-2 – bramborový inhibitor proteas II, PSPI-21 bramborový inhibitor proteas XXI, PI-1 – bramborový inhibitor proteas I

LITERATURA

1. Fagerstam L. G., Lizana J., Axiö-Fredriksson U. B., Wahlström L.: *J Chromatogr.* 266, 523 (1983).
2. Madadlou A., O'Sullivan R., Sheehan D.: *Methods Mol. Biol.* 681, 439 (2011).
3. Vojta J., Musilová-Svobodová A., Franc M., Coufal P., Bosáková Z.: *Chem. Listy* 108, 127 (2014).
4. Ali I., Vinay D. G., Aboul-Enein H. Y.: *J. Chromatogr. Sci.* 47, 432 (2009).
5. Švec F.: *Chem. Listy* 98, 232 (2004).
6. Lawrence P. K., Koundal K. R.: *J. Biotechnol.* 5, 93 (2002).
7. Pouvreau L.: *Dissertation*. Wageningen University, Wageningen, Nizozemsko, 2004.
8. Fischer M., Kuckenbergl M., Kastilan R., Muth J., Gebhardt C.: *Mol. Genet. Genomics* 290, 387 (2015).
9. Kim J. Y., Park S. C., Hwang I., Cheong H., Nah J. W., Hahm K. S., Park Y.: *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2860 (2009).
10. Feldman M. L., Andreu A. B., Korgan S., Lobato M. C., Huarte M., Walling L. L., Daleo G. R.: *Plant Breeding* 133, 275 (2014).
11. Lima A. I. G., Mota J., Monteiro S. A. V. S., Ferreira R. M. S. B.: *Food Chem.* 197, 30 (2016).
12. Fan S. G., Wu G. J.: *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46, 273 (2005).
13. Racusen D., Foote M.: *J. Food Biochem.* 4, 43 (1980).
14. Bártová V., Bárta J.: *J. Agric. Food Chem.* 57, 9028 (2009).
15. Laemmli U. K.: *Nature* 227, 680 (1970).
16. Bártová V., Bárta J., Kamenová A., Staňková A., Čurn V.: *Chem. Listy* 106, 365 (2012).
17. Beekwilder J., Schipper B., Bakker P., Bosch D., Jongsma M.: *Eur. J. Biochem.* 267, 1975 (2000).
18. Nissen M. S., Kumar G. N. M., Youn B., Knowles D. B., Lam K. S., Ballinger W. J., Knowles N. R., Kang C.: *Plant Cell* 21, 861 (2009).

F. Lorenc and J. Bárta (*Department of Special Plant Production, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic*): **The Use of Monolithic Columns for the Separation of Potato Protease Inhibitors Using the Fast Protein Liquid Chromatography System**

Juices from tubers of two potato varieties, Adéla and Eurostarch, have been selected as the source material for the separation of protease inhibitors. Their purification was achieved first using the gravity flow ion-exchange and Con-A affinity columns followed by the chromatographic separation applying monolithic ion exchange columns attached to a Fast Protein Liquid Chromatography system. Protease inhibitors were identified in separated fractions by SDS-PAGE. Potato inhibitor II and potato inhibitor I were major components in acidic fractions. The alkaline protease inhibitors were identified as isoforms of cysteine protease inhibitors, aspartate protease inhibitors, and as some proteins of the complex Kunitz-type protease inhibitors family.