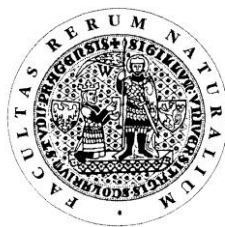


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Adamcová

SUBSTRÁTOVÁ SPECIFITA REKOMBINANTNÍ
 α -L-RHAMNOSIDASY

Substrate Specificity of Recombinant α -L-Rhamnosidase

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Lenka Weignerová, Ph.D.

Praha 2012

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a Evropského projektu FP7–KBBE–2010–4BIONEXGEN (MSMT 7E 11010).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Mikrobiologický ústav AVČR, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a AVČR.

V Praze dne 15. května 2012.

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Lence Weignerové, Ph.D. za odborné vedení bakalářské práce a vytvoření skvělých pracovních podmínek. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Petru Marholovi za užitečné rady a připomínky. Mé poděkování patří také vedoucímu Laboratoře biotransformací prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. a pracovníkům Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR za ochotu a pomoc při mé práci.

Nemohu také opomenout poděkovat rodině a přátelům, kteří mi jsou oporou.

Obsah

Seznam zkratk	6
Klíčová slova:	6
Key words:	6
1 Úvod.....	7
2 Cíl práce.....	7
3 Teoretická část	7
3.1 α -L-Rhamnosidasa	7
3.1.1 Aplikace	7
3.1.2 Substrátová specifita	8
3.1.3 Příprava a vlastnosti rekombinantní α -L-rhamnosidasy	9
3.2 Flavonoidy.....	10
3.2.1 Chemická struktura flavonoidů.....	11
3.2.2 Příjem a metabolismus flavonoidů	11
3.3 Hesperidin	12
3.3.1 Struktura a vlastnosti	12
3.3.2 Toxicita	12
3.3.3 Dostupnost – porovnání hesperidinu a hesperetinu	12
3.3.4 Využití	13
3.4 Naringin.....	14
3.4.1 Struktura.....	14
3.4.2 Toxicita	15
3.4.3 Dostupnost – naringin versus jeho aglykony	15
3.4.4 Využití	15
3.5 Rutin.....	16
3.5.1 Struktura.....	16
3.5.2 Toxicita	17

3.5.3	Dostupnost – porovnání rutinu a jeho aglykonů	17
3.5.4	Využití	18
4	Experimentální část.....	19
4.1	Použité chemikálie	19
4.2	Přístroje	19
4.3	Metody	20
4.3.1	Příprava enzymu	20
4.3.2	Měření aktivity α -L-rhamnosidasy	21
4.3.3	Rekrystalizace hesperidinu	22
4.3.4	Reakce substrátů s α -L-rhamnosidasou.....	22
4.3.5	TLC (<i>Thin Layer Chromatography</i>).....	22
4.3.6	HPLC (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>).....	23
4.3.7	Sloupcová chromatografie na silikagelu (tzv. „flash“ chromatografie).....	24
4.3.8	Lyofilizace	24
4.3.9	NMR (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) a MS (<i>Mass Spectrometry</i>)	24
5	Výsledky	24
5.1	Hesperidin	24
5.2	Naringin.....	26
5.3	Rutin.....	27
6	Diskuze	29
7	Závěr	30
8	Literatura.....	31
9	Přílohy.....	36
9.1	NMR data derhamnosylovaných produktů	36

Seznam zkratek

ABC	ATP-binding cassette
ACAT	Acylkoenzym A-cholesterol acyltransferasa
ADH	Alkoholdehydrogenasa
ALDH	Aldehyddehydrogenasa
CAZy	Carbohydrate-active enzymes database
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
HDL	High density lipoprotein
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
iNOS	Indukovatelná syntasa oxidu dusnatého
LDL	Low density lipoprotein
mRNA	Mediátorová RNA
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická resonance
RNA	Ribonukleová kyselina
SGLT1	Sodium/glucose cotransporter 1
TBARS	Radikály thiobarbiturové kyseliny
TLC	Tenkovrstevná chromatografie
TNBS	Trinitrobenzensulfonová kyselina
TNF- α	Tumor nekrosový faktor α
UV	Ultraviolet
YNB	Yeast nitrogen base

