

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



**Charakterizace izoforem  $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku**  
(*Nicotiana tabacum* L.)

**Characterization of  $\beta$ -glucosidase isoforms from tobacco leaves**  
(*Nicotiana tabacum* L.)

Bakalářská práce

Školitelka: Doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

2012

Jan Kukla

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Praha, 23. 8. 2012

Podpis:

## Abstrakt

$\beta$ -glukosidasa odštěpuje glukosylové zbytky z oligosacharidů a glykokonjugátů. V rostlinách plní důležitou roli při růstu a jejich vývoji. Mnohé rostlinné hormony a obranné látky jsou skladovány ve formě glukosidů a aktivovány po hydrolýze katalyzované  $\beta$ -glukosidasou. Spolu s dalšími glykosidasami se podílí na metabolismu buněčné stěny. V této práci byla optimalizována extrakce  $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku a připravena rozpustná glykosylovaná, rozpustná neglykosylovaná a iontově vázaná forma  $\beta$ -glukosidasy. Rozpustná glykosylovaná  $\beta$ -glukosidasa měla stejné pH optimum jako iontově vázaná  $\beta$ -glukosidasa (pH 4.5). Rozpustná glykosylovaná forma měla vyšší afinitu k substrátu p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidu ( $K_m=2,0 \times 10^{-3} \text{M}$ ) než neglykosylovaná ( $K_m = 13,9 \times 10^{-3} \text{M}$ ).

## **Abstract**

$\beta$ -glucosidase cleave glucose residues from oligosaccharides and glycoconjugates. Enzyme plays many important roles in growth and development of a plant. Many of the plant hormones and defence substances are being stored in form of glucosides and they are activated after hydrolysis catalyzed by  $\beta$ -glucosidase. It is involved in cell wall metabolism together with another glucosidases. In this work, an extraction of  $\beta$ -glucosidase from tobacco leaves was optimized. Further a soluble glycosylated , a soluble unglycosylated and ion-bound forms of  $\beta$ -glucosidase were isolated. The soluble glycosylated form had the same pH optimum as the ion-bound form of  $\beta$ -glucosidase (pH 4.5). The soluble glycosylated form of the enzyme had a higher affinity to p-NP- $\beta$ -D-glucoopyranoside substrate ( $K_m = 2,0 \times 10^{-3}$  M) than the soluble unglycosylated form ( $K_m = 13,9 \times 10^{-3}$  M).

## Seznam zkratk

a	aktivita enzymu
A280	absorbance při 280 nm
ABA	kyselina abscisová
Ck	cytokininy
ConA	konkanavalin A Sepharosa
DAB	3,3-diaminobenzidin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GA	gibereliny
GOD	glukosaoxidas
HRP	křenová peroxidasa
IAA	kyselina indolyl-3-octová
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
PAL	fenylalaninamoniumlyasa
Tris	tris-(hydroxymetyl)-aminometan
v	rychlost enzymové reakce

## Obsah

1. Úvod .....	- 9 -
1.1. Vlastnosti $\beta$ -glukosidasy .....	- 10 -
1.1.1. Struktura.....	- 10 -
1.1.2. Substrátová specifita.....	- 12 -
1.1.3. Vliv pH na aktivitu enzymu .....	- 13 -
1.2. Funkce $\beta$ -glukosidasy v rostlinách .....	- 13 -
1.2.1. Funkce $\beta$ -glukosidasy a rostlinné hormony.....	- 13 -
1.2.1.1. Kyselina abscisová.....	- 13 -
1.2.1.2. Auxin.....	- 14 -
1.2.1.3. Cytokininy .....	- 15 -
1.2.1.4. Gibereliny.....	- 16 -
1.2.1.5. Funkce $\beta$ -glukosidasy ve flavonoidech .....	- 18 -
1.3. Funkce $\beta$ -glukosidasy při kyanogenezi rostliny .....	- 20 -
Cíl práce.....	- 21 -
2. Materiál a metody.....	- 22 -
2.1. Rostlinný materiál .....	- 22 -
2.2. Chemikálie.....	- 22 -
2.3. Pufry .....	- 23 -
2.4. Přístroje .....	- 23 -
2.5. Metody .....	- 24 -
2.5.1. Extrakce.....	- 24 -
2.5.1.1. Optimalizace extrakčních podmínek .....	- 24 -
2.5.2. Částečná purifikace $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku .....	- 24 -
2.5.2.1. Izolace $\beta$ -glukosidasy - postup A.....	- 24 -
2.5.2.1.1. Extrakce 0.1 M fosfátovým pufrem pH 7.0 .....	- 24 -

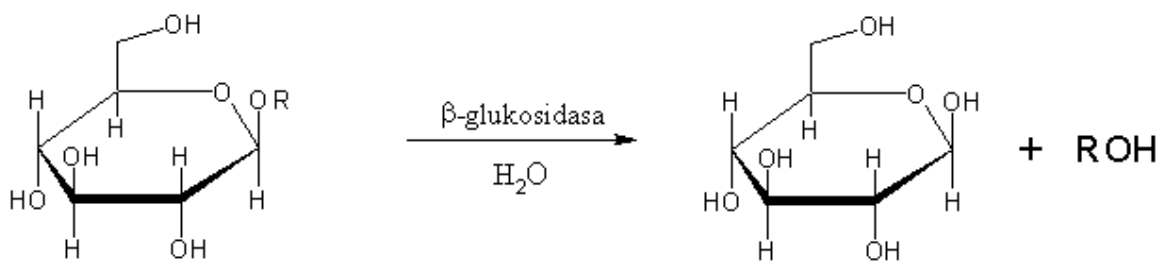
2.5.2.1.2. Precipitace síranem amonným.....	- 25 -
2.5.2.1.3. Dialýza proti 0.02 M Tris-HCl pufru pH 7.0 .....	- 25 -
2.5.2.1.4. Chromatografie na koloně ConA-Sepharosy v prostředí Tris-HCl pufru -	25 -
2.5.2.2. Izolace $\beta$ -glukosidasy - postup B .....	- 26 -
2.5.2.2.1. Chromatografie na koloně Sepharosy 4 B.....	- 26 -
2.5.2.3. Izolace $\beta$ -glukosidasy - postup C .....	- 27 -
2.5.2.3.1. Extrakce 50 mM fosfátovým pufrům pH 7.0 .....	- 27 -
2.5.3. Stanovení aktivity $\beta$ -glukosidasy využívající p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosid jako substrát .....	- 29 -
2.5.3.1. Stanovení aktivity $\beta$ -glukosidasy – metoda End-point .....	- 29 -
2.5.3.2. Stanovení pH optima .....	- 30 -
2.5.3.3. Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu.....	- 30 -
2.5.3.4. Závislost rychlosti enzymové reakce na teplotě.....	- 30 -
2.5.4. Stanovení aktivity $\beta$ -glukosidasy využívající spřaženou reakci.....	- 30 -
2.5.6. Schéma pracovního plánu.....	- 32 -
3. Výsledky .....	- 33 -
3.1. Extrakce $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku.....	- 33 -
3.1.1. Optimalizace extrakčních podmínek .....	- 33 -
3.2. Částečná purifikace $\beta$ -glukosidasy .....	- 34 -
3.2.1. Izolace $\beta$ -glukosidasy postupem A.....	- 34 -
3.2.2. Izolace $\beta$ -glukosidasy postupem B .....	- 35 -
3.2.3. Izolace $\beta$ -glukosidasy postupem C .....	- 37 -
3.3. Charakterizace $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku .....	- 40 -
3.3.1. Určení pH optima .....	- 40 -
3.3.3. Závislost reakční rychlosti enzymu na koncentraci substrátu p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidu.....	- 41 -

3.3.4. Závislost reakční rychlosti na teplotě rozpustné glykosylované formy $\beta$ -glukosidasy.....	- 43 -
4. Diskuze .....	- 44 -
5. Souhrn.....	- 46 -
Citace.....	- 47 -



# 1. Úvod

Glykosidasy katalyzují selektivní hydrolyzu glykosidových vazeb v oligosacharidech, polysacharidech a glykokonjugátech <sup>1</sup>. Na obrázku č. 1 je ukázána rovnice reakce štěpení  $\beta$ -glukosidasou.



Obr. č. 1: Rovnice reakce katalyzované  $\beta$ -glukosidasou.

$\beta$ -glukosidasy ( $\beta$ -D-glukosid-  $\beta$ -D-glukohydrolasy), EC 3.2.1.21., představují jednu ze skupin glykosidas. Zastávají rozmanité úlohy v mnoha zásadních biologických a biotechnologických procesech <sup>1</sup>. Tyto enzymy se vyskytují v celé biosféře od bakterií, přes houby, až k rostlinám a živočichům. V houbách a bakteriích se například  $\beta$ -glukosidasa zapojuje spolu s celulasou do katabolismu celulosy v podobě tzv. celulasového komplexu. U živočichů, respektive u člověka, je možné jako příklad uvést kyselou  $\beta$ -glukosidasu (glukocerebrosidasu), jejíž nedostatek v lidském lysozomu může vést ke vzniku Gaucherovy choroby <sup>2</sup>. V rostlinách se  $\beta$ -glukosidasa účastní například obrany proti škůdcům <sup>1</sup>.

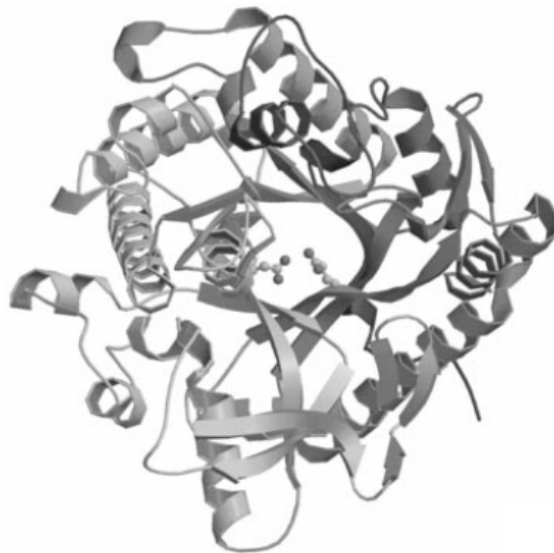
Přes velké množství  $\beta$ -glukosidas v přírodě jsou si všechny tyto enzymy podobné. Převážná většina studovaných  $\beta$ -glukosidas má molekulovou hmotnost podjednotky mezi 55-65 kDa, kyselé pH optimum (mezi pH 5-6) a vysokou substrátovou specifitu k cukerné složce <sup>2</sup>.

## 1.1. Vlastnosti $\beta$ -glukosidasy

### 1.1.1. Struktura

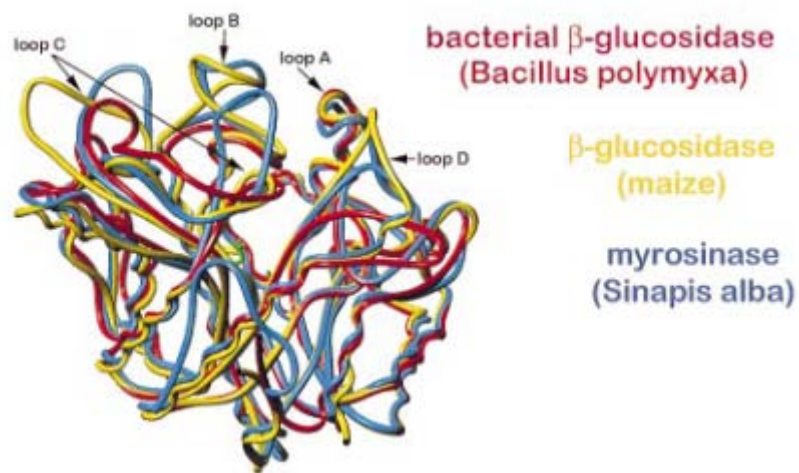
Vzhledem k velkému množství různých druhů  $\beta$ -glukosidas nelze mluvit o identické struktuře a velikosti  $\beta$ -glukosidasy. Příkladem může být  $\beta$ -glukosidasa z kukuřice (*Zea mays*), která má 500 aminokyselinových zbytků. Toto číslo se však liší u jiných rostlinných druhů. Shodnost v primární struktuře enzymu  $\beta$ -glukosidasy v různých druzích bakterií se pohybuje mezi 17 – 44 %. V kontrastu s touto skutečností je například 90% totožnost v primární aminokyselinové sekvenci, kterou mají 2 izoformy  $\beta$ -glukosidasy z kukuřice (*Zea mays*). I přes tyto rozdíly v primární struktuře enzymu je oblast katalytického místa silně sekvenčně konzervována pro všechny  $\beta$ -glukosidasy<sup>3</sup>.

Základním motivem sekundární struktury je barel, který se skládá z 8  $\alpha$  helixů a 8  $\beta$  skládaných listů ( $(\beta/\alpha)_8$ ) a má 4 smyčky v oblasti katalytického místa<sup>3</sup>. Na obrázku č. 2 je stužkový model  $\beta$ -glukosidasy z kukuřice (*Zea mays*) s naznačenými 2 zbytky kyseliny glutamové v katalytickém místě.



Obr. č. 2: Stužkový diagram izoenzymu ZMGl1  $\beta$ -glukosidasy z kukuřice (*Zea mays*) ukazující 2 zbytky kyseliny glutamové Glu-191 a Glu-406 v katalytickém místě<sup>3</sup>.

Počet podjednotek  $\beta$ -glukosidasy závisí na druhu rostliny. Nejčastější formou je dimer. Ten může být složen ze dvou identických podjednotek (cizrník beraní), nebo neidentických podjednotek (borovice pokroucená) <sup>4</sup>. Jiným příkladem je  $\beta$ -glukosidasa ze pšenice seté (*Triticum aestivum*), která má přibližně 5 podjednotek (celková molekulová hmotnost je 260-300 kDa, a podjednotka má 60 kDa) <sup>5</sup>. Průměrná molekulová hmotnost podjednotky se pohybuje okolo 58-68 kDa <sup>4</sup>. Na obrázku č. 3 jsou ukázány shodné a rozdílné úseky ve struktuře tří různých  $\beta$ -glukosidas.



