

Abstrakt

Glykosidázy (EC 3.2.1.) neboli glykosidhydrolázy jsou enzymy katalyzující štěpení glykosidové vazby mezi dvěma sacharidy nebo mezi sacharidem a aglykonem. Za vhodných reakčních podmínek (zvláště snížení aktivity vody v reakční směsi) jsou tyto enzymy schopné glykosidovou vazbu též syntetizovat. Cílenou mutagenezí katalytického centra enzymů je možné potlačit nebo úplně zrušit jejich hydrolytickou aktivitu. Enzymová syntéza pomocí glykosidáz umožňuje připravit bioaktivní galaktosidy, např. ligandy galektinů.

Předkládaná práce se zabývá zejména β -galaktosidázou z *Bacillus circulans*, její rekombinantní expresí a mutagenezí. V první části práce byl mnou navržený komerčně připravený plazmid β -galaktosidázy z *B. circulans* izoformy A použit k rekombinantní expresi v *E. coli*. Bylo nutné optimalizovat podmínky produkce enzymu. Jelikož jde o velký protein (189 kDa) byl použit expresní vektor pCOLD II a chladová kultivace při 15 °C. Enzym je specifický pro tvorbu glykosidové vazby β -1,4 a byl využit na syntézu komplexních tri- a tetrasacharidových ligandů, které nelze připravit s hrubým komerčním preparátem obsahujícím nežádoucí enzymové aktivity. Dále byla pomocí PCR s mutantními primery provedena cílená mutageneze katalytického nukleofilu v aktivním centru tohoto enzymu, čímž byl vytvořen mutant v pozici E532G. Díky vzniklé mutaci byla potlačena téměř veškerá hydrolytická aktivita enzymu. Ve třetí části práce byla připravena kratší varianta enzymu pomocí PCR s fosforylovanými primery a následnou ligací pouze požadované části genu. Všechny připravené enzymy byly biochemicky charakterizovány a použity v syntetických aplikacích, jež jsou v této práci dokumentovány.

Klíčová slova:

Bacillus circulans, cílená mutageneze, *Escherichia coli*, β -galaktosidáza, galaktosylace, glykosyntáza, PCR, rekombinantní exprese