Klíčová slova: α -L-rhamnosidasa, hesperidin, naringin, rutin

Key words: α -L-rhamnosidase, hesperidin, naringin, rutin

1 Úvod

α -L-Rhamnosidasa je velice významným enzymem nacházejícím uplatnění v široké škále oborů – chemických, potravinářských a farmakologických. Přírodním zdrojem α -L-rhamnosidasy jsou plísně, kvasinky a bakterie. V této práci byla použita rekombinantní rhamnosidasa z organismu *Aspergillus terreus* exprimovaná v *Pichia pastoris*. Tato forma je unikátní svou stabilitou v relativně širokém rozmezí pH (4–9) a značnou termofilitou (teplotní optimum se pohybuje kolem 65°C).

Cílem této práce bylo testovat substrátovou specifitu rekombinantní α -L-rhamnosidasy a shrnout o ní dosud známé informace.

Jako substráty byly použity hesperidin, naringin a rutin patřící do skupiny flavonoidů. Flavonoidy jsou látky, které mají pro člověka značný význam. Nejen proto, že jich denně zkonzumuje v průměru až 100 mg, ale i díky jejich schopnosti účinkovat protizánětlivě, protialergicky, protinádorově atd.

2 Cíl práce

- Vypracovat rešerši o vybraných flavonoidech (hesperidin, naringin a rutin) a o α -L-rhamnosidase.
- Experimentálně zjistit substrátovou specifitu rekombinantní α -L-rhamnosidasy k hesperidinu, naringinu a rutinu při různých reakčních podmínkách (tj. koncentrace substrátů a pH).

3 Teoretická část

3.1 α -L-Rhamnosidasa

α -L-Rhamnosidasa je hydrolasa odštěpující α -L-rhamnosu z α -L-rhamnosidů. Její systematický název je α -L-rhamnosid-rhamnohydrolasa, EC 3.2.1.40, v zařazení v CAZy patří do rodiny GH 106 patřící pod rodinu 78.¹ Hlavním zdrojem α -L-rhamnosidas jsou mikroorganismy jako plísně, kvasinky a bakterie, byla však nalezena i v živočišných tkáních a rostlinách.²

3.1.1 Aplikace

Použití α -L-rhamnosidasy je široké – od využití ve farmacii přes chemický průmysl až po potravinářský průmysl.

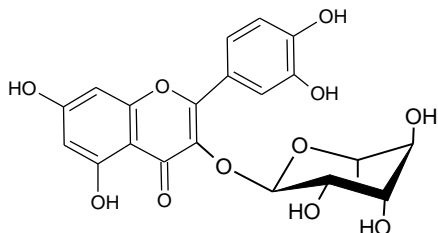
V potravinářství se používá ke zvýšení kvality nápojů (snížení hořkosti, uvolnění aromatických a bioaktivních látek). Naringin a limonin jsou hlavní složkou nápojů způsobující hořkost.^{3,4} Jejich derhamnosylované produkty jsou o více než jednu třetinu méně hořké.⁵ Derhamnosylace a následná deglykosylace je metoda využívaná i ve vinařství – ke zvýraznění aroma. 6-O- α -L-Arabinofuranosyl- β -D-glukopyranosid, 6-O- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glukopyranosid a 6-O- β -D-apiofuranosyl- β -D-glukopyranosid jsou některé z disacharidů vázaných na látky jako terpenoly, terpendioly, 2-phenylethanol, benzylalkohol a další, které jsou obsažené ve víně. Uvolněním těchto látek za pomoci α -L-rhamnosidasy, α -L-arabinofuranosidasy, β -D-apiosidasy a následně β -D-glukosidasy získávají vinaři aroma a chuť vína. Je možné také využít rekombinantní kvasinky produkující enzymy při vinifikaci (proces výroby vína).⁶ Dále by pak α -L-rhamnosidasa mohla být využita při výrobě potravinářských aditiv (např. sladidel).⁷