Obr. č. 3: Obrázek ukazuje strukturní podobnosti a rozdíly ve struktuře  $\beta$ -glukosidasy v bakterii *Bacillus polymyxa* (fialová), v kukuřici *Zea mays* (žlutá) a struktuře myrosinasy (modrá) z hořčice bílé <sup>3</sup>.

### 1.1.2. Substrátová specifita

$\beta$ -glukosidasy hydrolyzují glykosidovou vazbu v molekule substrátu za současného uvolnění monosacharidu a takzvaného aglykonu (necukerná složka).  $\beta$ -glukosidasy štěpí nejlépe substráty obsahující glukosu jako sacharidovou část, avšak není to vždy pravidlem. Dalšími monosacharidy mohou být například fukosa, galaktosa, xylosa, arabinosa a další<sup>4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12</sup>, často ve formě *p*-nitrofenylových derivátů. Dále štěpí disacharidy (cellobiosa), oligosacharidy a polysacharidy (celulosa), aryl- a alkyl- $\beta$ -D-glukosidy.

$\beta$ -glukosidasa také štěpí fenolické látky, které jsou ve formě komplexů s glukosou. Jedná se hlavně o třídu látek nazývaných flavonoidy. Jsou to sekundární metabolity a je o nich pojednáno v samostatné kapitole viz 1.2.1.5. Dále mezi fenolické látky patří substrát salicin, který  $\beta$ -glukosidasa umí štěpit.

K fenolickým látkám patří i isoflavony se substráty genistein (7-O-glukosyl 6-O-malonát) a daidzein (7-O-glukosid)<sup>4</sup>.

Dalšími substráty mohou být například cyklické hydroxamové kyseliny. Příkladem těchto látek je DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-on) a DIBOA (2,4-dihydroxy-1,4-benzoxazin-3-on)<sup>5,10</sup>.

Důležitou skupinou látek jsou takzvané kyanogenní glykosidy, které se vyskytují v rostlinách a mají v nich spíše ochrannou úlohu. Této skupině látek je věnována vlastní kapitola viz 1.3.

Různé druhy  $\beta$ -glukosidas štěpí různou paletu substrátů. Tato skutečnost záleží na rostlinném druhu, ze kterého enzym pochází. Názorným příkladem může být  $\beta$ -glukosidasa z propolis, která štěpí pouze *p*-NP- $\beta$ -D-galaktopyranosid, ale už neštěpí jiné *p*-nitrofenylové deriváty a neštěpí cellobiosu ani amygdalin<sup>6</sup>. Na druhou stranu například  $\beta$ -glukosidasa z pomerančovníku (*Citrus sinensis*) štěpí množství *p*-nitrofenolových derivátů, dále salicin a cellobiosu<sup>11</sup>, nebo  $\beta$ -glukosidasa z čajových výhonků (*Camellia sinensis* cv. *Asha*), u které byla naměřena aktivita i s *o*-nitrofenolovými deriváty<sup>7</sup>.

### 1.1.3. Vliv pH na aktivitu enzymu

pH optimum většiny  $\beta$ -glukosidas z různých rostlinných druhů se pohybuje v mírně kyselém prostředí mezi hodnotami pH 4.5 (*Citrus sinensis*<sup>13</sup>) do 6.5 (*Vanilla planifolia*<sup>4</sup>). Aktivita enzymu se tak pohybuje v širokém rozmezí hodnot pH.

## 1.2. Funkce $\beta$ -glukosidasy v rostlinách

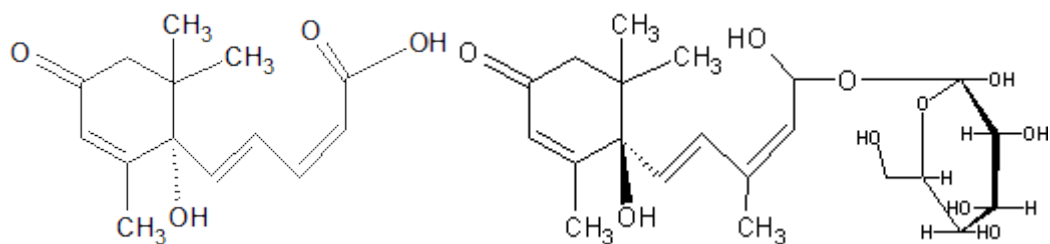
### 1.2.1. Funkce $\beta$ -glukosidasy a rostlinné hormony

Rostlinné hormony zastávají rozmanité úlohy v mnoha aspektech rostlinného vývoje. Jsou důležité například v regulaci otevírání průduchů v listech a v iniciaci odpovědi na rozdílné stresové podmínky. Jiné rostlinné hormony jsou zase velmi zásadní pro odolnost rostliny proti různým onemocněním. Zástupcem těchto hormonů je například kyselina salicylová, kyselina jasmonová a etylen<sup>14</sup>.

Hormony se vyskytují v rostlinách v glykosylované formě jako inaktivní zásoba těchto hormonů.  $\beta$ -glukosidasa po působení specifických signálů uvolňuje aktivní formu hormonu z tohoto komplexu. V následujícím textu jsou popsány funkce a účinky již aktivních forem hormonů na rostlinu.

#### 1.2.1.1. Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA), viz obr. č. 4, je rostlinným hormonem, který reguluje růst a pomáhá rostlinám překonat stresové podmínky, například období sucha, chladu nebo vysokou salinitu půdy<sup>15</sup>.



Obr. č. 4: Volná kyselina abscisová (vlevo) a ester kyseliny abscisové vázaný na molekulu glukosy (vpravo).

ABA se v rostlinách vyskytuje ve dvou formách. První je volná (obr. č. 4), která je aktivní formou tohoto hormonu. V rostlině se ale vyskytuje mnohem více ve formě komplexu s glukosou, která představuje neaktivní zásobu <sup>15</sup>.

Neaktivní ABA se ukládá ve vakuole. Dále se nachází v xylému, nepochybně v cytosolu a v buněčné stěně <sup>15</sup>.

ABA může být také zapojená ve zvýšené odolnosti rostlin proti patogenům, kde má vliv na zacelení poškozeného rostlinného pletiva kalosou ( $\beta$ -1,3-glukan) <sup>14</sup>.

ABA je taktéž klíčovým faktorem k potlačení obranyschopnosti rostliny při onemocnění způsobeném rostlinným patogenem *Magnaporthe grisea* <sup>14</sup>.

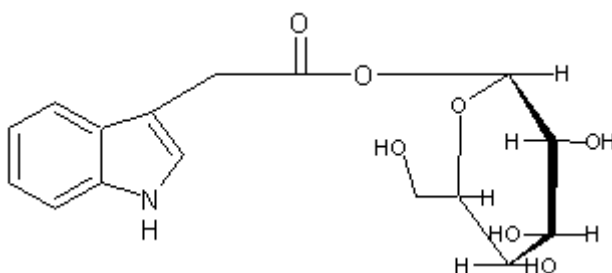
### 1.2.1.2. Auxin

Auxin je rostlinným hormonem, který působí v mnoha fyziologických procesech: např. při růstu rostliny, při buněčném prodlužování a regulaci prodlužování kořenů <sup>16</sup>. Dále v odpovědi na světlo v tropických oblastech, má vliv na vývoj rostlinných částí, vývoj cévních svazků a růst tkáňových kultur <sup>17</sup>.

Transport auxinu uvnitř rostliny je prováděn na delší vzdálenost cévními svazky a na kratší vzdálenost přenosem typu buňka-buňka. To zahrnuje jak pasivní přenos přes plasmatickou membránu, tak aktivní pohyb, který závisí na auxinovém influxu a efluxu, který je zprostředkován změnou pH gradientu napříč plasmatickou membránou. Přenos auxinu je tedy spojen s pH prostředím uvnitř buněk.

Jestliže není auxin využit, ukládá se ve formě neaktivního glykosidu. Přebytek tohoto glykosidu je následně ukládán do semen rostlin a po jeho aktivaci ovlivňuje jejich klíčivost <sup>16</sup>.

Základním auxinem je kyselina indolyl-3-octová (IAA), která je na obrázku č. 5. Kromě IAA existují i další přirozené auxiny jako je například indolyl-3-máselná kyselina (IBA).



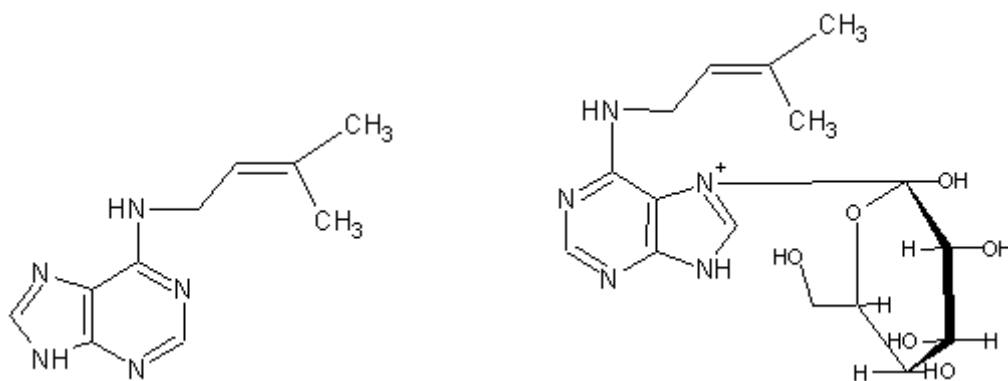
Obr. č. 5: Základní auxin, kyselina indolyl-3-octová (IAA) ve formě *O*-glukosidu.

Mezi nejvýznamnější účinky auxinu, mimo těch uvedených v úvodu, patří regulace gravitropismu a fototropismu a stimulace tvorby postranních kořenů <sup>17</sup>.

### 1.2.1.3. Cytokininy

Cytokininy (Ck) patří mezi regulátory rostlinného růstu a vývoje. Jsou to deriváty adeninu. Ck jsou vyžadovány při buněčném dělení, zrání semen, diferenciaci výhonků, zpomalení stárnutí a v odpovědi na rostlinný stres <sup>18</sup>. Je zapojen ve vývoji kořenového systému a v aktivaci procesů závislých na světle jako je například diferenciaci chloroplastů <sup>18</sup>. Ck jsou v rostlinách zapojeny do procesu kvetení, respektive v indukci tohoto procesu významným navýšením jejich množství v apikálních částech rostliny <sup>19</sup>.

Ck jsou syntetizovány v meristémech kořene a následně přenášeny dál po těle rostliny. Jejich syntéza je regulována příslušnými geny. Například u housníčku rolního (*A. thaliana*) je tvorba Ck regulována 3 rozdílnými geny. Na obrázku č. 6 je cytokinin isopentenylaminopurin <sup>18</sup>.



Obr. č. 6: Volný auxin isopentenylaminopurin (vlevo) a *N*-glykosylovaný isopentenylaminopurin (vpravo).

Mnoho rostlinných pletiv obsahuje Ck ve formě *O*- a *N*- glukosidů, které představují zásobní neaktivní formu. Některé rostlinné druhy syntetizují převážně *O*-glukosidy, jiné *N*-glukosidy a některé oba dva druhy <sup>20</sup>.

Snížení aktivity cytokininů vyvolané glykosylací vede ke zvýšení jejich stability, protože enzymy je v této formě neodbourávají. Glykosidická forma Ck je považována za transportní, protože byla objevena i v xylémové části <sup>21,22</sup>.

*O*-glykosylace je vratným procesem, *O*-glukosidy mohou být přeměněny zpět na aktivní formu  $\beta$ -glukosidasou <sup>23, 24</sup>, což u *N*-glukosidů možné není. Nevratnou glykosylaci *N*-glykosidů katalyzuje enzym *N*-glykosyltransferasa (EC 2.4.1.118), a to v polohách N7 a N9 <sup>25,26</sup>.

#### 1.2.1.4. Gibereliny

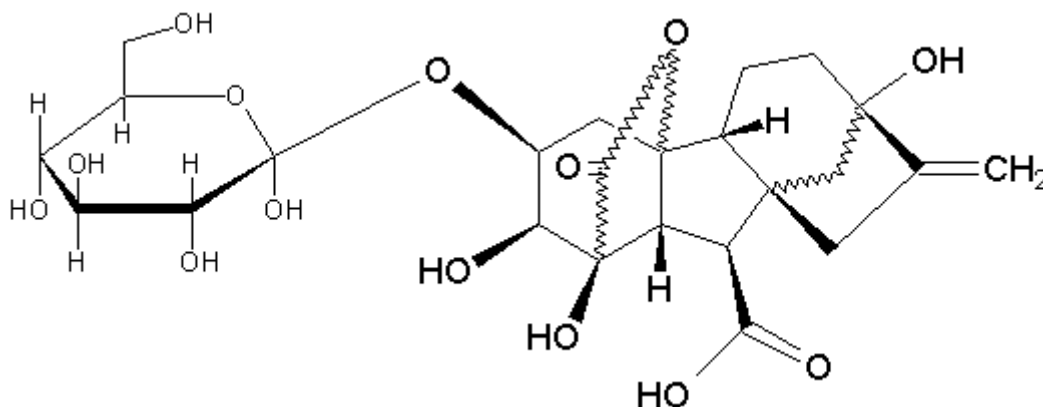
Gibereliny jsou izoprenoidní látky s velkým praktickým významem pro rostlinu. Bioaktivní gibereliny (GA) se účastní rozmanitých procesů ve vývoji rostliny od zrání semen, přes prodlužování listů, až po iniciaci kvetení a vývoj plodů <sup>27</sup>. Dále jsou gibereliny zapojeny v obranné reakci proti patogenům <sup>28</sup>.

