

Abstrakt

Rutinosidasy (α -L-rhamnosyl- β -D-glukosidasy) z *Aspergillus niger* (*AnRut*) jsou glykosidasy (EC 3.2.1) katalyzující hydrolýzu glykosidové vazby mezi aglykonem a disacharidovým zbytkem rutinosou. Duální substrátová specifita této skupiny enzymů popisuje paralelní aktivitu k substrátům rutinu (nesoucímu disacharidový zbytek rutinosyl) a isokvercitrinu (nesoucímu glukosyl). Aktivní místo *AnRut* je komplexnější než u ostatních glykosidas a je tvořeno katalytickými aminokyselinami Glu210 a Glu319 v aktivním místě a postranním tunelem – tato netradiční struktura s rozdílnými interakcemi v tunelu a aktivním místě je pravděpodobně důvodem výjimečné substrátové specifity enzymu. Bodovou či vícenásobnou mutací enzymu můžeme modifikovat jeho primární i sekundární strukturu, a tím způsobit i výrazný posun substrátové specifity.

Hlavním cílem této práce je analýza tří rozdílných mutantních variant rutinosidasy *AnRut*, jejich produkce, purifikace a studie vlivu mutací v těchto variantách na substrátovou specifitu enzymů. Všechny varianty byly navrženy na základě molekulárního modelování. Substrátová specifita byla mj. stanovena reakcemi mutantních variant s dosud neprostudovanými substráty. Pomocí HPLC byla také stanovena afinita jednotlivých variant k přirozeným substrátům rutinu a isokvercitrinu.

Klíčová slova

diglykosidasa; isokvercitrin; mutagenese; *Pichia pastoris*; rutin; substrátová specifita; rutinosidasa