GA pomocí regulačních genů řídí procesy např. vývoje sazenic jak u jednoděložných, tak u dvouděložných rostlin. Prvním krokem v regulaci genů je navázání molekuly GA na rozpustný GA receptor vyskytující se pravděpodobně v jádru buňky (GID1 v rýži,



AtGID1a, b, c v *Arabidopsis*). Komplex GA-receptor interaguje s DELLA proteiny. DELLA proteiny jsou třídou GA signálních represorů, které spouští asociaci aktivních DELLA proteinů s SCF<sup>GID2(SLY1)</sup> komplexem. To vede k rychlé destrukci DELLA proteinů ubikvitinací v proteasomu. Degradací těchto GA transkripčních regulačních proteinů se zvýší exprese GA proteinů důležitých pro rostlinu z hlediska jejího vývoje<sup>27</sup>.

GA spolu s auxiny, kyselinou abscisovou a cytokininy se objevují jako zásadní regulátory interakce bakterií s rostlinou. Tyto hormony ovlivňují výsledek onemocnění pozitivními, nebo negativními interferencemi s kyselinou jasmonovou, s kyselinou salicylovou (SA) a s etylenem na imunitní systém rostliny. Nicméně i tyto hormony mohou být využity patogeny proti rostlině samotné vypnutím jejího obranného systému. Klasickým příkladem odrážejícím tuto situaci je produkce coronatinu některými bakteriemi *Pseudomonas syringae*. Coronatin je fytotoxin strukturně podobný derivátům kyseliny jasmonové. Aktivní sekrece coronatinu do hostitele způsobuje hyperaktivaci signální dráhy kyseliny jasmonové, což následně způsobí utlumení obranného systému rostliny a usnadní tak invazi bakterie do rostliny<sup>28</sup>. Na obr. č. 7 je giberelin v inaktivním stavu.



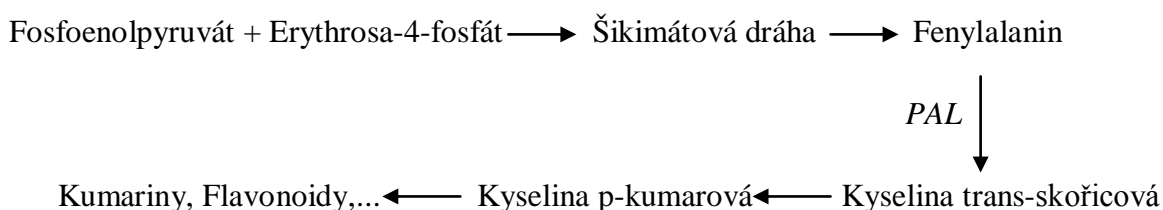
Obr. č. 7: GA8-2-O-β-glukosid z kukuřice (*Zea Mays L.*)

### 1.2.1.5. Funkce $\beta$ -glukosidasy ve flavonoidech

Flavonoidy spolu s dalšími fenolickými látkami tvoří sekundární metabolity. Strukturně se jedná o polyfenolické látky<sup>29</sup>.

Syntéza fenolických látek v rostlinách je odvozená ze šikimátové dráhy a metabolismu fenylypropanoidů. Produkty šikimátové dráhy jsou aromatické aminokyseliny fenylylalanin a tyrosin. Kondenzací prvních dvou metabolitů, fosfoenolpyruvátu a erythrosa-4-fosfátu, následovanou dalšími reakcemi dochází ke vzniku šikimátu. Produktem je fenylylalanin, nebo tyrosin, které jsou dalšími prekurzory v syntéze fenolických sloučenin. Deaminací fenylylalaninu vzniká kyselina trans-skořicová. Tuto reakci katalyzuje enzym fenylylalaninamoniumlyasa (PAL), eventuálně TAL pokud je prekurzorem tyrosin. Zjednodušené schéma syntézy je na obrázku č. 8.

Syntéza flavonoidů začíná u enzymu chalkonsyntasy, která katalyzuje spojení 1 molekuly p-kumaryl-CoA a 3 molekul malonyl-CoA za vzniku molekuly chalkonu. Pomocí dalších enzymů vzniká dihydrokempferol a dihydrokvercetin. Metabolická dráha umožňuje vznik dvou různých koncových metabolitů. Vzniká buď anthokyanin, nebo flavonoly (kempferol a kvercetin.)<sup>30</sup>.



Obr.č.8: Zjednodušené schéma biosyntézy fenolických látek

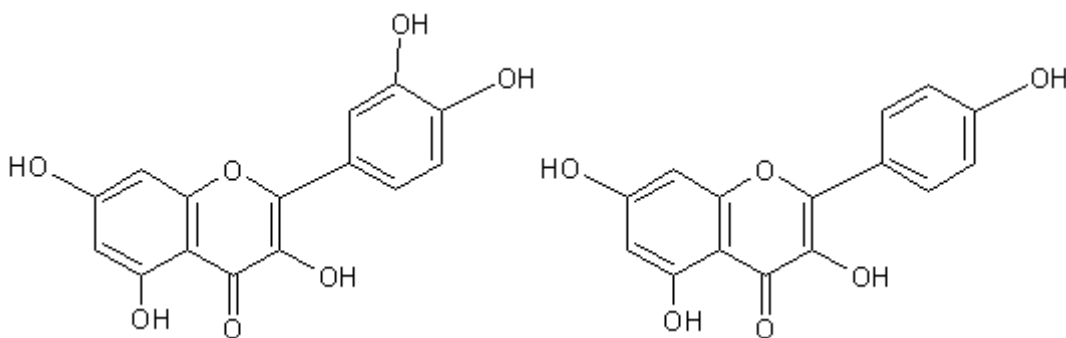
Pro rostlinu má význam v období růstu a vývoje. Různé rostlinné druhy mohou syntetizovat různé sloučeniny (flavonoidů), které jsou zapojeny v procesech jako lákání opylovačů, obrana rostliny před patogeny, ochrana rostliny před UV zářením, či slouží jako signální molekuly v interakci mezi rostlinou a bakterií<sup>30</sup>. Kempferol a kvercetin,

obr. č. 11, jsou nejvíce aktivními flavonoidy, které se účastní regulace transportu auxinu a poté působí na vývoj kořenového systému<sup>30</sup>.

Tyto metabolity jsou lidmi využívány například ve formě léků, antioxidantů a insekticidů.

Antioxidační účinky těchto fenolických látek závisí na množství přítomných hydroxylových skupin. Hydroxylové skupiny v orto pozici B kruhu zvyšují antioxidační kapacitu. Na druhou stranu glykosylace snižuje antioxidační schopnosti odebráním volné OH skupiny. Přidáním cukerné složky se snižuje antioxidační schopnost aglykonu, což se připisuje schopnosti této části vytvářet sterickou překážku při reakci. Kromě této vlastnosti, glykosylace například antocyaninu, vede k inhibici cyklooxygenasy, nebo xantinoxidasy<sup>32</sup>.

Jednou ze zajímavých schopností těchto látek je indukce buněčné smrti<sup>31</sup>. Hrají roli v nádorových a srdečních neurodegenerativních onemocněních. Mechanismus tohoto působení není znám, ale nejspíše souvisí se schopností flavonoidů inhibovat NF- $\kappa$ B signální dráhu. Aktivita NF- $\kappa$ B tlumí apoptosu a podporuje růst nádoru a metastázi. Dle některých studií jsou flavonoidy schopné indukovat apoptosu v nádorových buňkách, zatímco zdravé buňky zůstanou bez povšimnutí<sup>31</sup>.



Obr. č. 9: Flavonoidy kvercetin (vlevo) kampferol (vpravo)

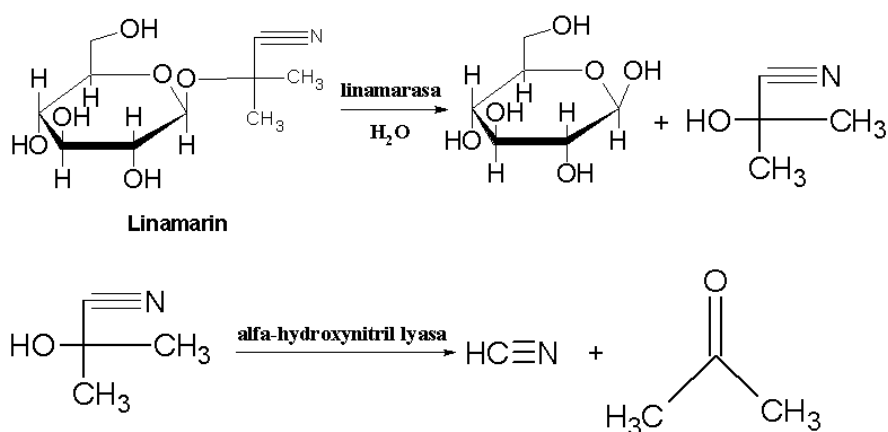
### 1.3. Funkce $\beta$ -glukosidasy při kyanogenezi rostliny

Rostliny produkují velké množství sekundárních metabolitů, přičemž mnohé mají fungicidní vlastnosti. Některé z těchto sloučenin jsou v rostlinách skladovány v aktivní formě, jiné ve formě konjugátů, které jsou inaktivní. Jsou to například kyanogenní glukosidy a glukosinoláty. Konjugáty jsou přeměňovány na aktivní formy až v případě poškození pletiva nebo po napadení rostliny patogenem. Přeměna je realizována enzymy, které jsou uvolňovány v důsledku poškození pletiva <sup>2</sup>.

Několik tisíc rostlinných druhů, včetně mnoha významných zemědělských plodin, syntetizují kyanogenní glykosidy a kyanolipidy. Tyto látky, respektive přírodní produkty, jsou při poškození pletiva následně uvolňovány hydrolyzou za vzniku aktivní formy <sup>33</sup>.

Kyanogeneze není proces vlastní pouze rostlinným druhům, které skladují kyanolipidy a kyanogenní glykosidy. Všechny vyšší rostliny vytváří kyanovodík v malém množství jako vedlejší produkt biosyntézy etylenu. To vysvětluje výskyt detoxikujícího enzymu  $\beta$ -kyanoalaninsyntetasy přítomné ve značném množství i v rostlinách, které kyanogenezi neprovádějí <sup>33</sup>.

Hydrolyza kyanogenních glykosidů je realizována příslušnými  $\beta$ -glukosidasami a specifickými lyasami. Kyanohydrid může též samovolně přecházet na aceton bez působení lyasy <sup>2</sup>. Na obrázku č. 10 je znázorněna rovnice přeměny linamarinu na aceton a kyanovodík.



Obr. č. 10: Rovnice reakce štěpení linamarinu specifickou  $\beta$ -glukosidasou (linamarasou) a lyasou za vzniku kyanovodíku a acetonu.

## **Cíl práce**

1. Optimalizace extrakce izoforem enzymu  $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku.
2. Charakterizace izoforem  $\beta$ -glukosidasy.
3. Studium substrátové specifity izoforem  $\beta$ -glukosidasy.

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Rostlinný materiál

Izolace enzymu byla provedena z čerstvých, nebo zmražených listů tabáku *Nicotiana tabacum* L. Rostliny byly pěstovány ve skleníku Ústavu experimentální botaniky AVČR. Listy 8 – 10 týdnů starých rostlin byly po odběru ihned zmraženy v tekutém dusíku a poté skladovány při -80 °C.

### 2.2. Chemikálie

3,3-Diamminobenzidin - Sigma, USA

Concanavalin A – Sepharosa - Pharmacia, Švédsko

Citronan sodný - Penta, ČR

Chlorid manganatý - Sigma, USA

Chlorid sodný - Penta, ČR

Dihydrogenfosforečnan sodný (monohydrát) - Penta, ČR

Glukosaoxidas - Sigma, USA

Hydrogenfosforečnan sodný - Penta, ČR

Křenová peroxidasa - Sigma, USA

Kyselina citronová - Lachema, ČR

p-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukosid - Sigma, USA

Polyvinylpolypyrrolidon - Sigma, USA

Salicin - Sigma, USA

Sepharosa 4B - Pharmacia, Švédsko

Síran amonný - Lachema, ČR

Tris – Sigma, USA

### **2.3. Pufry**

pufr A (0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 1.0 mM DTT, 1.0 mM EDTA, 5.0 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 % (v/v) glycerol)

0.1 M citrátový pufr pH 3.5, 6.0

0.1 M fosfátový pufr pH 5.0, 6.0, 7.0

50 mM fosfátový pufr pH 7.0

0.1 M McIlvain pufr – různá pH (0.1 M kys. citronová + 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O)

0.1 M Tris-HCl pH 7

### **2.4. Přístroje**

Spektrofotometr Ultrospec 2100- Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

Centrifuga Universal 32R- Schoeller, Německo

Termostat Major Science (MS) Elite - Major Science Co, Taiwan

Peristaltická pumpa P1- Pharmacia Fine Chemicals, Švédsko

Analytické váhy 100A(XE series)- Denver Instrument Company, USA

Ultra basic pH metr- Denver Instrument Company, USA

## **2.5. Metody**

### **2.5.1. Extrakce**

#### **2.5.1.1. Optimalizace extrakčních podmínek**

Čerstvé, nebo zmražené listy tabáku byly rozdrceny v třecí misce s přidavkem trojnásobného množství 0.1 M fosfátového pufru pH 5.0, 6.0, 7.0 a pufru A (0.1 M Tris-HCl pH 7.8 + 1.0 mM DTT + 1.0 mM EDTA + 5.0 mM MnCl<sub>2</sub> + 5 % (v/v) glycerol). Roztok byl centrifugován 20 minut při 16 600 x g při 4 °C s přidavkem 30 mg PVP. Celková spotřeba rostlinného materiálu byla přibližně 1.5 g. Aktivita enzymu byla měřena dle 2.5.3.1.

#### **2.5.2. Částečná purifikace $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku**

##### **2.5.2.1. Izolace $\beta$ -glukosidasy - postup A**

###### **2.5.2.1.1. Extrakce 0.1 M fosfátovým pufrem pH 7.0**

Extrakce byla provedena homogenizací 25 g čerstvých, nebo zmražených listů tabáku v třecí misce s trojnásobným množstvím 0.1 M fosfátového pufru pH 7.0. Roztok byl centrifugován 30 minut při 9 400 x g při 4 °C s přidavkem 30 mg PVP. Po centrifugaci byl oddělen sediment od supernatantu. V supernatantu byla stanovena aktivita enzymu se substrátem p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidem dle 2.5.3.1.



### **2.5.2.1.2. Precipitace síranem amonným**

Extrakt  $\beta$ -glukosidasy byl srážen síranem amonným do 20 % nasycení. Roztok byl centrifugován 30 minut při 9 400 x g při 4 °C. Supernatant byl oddělen od sedimentu a byl dále srážen síranem amonným do 75 % nasycení. Roztok byl centrifugován 30 minut při 9 400 x g při 4 °C. Supernatant byl oddělen od sedimentu. Sediment byl resuspendován ve 2 ml 0.1 M fosfátového pufru pH 7.0. V síranové frakci byla stanovena aktivita  $\beta$ -glukosidasy se substrátem p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidem dle 2.5.3.1. a preparát byl dále dialyzován.

### **2.5.2.1.3. Dialýza proti 0.02 M Tris-HCl pufru pH 7.0**

Dialýza probíhala 12 hodin proti roztoku 1 litru 0.02 M Tris-HCl pufru pH 7.0 při 4 °C za konstantního míchání. Aktivita  $\beta$ -glukosidasy v dialyzátu byla opět stanovena metodou dle 2.5.3.1. Roztok enzymu po dialýze byl centrifugován 2 minuty při 75 x g pro oddělení pevných částic od roztoku.

### **2.5.2.1.4. Chromatografie na koloně ConA-Sepharosy v prostředí Tris-HCl pufru**

Chromatografická kolona (9.5 x 1.0 cm) s ConA-Sepharosou byla ekvilibrována 0.02 M Tris-HCl puftrem pH 7.0 obsahujícím 0.5 M NaCl. Poté byla kolona ekvilibrována 0.02 M Tris-HCl puftrem pH 7.0 obsahujícím 0.5 M NaCl, 1.0 mM MnCl<sub>2</sub> a 1.0 mM ZnCl<sub>2</sub>. Na tuto kolonu bylo aplikováno 2 ml roztoku  $\beta$ -glukosidasy. Eluát byl jímán do odměrných zkumavek po 3 ml. V průběhu chromatografie bylo spektrofotometricky měřeno množství bílkovin ve frakcích při vlnové délce = 280 nm. Eluce tímto puftrem byla ukončena, když změna absorbance při 280 nm klesla pod hodnotu 0.1.

Pufir s ionty byl vyměněn za pufir obsahující vytěšňovací látku (0.02 M Tris-HCl pufr pH 7.0 obsahující 0.5 M NaCl a 0.2 M methyl-  $\alpha$ -D-glukosid). Z kolony se začala eluovat zachycená frakce, která byla jímána do odměrných zkumavek po 2 ml. V průběhu eluce

bylo opět spektrofotometricky měřeno množství bílkovin ve frakcích při 280 nm, dokud absorbance neklesla pod hodnotu 0.1.

Po ukončení chromatografie byla kolona regenerována regeneračními pufrů I a II. Nejprve byla kolona regenerována pufrů I (0.1 M octan sodný pH 4.5 obsahující 0.5 M NaCl) a to trojnásobným objemem kolony. Poté byla kolona promývána regeneračním pufrů II (0.02 M Tris-HCl pH 7.8 obsahující 0.5 M NaCl) trojnásobným objemem kolony. Tyto 2 kroky byly dvakrát opakovány. Nakonec byla kolona ekvilibrována 0.02 M Tris-HCl pufrů pH 7.0 obsahujícím 0.5 M NaCl a poté 0.02 M Tris-HCl pufrů pH 7.0 obsahujícím 0.5 M NaCl, 1.0 mM MnCl<sub>2</sub> a 1.0 mM ZnCl<sub>2</sub>. Takto byla kolona připravena na další chromatografii.

Ve frakcích, které měly vysokou absorbanci při 280 nm, byla měřena aktivita  $\beta$ -glukosidasy dle 2.5.3.1.

### **2.5.2.2. Izolace $\beta$ -glukosidasy - postup B**

$\beta$ -glukosidasa byla kromě výše uvedeného postupu (A) izolována i dalším způsobem, dále označovaným postup B. Extrakce 0.1 M fosfátovým pufrů pH 7.0 (2.5.2.1.1.) a srážení síranem amonným (2.5.2.1.2.) byly provedeny stejně jako u postupu A, avšak následná dialýza byla provedena v jiném dialyzačním pufrů (0.1 M citrátový pufr pH 6.0), než v 2.5.2.1.3. Stejně tak afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy byla provedena s 0.02 M citrátovým pufrů pH 6.0 s obsahem 0.5 M NaCl. Ostatní složky zůstaly stejné jako v kapitole 2.5.2.1.4.

#### **2.5.2.2.1. Chromatografie na koloně Sepharosy 4 B**

Chromatografií na koloně Sepharosy 4B byl odstraněn buď síran amonný po precipitaci, nebo methyl- $\alpha$ -D-glukosid po afinitní chromatografii. Roztok enzymu získaný po afinitní chromatografii na ConA-Sepharosa, nebo v síranové frakci byl nanesen na kolonu (8.5 x 1.0 cm) naplněnou Sepharosou 4 B. Elučním pufrů byl 0.1 M citrátový pufr

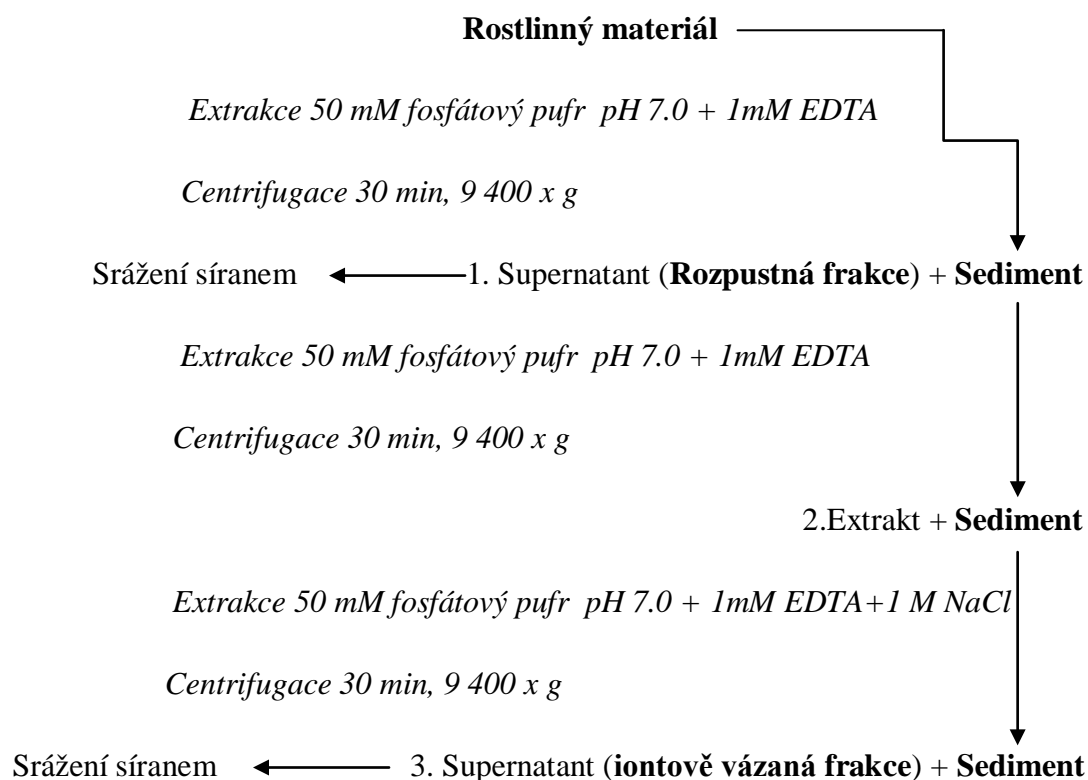
pH 6.0. Eluát byl jímán do kalibrovaných zkumavek po 1 ml. V průběhu chromatografie byl spektrofotometricky sledován obsah bílkovin měřením absorbance při 280 nm. Ve frakcích s nejvyšší absorbancí byla stanovena aktivita  $\beta$ -glukosidasy dle 2.5.3.1.

### **2.5.2.3. Izolace $\beta$ -glukosidasy - postup C**

Třetí variantou izolace  $\beta$ -glukosidasy byl izolační postup, dále značený jako postup C, který se lišil v extrakci, a který byl použit pro oddělení rozpustné a iontově vázané formy  $\beta$ -glukosidasy.

#### **2.5.2.3.1. Extrakce 50 mM fosfátovým pufrem pH 7.0**

Přibližně 25 g čerstvých, nebo zmražených listů tabáku bylo homogenizováno v třecí misce s trojnásobným množstvím 50 mM fosfátového pufru pH 7.0 s přidavkem 1.0 mM EDTA. Homogenát byl centrifugován 30 minut při 9 400 x g při 4 °C s přidavkem 30 mg PVP. V supernatantu, obsahujícím rozpustnou formu  $\beta$ -glukosidasy, byla stanovena aktivita  $\beta$ -glukosidasy se substrátem p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidem dle 2.5.3.1.. Sediment byl resuspendován ve stejném množství 50 mM fosfátového pufru pH 7.0 s přidavkem 1.0 mM EDTA jako v předchozím kroku. Vzorek byl centrifugován 30 minut při 9 400 x g při 4 °C. Tento v pořadí 2. supernatant byl oddělen od sedimentu a již se s ním dále nepracovalo. Sediment byl opět resuspendován ve stejném množství 50 mM fosfátového pufru pH 7.0 s přidavkem 1 mM EDTA a 1 M NaCl. Vzorek byl centrifugován 30 minut při 9 400 x g při 4 °C. Supernatant, obsahující iontově vázanou formu  $\beta$ -glukosidasy, byl oddělen od sedimentu a byla v něm stanovena aktivita tohoto enzymu se substrátem p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidem postupem dle 2.5.3.1. Schéma extrakce  $\beta$ -glukosidasy z rostlinného materiálu je ukázáno na obr. č. 11.



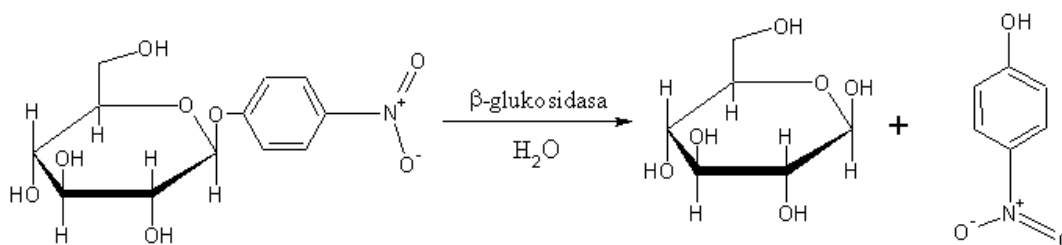
Obr. č. 11: Postup extrakce rozpustné a iontově vázané  $\beta$ -glukosidasy z rostlinného materiálu. Extrakty 1 a 3 byly použity pro následnou purifikaci.

Srážení síranem amonným rozpustné i iontově vázané formy  $\beta$ -glukosidasy v intervalu 20 – 75 % nasycení bylo provedeno stejným způsobem jako v postupu A (2.5.2.1.2). Sedimenty po srážení síranem amonným byly resuspendovány v 0.1 M fosfátovém pufru pH 7.0 a dialyzovány stejným způsobem jako v postupu B (2.5.2.1.3), avšak s odlišným dialyzačním pufr: 0.02 M citrátový pufr pH 6.0. Dialyzáty byly kvantitativně aplikovány na nosič ConA-Sepharosy a separovány podle postupu popsáným v kapitole 2.5.2.1.4 s tím rozdílem, že namísto 0.02 M Tris-HCl pufru pH 7.0 byl použit 0.02 M citrátový pufr pH 6.0. Ostatní složky zůstaly stejné.

### 2.5.3. Stanovení aktivity $\beta$ -glukosidasy využívající p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosid jako substrát

#### 2.5.3.1. Stanovení aktivity $\beta$ -glukosidasy – metoda End-point

Ke stanovení aktivity  $\beta$ -glukosidasy byla použita metoda využívající umělý substrát p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosid, který je tímto enzymem štěpen na  $\beta$ -glukosu a p-nitrofenol, který v alkalickém prostředí poskytuje žluté zbarvení, které je možné spektrofotometricky měřit při 405 nm. Rovnice reakce je ukázána na obrázku č. 12.



Obr. č. 12: Štěpení p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidu  $\beta$ -glukosidasou.

Reakce byla provedena v mikrozkušavkách. Reakční směs obsahovala ~~50~~ 0.1 M citrátového pufru pH 3.5, 50  $\mu$ l 20 mM substrátu a reakce byla iniciována 100  $\mu$ l roztoku enzymu. Reakce probíhala přesně 30 minut a poté byla ukončena přidáním 800  $\mu$ l 0.1 M borátového pufru pH 9.0. Výsledná změna absorbance žlutého zbarvení byla spektrofotometricky měřena při 405 nm oproti slepému pokusu, který se lišil tím, že enzymový preparát byl přidán do reakční směsi již obsahující 800  $\mu$ l borátového pufru. Absorbance byla měřena v kyvetách o délce 1 cm.

Výpočet aktivity enzymu byl proveden dle rovnice (1).

$$a = 1000 \cdot \frac{A_{405} \cdot V_t}{\epsilon \cdot l \cdot V_e \cdot t}, \quad (1)$$

kde  $a$  je aktivita enzymu (v jednotkách  $\mu$ mol.  $\text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),  $A_{405}$  je rozdíl absorbance reakční směsi proti slepému pokusu při 405 nm,  $V_t$  je celkový objem reakční směsi (v ml),  $V_e$  je objem roztoku enzymu v reakční směsi (v ml),  $t$  je čas, po který probíhala reakce (v minutách),  $l$  je délka kyvety (v cm) a  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient ( $\epsilon_{\text{p-NP-}\beta\text{-D-glukopyranosid}} = 1.8 \times 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### **2.5.3.2. Stanovení pH optima**

pH optimum bylo stanoveno v prostředí Mc Ilvainova pufru o různém pH a aktivita  $\beta$ -glukosidasy byla stanovena dle 2.5.3.1. Mc Ilvainův pufr obsahoval 0.1 M kyselinu citronovou a 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Byla připravena řada pufrů od pH 3.0 do pH 7.5 s kroky po 0.5 jednotek pH. Celkem tedy 10 reakčních směsí o příslušném pH.

### **2.5.3.3. Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu**

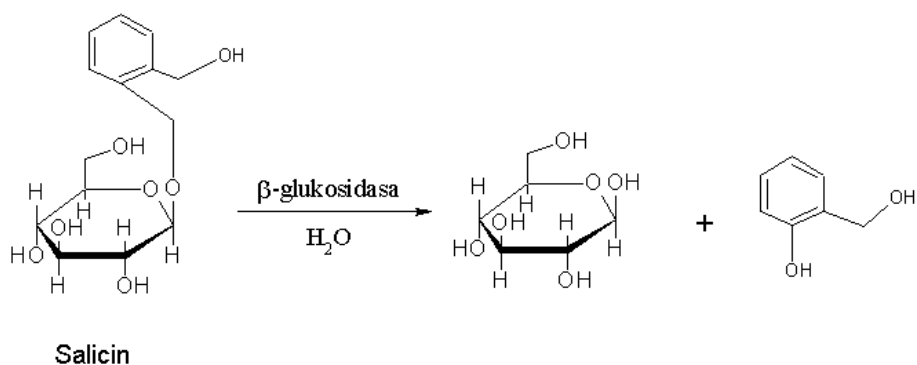
Byla měřena rychlost enzymové reakce  $\beta$ -glukosidasy v závislosti na různé koncentraci substrátu. Bylo připraveno 8 reakčních směsí s koncentracemi substrátu od 1.0 mM do 8.0 mM. Reakční směs byla doplněna na objem 200  $\mu\text{l}$  přidáním 0.1 M citrátového pufru pH 3.5. Reakce probíhala dle 2.5.3.1.

### **2.5.3.4. Závislost rychlosti enzymové reakce na teplotě**

Byla měřena rychlost enzymové reakce  $\beta$ -glukosidasy v závislosti na teplotě reakční směsi. Aktivita  $\beta$ -glukosidasy byla měřena dle 2.5.3.1. pouze s tím rozdílem, že doba inkubace byla 20 minut. Aktivita byla měřena v teplotním rozsahu od 25 °C do 75 °C po 5 °C. Celkem bylo připraveno 11 reakčních směsí. Teplota byla udržována termostatem.

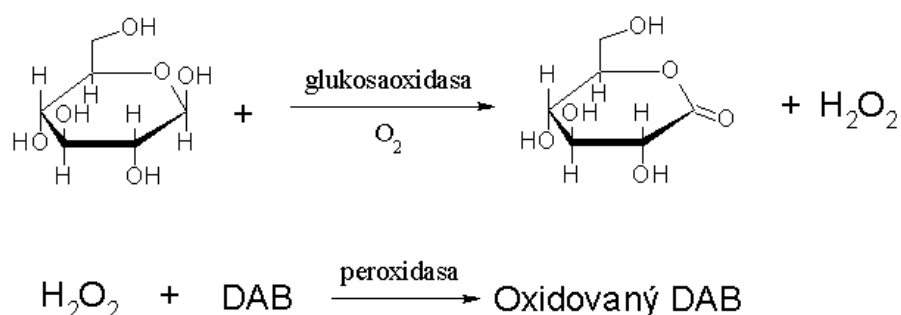
### **2.5.4. Stanovení aktivity $\beta$ -glukosidasy využívající spřaženou reakci**

Jako potencionální substráty pro  $\beta$ -glukosidasu byly dále zkoušeny salicin a methylglukosid. Pro toto stanovení byla použita spřažená reakce, jelikož ani salicin ani methylglukosid neposkytují barevný produkt, který by mohl být přímo měřen.



Obr. č. 13: Rovnice reakce hydrolytického štěpení salicinu  $\beta$ -glukosidasou.

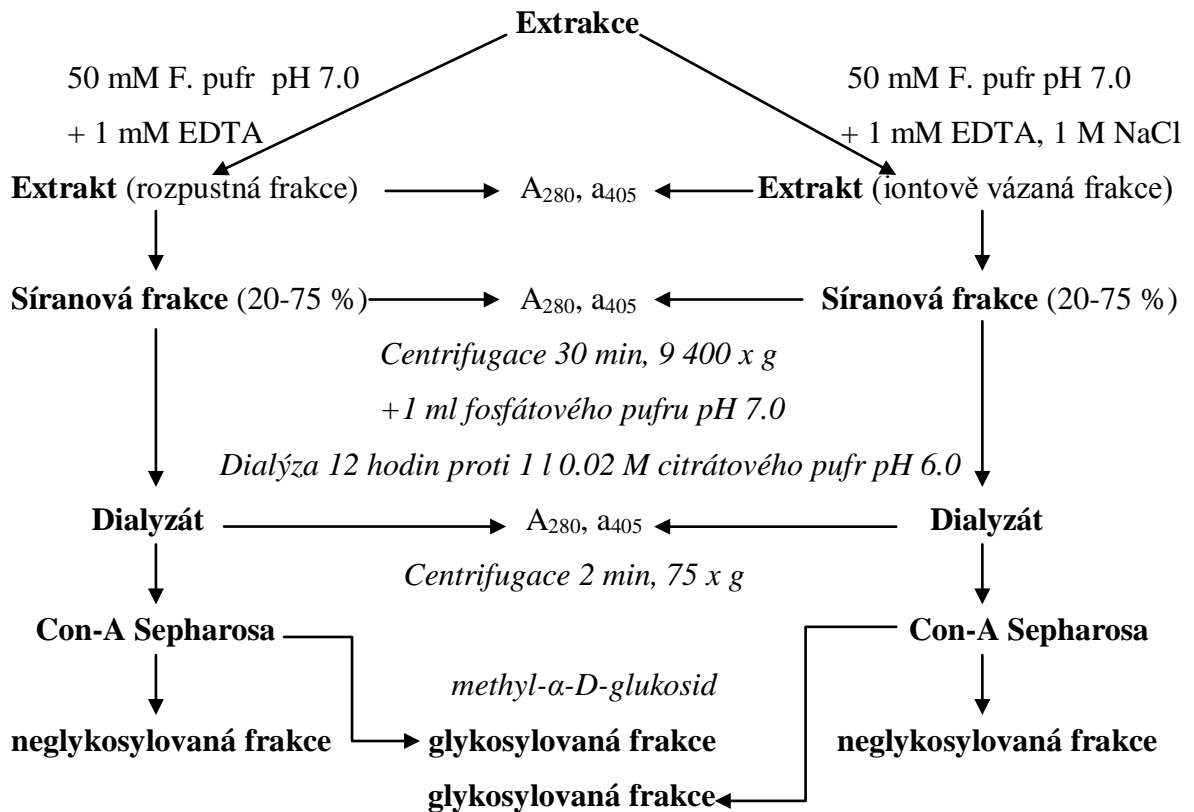
Oba tyto substráty jsou  $\beta$ -glukosidasou přeměněny na  $\beta$ -glukosu, která může být využita spřaženou reakcí. Glukosaoxidasa (EC 1.1.3.4) oxiduje  $\beta$ -glukosu na příslušný keton za vzniku peroxidu vodíku. Křenová peroxidasa (EC 1.11.1.7) oxiduje diaminobenzidin (DAB) peroxidem vodíku za vzniku oxidované formy DAB, který je pak již možné spektrofotometricky měřit při 465 nm.



Obr. č. 14: Rovnice spřažené reakce umožňující zkoumat množství glukosy. Glukosa je glukosaoxidasa přeměněna na keton za vzniku peroxidu vodíku. Peroxid vodíku je pak následnou reakcí substrátem pro křenovou peroxidasu společně s DAB (diaminobenzidin). Peroxidasa oxiduje DAB na barevný produkt, který je možné spektrofotometricky stanovovat při 465 nm.

Reakční směs se skládala ze 450  $\mu\text{l}$  0.1 M citrátového pufru pH 6.0, 100  $\mu\text{l}$  roztoku D-salicinu o výsledné koncentraci 1.0 mM v reakční směsi (0.0029 g/ml destilované vody), 250  $\mu\text{l}$  roztoku obsahujícího GOD (250  $\mu\text{g/ml}$ ), HRP (50  $\mu\text{g/ml}$ ), DAB (2 mg/ml) a reakce byla iniciována 100  $\mu\text{l}$  enzymového preparátu. Enzymová aktivita, přímo úměrná množství vznikajícího oxidovaného DAB, byla stanovována kineticky po dobu 5 minut ve 20 sekundových intervalech na spektrofotometru při vlnové délce 465 nm.

## 2.5.6. Schéma pracovního plánu



Obr. č. 15: Schéma znázorňuje jednotlivé kroky v purifikaci enzymu a následnou práci a měření aktivity s jednotlivými frakcemi. Symboly  $a_{405}$ , respektive  $A_{280}$  znamenají, že po těchto separačních krocích byla měřena spektrofotometricky aktivita  $\beta$ -glukosidasy ( $A_{405}$ ), respektive obsah bílkovin ( $A_{280}$ ). Pro jednoduchost je zachycená frakce zapsána stejně jak pro rozpustnou frakci, tak pro iontově vázanou frakci  $\beta$ -glukosidasy.

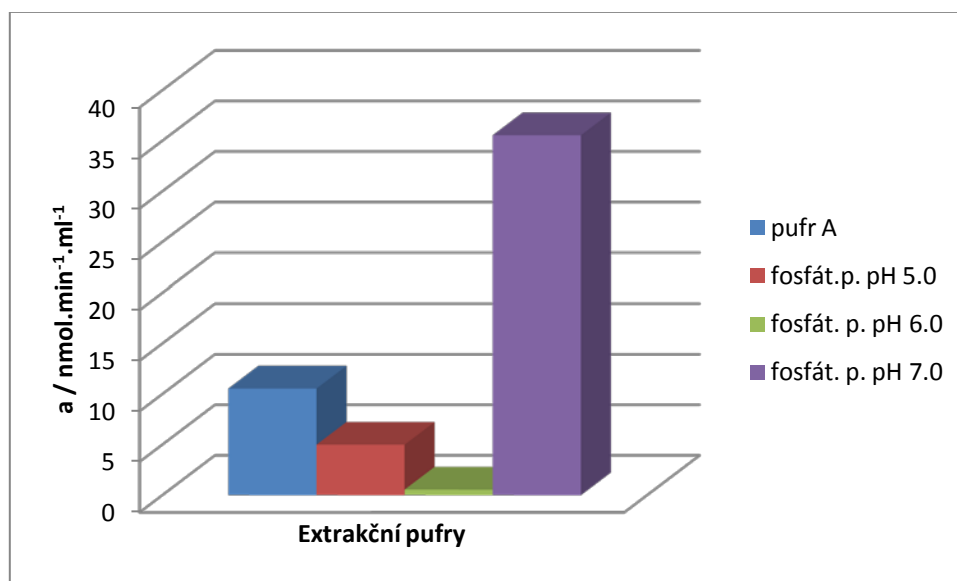


### 3. Výsledky

#### 3.1. Extrakce $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku

##### 3.1.1. Optimalizace extrakčních podmínek

Byly zkoušeny různé pufrы pro extrakci  $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku. Pro pokus byly připraveny 4 pufrы: pufr A (0.1 M Tris-HCl pH 7.8 + 1.0 mM DTT + 1.0 mM EDTA + 5.0 mM MnCl<sub>2</sub> + 5 % (v / v) glycerol), 0.1 M fosfátový pufr pH 5.0, 6.0 a 7.0. Nejlepším extrakčním pufrém se ukázal být 0.1 M fosfátový pufr pH 7.0, ve kterém byla aktivita  $\beta$ -glukosidasy, měřená dle 2.5.3.1., největší, viz obrázek č. 16.

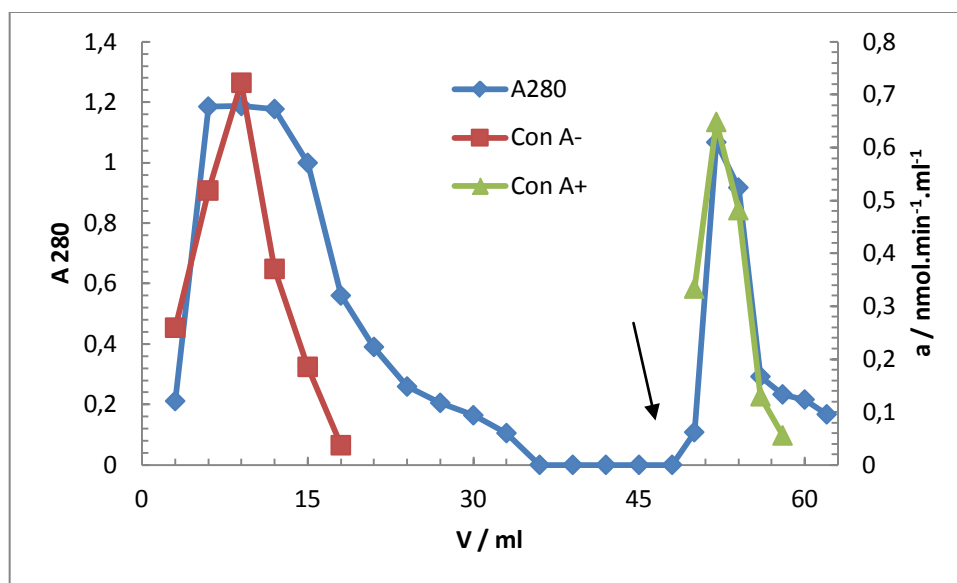


Obr. č. 16: Aktivita  $\beta$ -glukosidasy v listech tabáku, za použití různých extrakčních pufrů, měřená se substrátem p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidem.

## 3.2. Částečná purifikace $\beta$ -glukosidasy

### 3.2.1. Izolace $\beta$ -glukosidasy postupem A

Nejprve byla provedena extrakce z rostlinného materiálu 0.1 M fosfátovým pufrům pH 7.0. Dále byl extrakt frakčně srážen síranem amonným (20 - 75 % nasycení). Tento roztok byl dialyzován přes noc proti 1 l 0.02 M Tris-HCl pufru pH 7.0. Roztok  $\beta$ -glukosidasy byl pomocí afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy, v prostředí Tris-HCl pufru pH 7.0, rozdělen na glykosylovanou a neglykosylovanou formu  $\beta$ -glukosidasy. Na obrázku č. 17 je zachycen průběh chromatografie. Barevně je vyznačeno množství bílkovin (modrá), jako změna absorbance měřená při 280 nm, aktivita neglykosylované  $\beta$ -glukosidasy (červená) a aktivita glykosylované  $\beta$ -glukosidasy (zelená).



Obrázek č. 17: Separace  $\beta$ -glukosidasy na koloně ConA-Sepharosy v prostředí 0,02 M Tris-HCl pufru pH 7.0. Na obrázku je zachyceno množství bílkovin (uvedené jako absorbance při 280 nm, modrá křivka) a aktivita  $\beta$ -glukosidasy (neglykosylovaná forma - červená křivka, glykosylovaná forma - zelená křivka) v jednotlivých frakcích. Šipka označuje použití pufru s methyl- $\alpha$ -D-glukosidem.

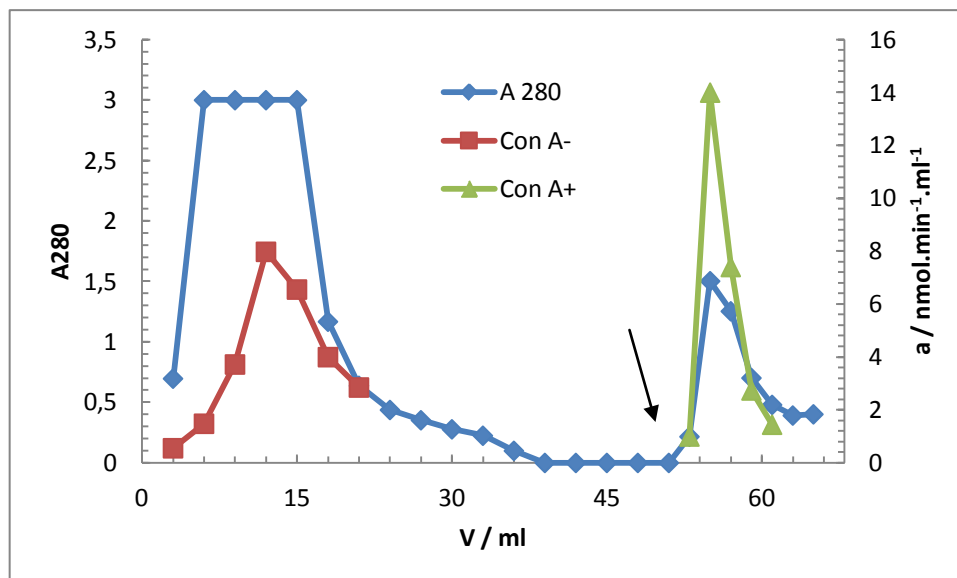
Celkové aktivity  $\beta$ -glukosidasy po jednotlivých separačních krocích postupu A jsou uvedeny v tabulce č. 1. V tabulce je afinitní chromatografie rozdělena na neglykosylovanou a glykosylovanou část. Aktivita byla měřena dle 2.5.3.1..

Tabulka č. 1: Celková aktivita  $\beta$ -glukosidasy po jednotlivých separačních krocích postupu A. Jako substrát byl použit p-NP- $\beta$ -D-glukosid. Extrakce byla provedena 0.1 M fosfátovým pufrům pH 7.0. Dialýza byla provedena proti 1 l 0.02 M Tris-HCl pufru pH 7.0 přes noc a afinitní chromatografie v prostředí Tris-HCl pufru pH 7.0. Symbol (-) značí nezachycenou (neglykosylovanou) formu a (+) značí zachycenou (glykosylovanou) formu enzymu.

Metoda	V / ml	a / nmol.min <sup>-1</sup>
Extrakce	82.0	119.96
Síranová frakce	2.6	86.18
Dialyzát	4.4	14.66
ConA (-)	9.0	4.82
ConA (+)	6.0	2.51

### 3.2.2. Izolace $\beta$ -glukosidasy postupem B

V předchozím postupu A došlo k velkým ztrátám aktivity  $\beta$ -glukosidasy v průběhu dialýzy. V postupu B byl tedy změněn pufr, proti kterému byla síranová frakce  $\beta$ -glukosidasy dialyzována. Místo 0,02 M Tris-HCl pufru pH 7.0 byl použit 0,02 M citrátový pufr pH 6.0. V tomto pufru byla rovněž provedena afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy, na které byla oddělena glykosylovaná a neglykosylovaná forma  $\beta$ -glukosidasy. Na obrázku č. 18 je zachycen průběh chromatografie. Barevně je vyznačeno množství bílkovin (modrá), jako změna absorbance při 280 nm, aktivita neglykosylované  $\beta$ -glukosidasy (červená) a aktivita glykosylované  $\beta$ -glukosidasy (zelená).



Obrázek č. 18: Separace  $\beta$ -glukosidasy na koloně ConA-Sepharosy v prostředí 0,02 M citrátového pufru pH 6.0. Na obrázku je zachyceno množství bílkovin (uvedené jako absorbance při 280 nm, modrá křivka) a aktivita  $\beta$ -glukosidasy (neglykosylovaná forma - červená křivka, glykosylovaná forma - zelená křivka) v jednotlivých frakcích. Šipka označuje použití pufru s methyl- $\alpha$ -D-glukosidem.

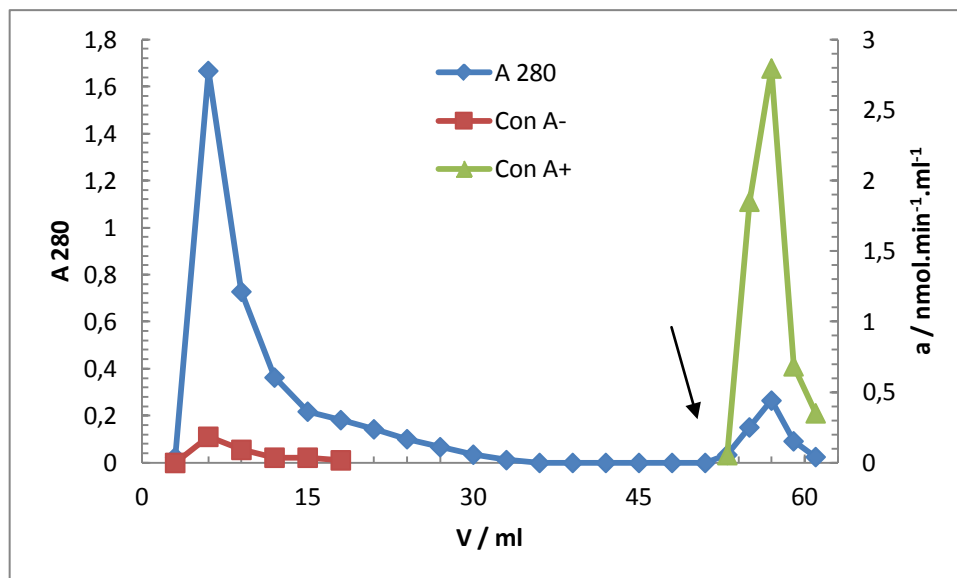
Celková aktivita po jednotlivých separačních krocích postupem B je uvedena v tabulce č. 2. V tabulce je afinitní chromatografie rozdělena na neglykosylovanou a glykosylovanou část. Methyl- $\alpha$ -D-glukosid, přítomný v glykosylované formě  $\beta$ -glukosidasy, byl odstraněn chromatografií na koloně Sepharosy 4B. Aktivita byla měřena dle 2.5.3.1.

Tabulka č. 2: Celková aktivita  $\beta$ -glukosidasy po jednotlivých separačních krocích. Substrátem byl p-NP- $\beta$ -D-glukosid. Extrakce byla provedena 0.1 M fosfátovým pufrém pH 7.0. Dialýza byla provedena proti 1 l 0.02 M citrátového pufru pH 6.0 přes noc a afinitní chromatografie v prostředí citrátového pufru pH 6.0. Symbol (-) značí nezachycenou (neglykosylovanou) formu a (+) značí zachycenou (glykosylovanou) formu enzymu. Chromatografie rozpustné glykosylované formy enzymu na koloně Sepharosy 4B byla prováděna v prostředí 0.02 M citrátového pufru pH 6.0.

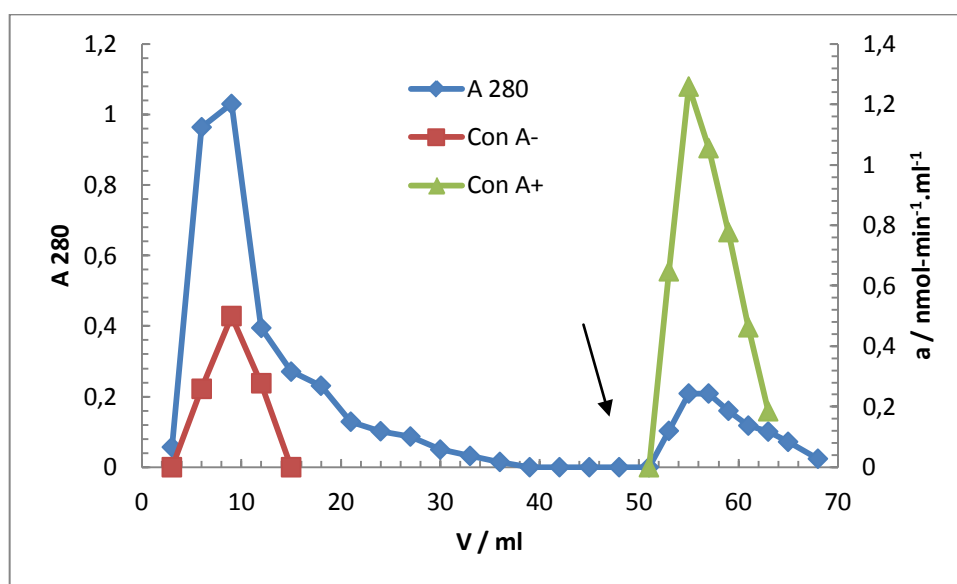
Metoda	V / ml	a / nmol.min <sup>-1</sup>
Extrakce	81.5	176.58
Síranová frakce	4.0	178.51
Dialýza	7.7	151.14
ConA (-)	15.0	71.22
ConA (+)	8.0	25.60
Sepharosa 4B (+)	3.0	27.64

### 3.2.3. Izolace $\beta$ -glukosidasy postupem C

V tomto postupu byl použit extrakční pufr o nižší iontové síle než v předchozích postupech (50 mM citrátový pufr pH 6.0). Po oddělení supernatantu a sedimentu centrifugací byl sediment po promytí extrahován pufrém o vyšší iontové síle (50 mM fosfátovým pufrém pH 7.0 + 1.0 M NaCl) a byla získána další forma  $\beta$ -glukosidasy přítomná v listech tabáku, tzv. iontově vázaná. Obě formy  $\beta$ -glukosidasy, tedy rozpustná i vázaná, byly separovány na koloně ConA-Sepharosy na glykosylovanou a neglykosylovanou část. Obr. č. 19 dokumentuje průběh afinitní chromatografie rozpustné glykosylované a neglykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy. Obr. č. 20 ukazuje průběh chromatografie iontově vázané glykosylované a neglykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy. Celková aktivita  $\beta$ -glukosidasy v průběhu separace postupem C je v tabulce č. 3.



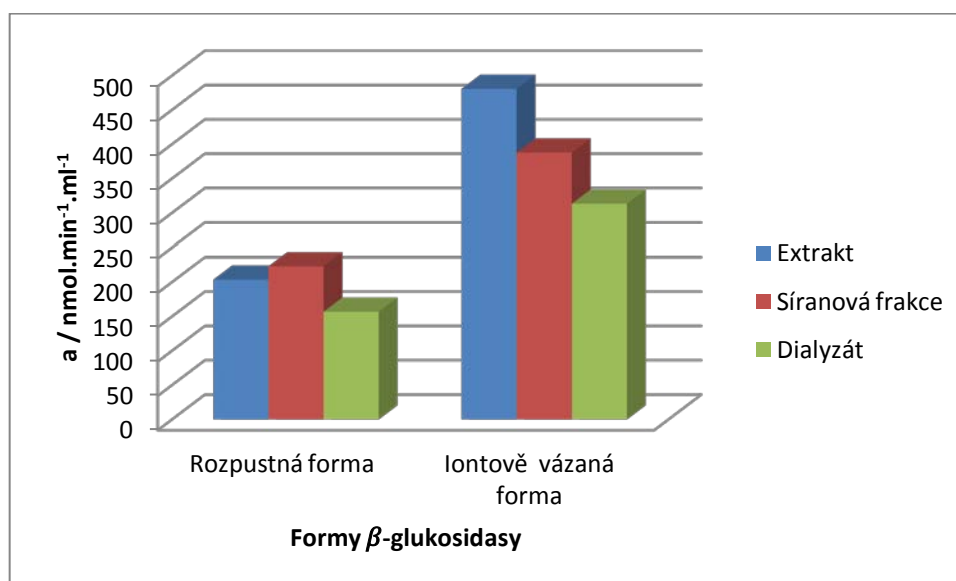
Obrázek č. 19: Separace rozpustné formy  $\beta$ -glukosidasy na koloně ConA-Sepharosy v prostředí 0.02 M citrátového pufru pH 6.0. Na obrázku je zachyceno množství bílkovin (uvedené jako absorbance při 280 nm, modrá křivka) a aktivita  $\beta$ -glukosidasy (neglykosylovaná forma - červená křivka, glykosylovaná forma - zelená křivka) v jednotlivých frakcích. Šipka označuje použití pufru s methyl- $\alpha$ -D-glukosidem.



Obrázek č. 20: Separace iontově vázané formy  $\beta$ -glukosidasy na koloně ConA-Sepharosy v prostředí citrátového pufru pH 6.0. Na obrázku je zachyceno množství bílkovin (uvedené jako změna absorbance při 280 nm, modrá křivka) a aktivita  $\beta$ -glukosidasy (neglykosylovaná forma - červená křivka, glykosylovaná forma - zelená křivka) v jednotlivých frakcích. Šipka označuje použití pufru s methyl- $\alpha$ -D-glukosidem.

Tabulka č. 3: Celková aktivita  $\beta$ -glukosidasy v roztocích po jednotlivých separačních krocích. Substrátem byl p-NP- $\beta$ -D-glukosid. Extrakce byla provedena 50 mM fosfátovým pufrém pH 7.0 (rozpuštná forma) a 50 mM fosfátovým pufrém pH 7.0 + 1.0 M NaCl (iontově vázaná forma). Dialýza byla provedena proti 1 l 0.02 M citrátového pufru pH 6.0 přes noc a afinitní chromatografie v prostředí 0.02 M citrátového pufru pH 6.0. Symbol (-) značí nezachycenou (neglykosylovanou) formu a (+) značí zachycenou (glykosylovanou) formu enzymu.

Metoda	Rozpuštná		Iontově vázaná	
	V / ml	a / nmol.min <sup>-1</sup>	V / ml	a / nmol.min <sup>-1</sup>
Extrakce	94.0	203.66	88.0	480.74
Síranová frakce	2.5	223.14	2.5	387.96
Dialýza	4.0	157.03	3.2	313.48
ConA (-)	9.0	16.44	9.0	3.42
ConA (+)	10.0	45.92	6.0	14.01

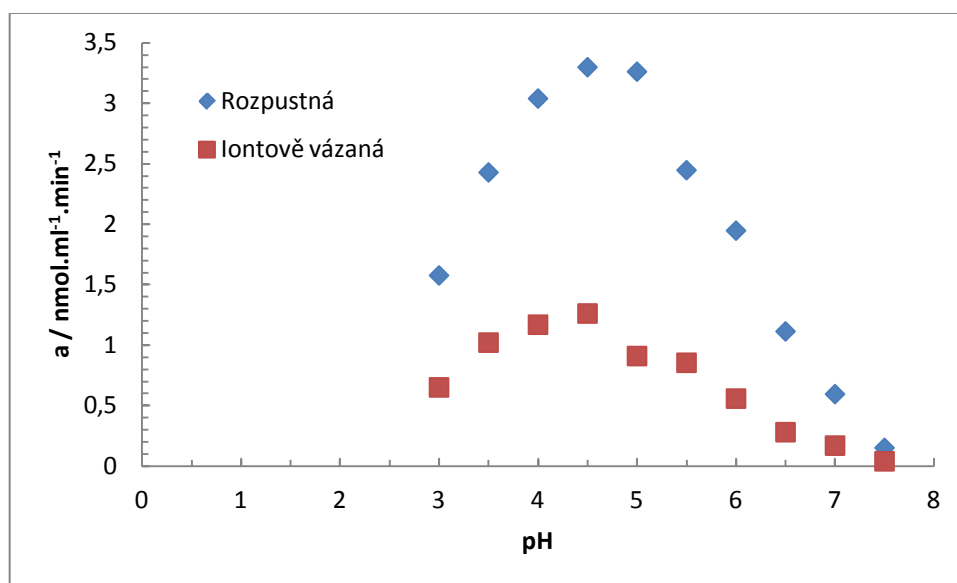


Obr. č. 21: Srovnání celkové aktivity  $\beta$ -glukosidasy po prvních 3 separačních krocích mezi rozpuštnou formou (vlevo) a iontově vázanou formou (vpravo). Měřeno metodou dle 2.5.3.1. Extrakce (modrá barva) se prováděla 50 mM fosfátovým pufrém pH 7.0. Srážení síranem amonným (červená barva) bylo do 75 % nasycení. Dialýza (zelená barva) byla prováděna proti 1 l 0.02 M citrátového pufru pH 6.0 přes noc.

### 3.3. Charakterizace $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku

#### 3.3.1. Určení pH optima

Byla zkoumána závislost aktivity enzymu rozpustné glykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy a iontově vázané glykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy na hodnotě pH reakčního prostředí. Rozmezí hodnot pH bylo od 3.0 do 7.5. pH optimum rozpustné glykosylované i iontově vázané formy  $\beta$ -glukosidasy bylo shodně určeno na hodnotu 4.5. Na obrázku č. 22 je závislost aktivity rozpustné glykosylované formy a iontově vázané glykosylované formy enzymu na pH reakčního prostředí.

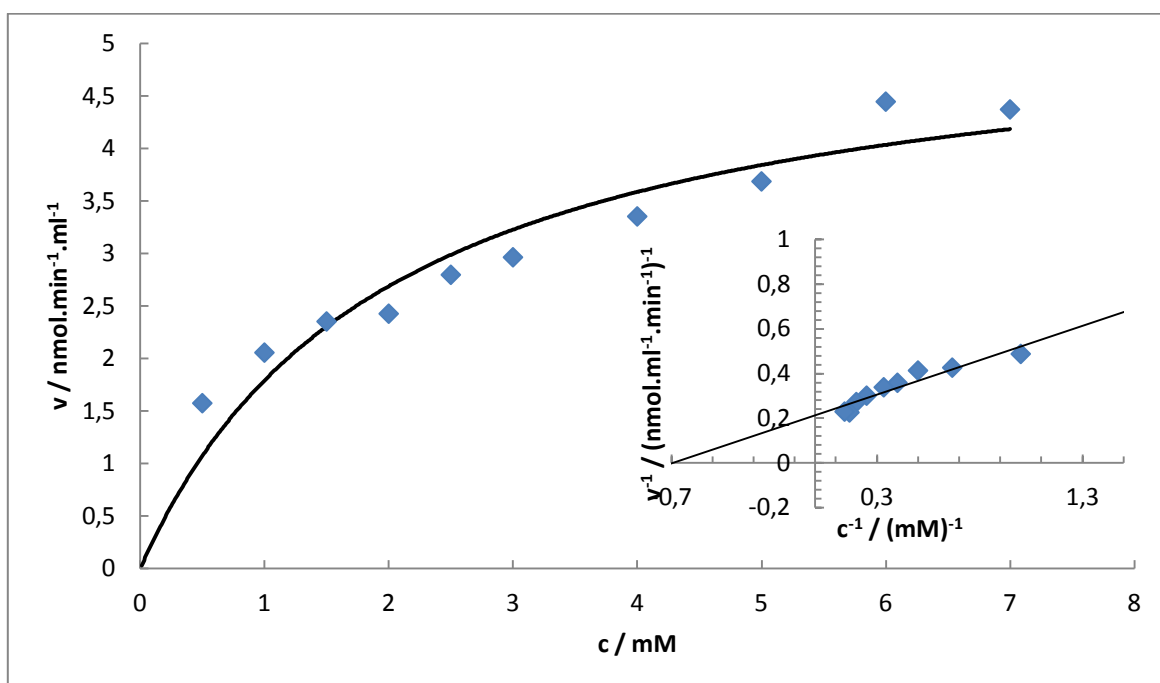


Obr. č. 22: pH optimum rozpustné glykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy a iontově vázané glykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy. Stanovení bylo provedeno se substrátem p-NP- $\beta$ -D-glukosidem.

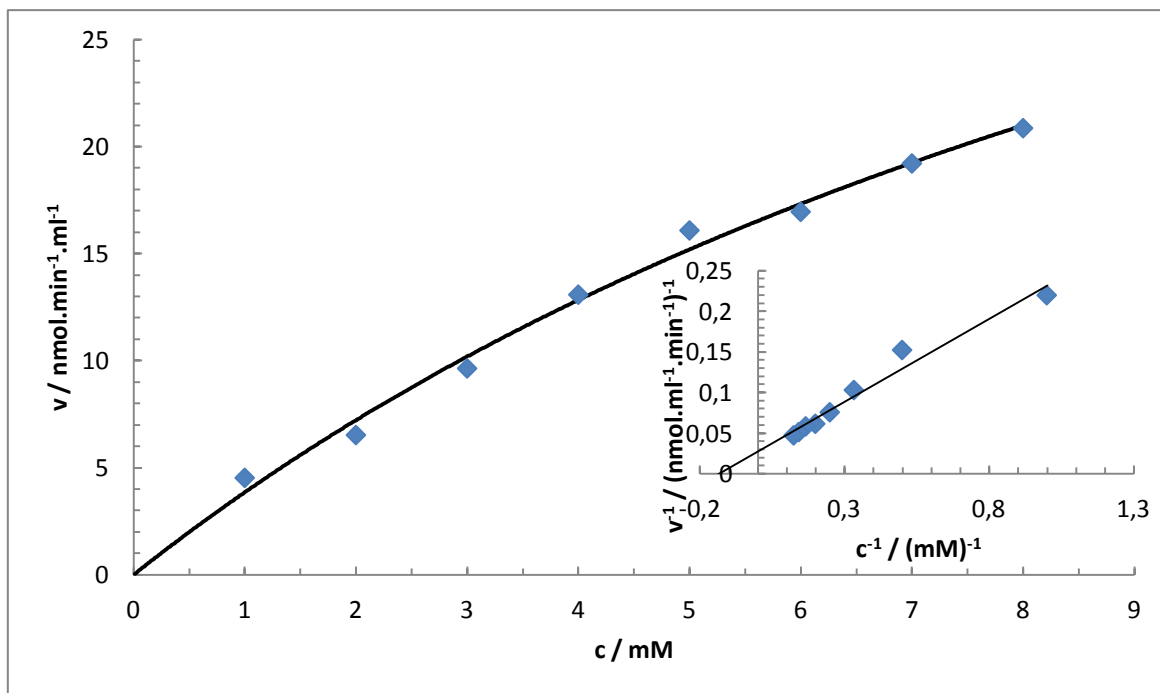


### 3.3.3. Závislost reakční rychlosti enzymu na koncentraci substrátu p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidu

Byla sledována rychlost reakce rozpustné glykosylované a neglykosylované formy enzymu v závislosti na koncentraci substrátu p-NP-  $\beta$ -D-glukosidu. Na obrázku č. 23 je zobrazena závislost rychlosti reakce rozpustné glykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy na koncentraci substrátu p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidu a na obr. č. 24 je uvedena stejná závislost pro neglykosylovanou formu enzymu. Hodnota  $K_m$  pro p-NP-  $\beta$ -D-glukosid je pro glykosylovanou formu  $2.0 \times 10^{-3}$  M, a pro neglykosylovanou formu  $13.9 \times 10^{-3}$  M.



Obr. č. 23: Závislost rychlosti reakce katalyzované rozpustnou glykosylovanou formou enzymu na koncentraci substrátu pro p-NP- $\beta$ -D-glukosidu. Uvnitř grafu je pak obrázek zobrazující reciproké vynesení (dle Lineweavera a Burka) rychlosti enzymové reakce v závislosti na koncentraci substrátu glykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy. Hodnota  $K_m$  je rovna  $2,0 \times 10^{-3}$  M a  $V_{lim}$  je rovna  $5,4 \text{ nmol.min}^{-1}.\text{ml}^{-1}$ .

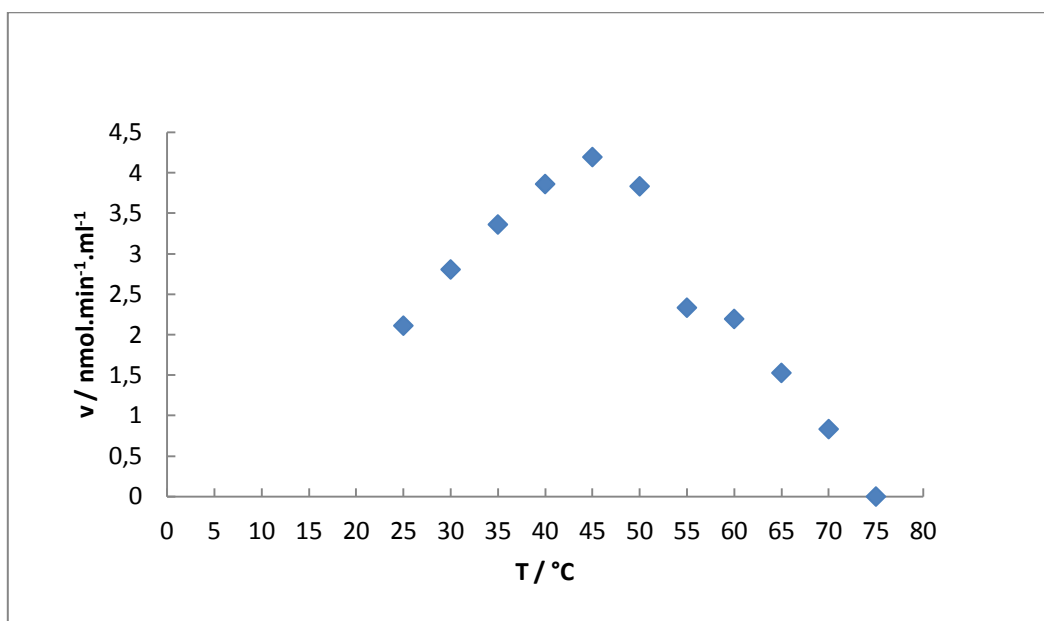


Obr. č. 24: Závislost rychlosti reakce katalyzované rozpustnou neglykosylovanou formou enzymu na koncentraci substrátu pro p-NP-  $\beta$ -D-glukosidu. Uvnitř grafu je obrázek zobrazující reciproké vynesení (dle Lineweavera a Burka) rychlosti enzymové reakce v závislosti na koncentraci substrátu p-NP- $\beta$ -D-glukosidu neglykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy. Hodnota  $K_m$  je rovna  $13,9 \times 10^{-3}$  M a  $V_{lim}$  je rovna  $57,6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

### 3.3.4. Závislost reakční rychlosti na teplotě rozpustné glykosylované formy $\beta$ -glukosidasy

Byla stanovována závislost rychlosti reakce rozpustné glykosylované formy enzymu na teplotě reakčního prostředí. Teplota byla udržována termostatem. Teplotní závislost byla měřena pro hodnoty od 25 °C do 75 °C po 5°C krocích. Enzymová reakce probíhala vždy 20 minut pro každou teplotu.

Závislost rychlosti enzymové reakce na teplotě je ukázána na obrázku č. 25. Rozpustná glykosylovaná forma  $\beta$ -glukosidasy vykazovala teplotní optimum při hodnotě 45 °C.



Obr. č. 25: Závislost rychlosti enzymové reakce na teplotě reakčního prostředí pro rozpustnou glykosylovanou formu  $\beta$ -glukosidasy.

## 4. Diskuze

$\beta$ -glukosidasa se vyskytuje ve všech organismech včetně rostlin, kde plní řadu důležitých funkcí. Vedle metabolismu polysacharidů a oligosacharidů  $\beta$ -glukosidasa štěpí glykosidovou vazbu v glukosidech, které řídí mnoho důležitých procesů souvisejících s růstem, vývojem a reakcí rostlin na okolní prostředí.

V rostlinách tabáku již byla charakterizována neglykosylovaná rozpustná forma  $\beta$ -glukosidasy (diplomová práce Blanky Holakovské<sup>34</sup>). Jednalo se pravděpodobně o cytosolovou izoformu. Bylo zjištěno, že tato  $\beta$ -glukosidasa má pH optimum 3.5; vedle chromogenního substrátu obvykle používaného pro stanovení aktivity p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidu, štěpí také další substráty: methyl- $\beta$ -D-glukosid, fenylo- $\beta$ -D-glukosid, p-nitrofenyl- $\beta$ -D-cellobiosid, 4-methylumbelliferylo- $\beta$ -D-cellobiosid, 4-methylumbelliferylo- $\beta$ -D-glukosid, cellobiosu a salicin<sup>34</sup>. Tyto substráty byly štěpeny v ššy rychlostí, rovněž afinita en ymu k těmto substrátům byla vyšší než k p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosidu.

V této práci byla optimalizována částečná purifikace  $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku. V pracovním postupu A byly velké ztráty aktivity  $\beta$ -glukosidasy při dialýze proti 0,02 M Tris-HCl pufru pH 7.0, ve kterém následně probíhala afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy (Tab. č. 1). V postupu B byl úspěšně použit pro dialýzu 0,02 M citrátový pufr pH 6.0, ve kterém rovněž probíhala následná chromatografie (Tab. č. 2). Vzhledem k popsané metodě izolace iontově vázané  $\beta$ -fruktosidasy z buněčné stěny (diplomová práce Kateřiny Kloudové<sup>35</sup>) byla vyzkoušena tato izolace také pro  $\beta$ -glukosidasu v postupu označeném jako C. Pro extrakci byla zvolena nižší iontová síla (50 mM fosfátový pufr pH 7.0), interval precipitace síranem amonným byl ponechán velmi široký (20 – 75 % nasycení). Tímto postupem byla získána rozpustná forma  $\beta$ -glukosidasy, která byla následně dělena na glykosylovanou a neglykosylovanou formu. Sediment získaný po extrakci byl dále zpracován. Sediment byl extrahován roztokem o vysoké iontové síle (50 mM fosfátový pufr pH 7.0 s obsahem 1 M NaCl). Tímto postupem byla získána iontově vázaná  $\beta$ -glukosidasa, která byla dále purifikována precipitací síranem amonným, dialyzována a separována na koloně ConA-Sepharosy (Tab. č. 3.).

Rozpustná glykosylovaná forma  $\beta$ -glukosidasy se pravděpodobně nachází uvnitř buňky ve vakuole, kde je přítomna i řada dalších glykosidas a proteas. Iontově vázaná  $\beta$ -glukosidasa se pravděpodobně nachází v buněčné stěně, kde se může účastnit metabolismu polysacharidů buněčné stěny; může hydrolyzovat koncovou molekulu glukosy z kratších řetězců celulosy,  $\beta$ -glukanu, nebo části řetězců hemicelulos.

V této práci bylo zjištěno, že pH optimum glykosylované vakuolární  $\beta$ -glukosidasy a iontově vázané extracelulární  $\beta$ -glukosidasy je shodné a to pH = 4.5, což je o jednotku pH vyšší než bylo zjištěno pro cytosolovou izoformu <sup>34</sup>. Teplotní optimum rozpustné (vakuolární) glykosylované  $\beta$ -glukosidasy bylo 45 °C.  $\beta$ -glukosidasa je přítomna jako izoenzym; pro dva bylo možné vypočítat  $K_m$  a  $V_{max}$  pro substrát p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosid.  $K_m$  rozpustné neglykosylované formy enzymu pro p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosid je  $13,9 \times 10^{-3}$  M a  $V_{lim}$  je rovna  $57,6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Pro tento substrát, který byl štěpen taktéž rozpustnou glykosylovanou formou enzymu, je hodnota  $K_m$  rovna  $2,0 \times 10^{-3}$  M a  $V_{lim}$  je rovna  $5,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Pro jednotlivé izoformy  $\beta$ -glukosidasy bude zajímavé zjistit kinetické parametry pro jednotlivé přirozené substráty.

## 5. Souhrn

Byla provedena optimalizace extrakčních podmínek  $\beta$ -glukosidasy z listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). Byla potvrzena vhodnost extrakčního 0.1 M fosfátového pufru pH 7.0.

Byly zkoumány účinky dialyzačních pufrů na stabilitu a aktivitu enzymu. Optimálním pufrům se ukázal být 0.02 M citrátový pufr pH 6.0.

Podářilo se separovat dvě izoformy  $\beta$ -glukosidasy, a to rozpustnou formu a iontově vázanou. Snížením iontové síly extrakčního pufru (50 mM fosfátový pufr pH 7.0) bylo dosaženo separace rozpustné glykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy od iontově vázané formy  $\beta$ -glukosidasy, která byla extrahována extrakčním pufrům o vyšší iontové síle (50 mM fosfátový pufr pH 7.0 s 1.0 M NaCl). Tyto izoformy byly dále separovány pomocí afinitní chromatografie na ConA-Sepharosy na glykosylovanou a neglykosylovanou formu.

Byly vypočteny hodnoty  $K_m$  a  $V_{max}$  rozpustné glykosylované a rozpustné neglykosylované formy  $\beta$ -glukosidasy pro substrát p-NP- $\beta$ -D-glukopyranosid. Bylo zjištěno shodné pH optimum pro rozpustnou glykosylovanou formu a iontově vázanou glykosylovanou formu.

Bylo zjištěno teplotní optimum pro rozpustnou glykosylovanou formu  $\beta$ -glukosidasy (45 °C).

## Citace

1. Czjzek M., Cicek M., Zamboni V., Bevan R. D., Henrissat B., Esen A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 13555–13560 (2000)
2. Rotrekl V.: Chem. Listy, **92**, 883-893 (1998)
3. Czjzek M., Cicek M., Zamboni V., Burmelster P. W., Bevan R. D., Henrissat B., Esen A.: Biochem. J., **354**, 37-46 (2001)
4. Hsieh M.-C., Graham L.T.: Phytochemistry, **58**, 995–1005 (2001)
5. Sue M., Ishihara A., Iwamura H.: Planta, **210**, 432-438 (2000)
6. Zhang P.-C., Zheng Q.-H., Hu L.-F.: J. Food Sci., **76**, 75-79 (2011)
7. Rawat R., Gulati A., Joshi R.: J. Food Biochem., **35**, 953–975 (2011)
8. Choi, Jung-Youn, Park R.-A., Kim J. Y., Kim J.-J., Cha J.-C., Yoon J.-J.: J. Microbiol. Biotechnol., **21**, 503–508 (2011)
9. Li Y.-Y., Jiang J.-C., Wan C.-X., Zhang Z.-Z., Li X.-D.: Acta Biochim. Biophys. Sin., **37**, 363–370 (2005)
10. Sue M., Ishihara A., Iwamura H.: Plant Sci., **155**, 67–74 (2000)
11. Randall G. Cameron,\* John A. Manthey, Robert A. Baker, and Karel Grohmann, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4457-4462 (2001)
12. Odoux E., Chauwin A., Brilloulet M.-J.: J. Agric. Food Chem., **51**, 3168-3173 (2003)
13. Cameron R. G., Manthey J. A., Baker R. A., Grohmann K.: J. Agric. Food Chem., **49**, 4457-4462 (2001)
14. Mauch-Mani B. Mauch F.: Curr. Opin. Plant Biol., **8**, 409-414 (2005)
15. Schroeder I. J., Nambara E.: Cell, **126**, (2006)
16. Steinacher A., Leyser O., Clayton H. R.: J. Theor. Biol., **296**, 84-94 (2012)

17. Woodward W. A., Bartel B.: *Ann. Bot.*, **95**, 707-735 (2005)
18. Danilova N. M., Kudryakova V. N., Zubkova K. N., Kusnetsov V. V., Kulaeva N. O., *Russ. J. Plant Physiol.*, **59**, 398–405 (2012)
19. Tarkowská D., Filek M., Kościelniak-Biesaga J., Macińska I., Macháčková I., Krekule J., Strnad M., *Plant Sci.*, **187**, 105-112 (2012)
20. Vanková R.: Cytokinin glycoconjugates: distribution, metabolism and function. *In* Strnad M., Pec P., Beck E., eds, *Advances in Regulation of Plant Growth and Development*. Peres Company, Prague, pp 67–78 (1999)
21. Letham D.S.: Cytokinins as phytohormones – sites of biosynthesis, translocation, and function of translocated cytokinin. *In*: Mok DW, Mok MC, eds. *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 57–80 (1994)
22. Kato C., Kato H., Asami T., Yoshida S., Noda H., Kamada H., Satoh S.: *Plant Physiol. Biochem.*, **40**, 949–954 (2002)
23. Campos N., Bakó L., Feldwisch J., Schell J., Palme K.: *Plant J.* **2**, 675–684. (1992)
24. Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Shell J., Palme K.: *Science*, **262**, 1051–1054 (1993)
25. Entsch B, Letham D.S.: *Plant Sci. Lett.* **14**, 205-212 (1979)
26. Entsch B, Parer C.W., Letham D.S., Summons R.E.: *Biochim. Biophys. Acta* **570**, 124-139 (1979)
27. Fenga X., Penga Y.-Z., Fua X., Zhanga H., Li S., Denga W. X., Fan M.-L.: *Environ. Exp. Bot.*, **78**, 127-137 (2012)
28. Vleeschauver D.D., Buyten V. E., Satoh K., Balidion J., Mauleon R., Choi R.-I., Vera-Cruz C., Kikuchi S., Höfte M.: *Plant Physiol.*, **158** (2012)
29. Spanou Ch., Veskoukis S. A., Kerasioti T., Kontou M., Angelis A., Aligiannis N., Skaltsounis L.-A., Kouretas D.: *PLoS ONE*, **3** (2012)
30. Roslan D. N., Yusop M. J., Baharum N. S., Othman R., Mohamed-Hussein A.-Z., Ismail I., Noor M. N., Zainal Z.: *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 2692-2706 (2012)



31. White B. J., Beckford J., Yadegarynia S., Ngo N., Lialitska T., d'Alarcao M.: Food Chem., **131**, 1453-1459 (2012)
32. Wang Y. S., Chen H., Camp J. M., Ehlenfeldt K. M.: Food Chem., **132**, 855-864 (2012)
33. Poulton J.E.: Plant Physiol., **94**, 401-405 (1990)
34. Holakovská B.: Characterization of  $\beta$ -glucosidase from tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.): Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2008)
35. Kloudová K.: Vliv biotického stresu na metabolismus sacharidů v rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum* L.): Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2012)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
S adresou			