Tento enzym je rovněž důležitý při výrobě léčiv, jelikož absorpce glykosidů, a tudíž účinek v těle, je nižší než v případě jejich aglykonů. Tohoto poznatku by mohlo být využito ke zvýšení účinnosti látek jako desglukoruscin, desglukodesrhamnoruscin, gypenosid-5 či chloropolysporinů A, B a C a to derhamnosylací za pomoci α -L-rhamnosidasy.^{8,9,10,11}

V chemickém průmyslu je stěžejní role α -L-rhamnosidasy ve výrobě L-rhamnosy.¹²

3.1.2 Substrátová specifita

Substrátová specifita byla testována hlavně u flavonoidů jako např. rutin, hesperidin, naringin (viz obr. 3.5 na str. 12, obr. 3.7 na str. 15, obr. 3.8 na str. 17), quercitrin (obr. 3.1) a to hlavně kvůli jejich širokému uplatnění ve farmacii a potravinářství. Tyto flavonoidy mají odlišné aglykony a také různý typ vazby mezi glykosidem a α -L-rhamnosou popř. mezi aglykonem a α -L-rhamnosou u quercitrinu. U rutinu a hesperidinu je to α -1,6 vazba, zatímco u naringinu je to α -1,2 vazba. Mezi rutinem a hesperidinem je ještě rozdíl ve vazbě rutinosy na aglykon, rutin má rutinosu navázanou přes C₃, hesperidin přes C₇.



Obr. 3.1 | Chemická struktura quercitrinu

Velmi rozsáhle byla substrátová specifita zkoumána na různých kmenech plísní ve studii Monti a kol. (viz tab. 3.1) a to za nebo bez přidání tetrahydrofuranu kvůli zvýšení rozpustnosti substrátů. Z této studie vychází jako nejlepší substrát rutin. Naringin a hesperidin rozeznávalo jako svůj substrát méně kmenů, nejhorším substrátem byl quercitrin.¹³

Tab. 3.1 | Substrátová specifita α -L-rhamnosidas z různých kmenů plísní.¹³

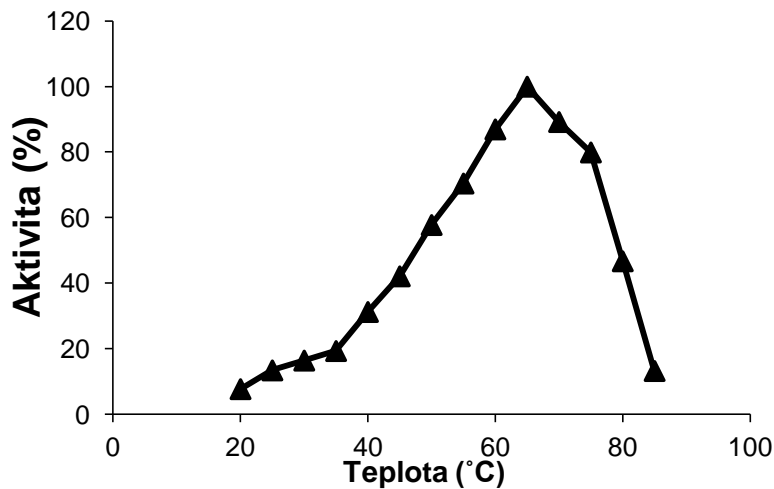
kmen	induktor	substrát			
		rutin	hesperidin	naringin	quercitrin
<i>Aspergillus aculeatus</i> CCF 108	L-Rhamnosa	x	x	x	●
	Rutin	x	x	x	●
	Hesperidin	x	x	x	●
	Naringin	x	x	x	●
<i>Aspergillus aculeatus</i> CCF 3134	L-Rhamnosa	x	x	x	●
	Rutin	x	x	x	●
	Hesperidin	x	x	x	●
<i>Aspergillus aculeatus</i> CCF 3138	L-Rhamnosa	x	x	x	●
	Hesperidin	x	x	x	●
<i>Aspergillus niger</i> CCIM K2	L-Rhamnosa	x	x	x	-
	Rutin	x	x	x	-
	Naringin	x	x	x	-
<i>Aspergillus terreus</i> CCF 3059	L-Rhamnosa	x	●	●	-
	Rutin	x	●	●	-
	Hesperidin	x	●	●	-
	Naringin	x	●	●	-
<i>Emericella nidulans</i> CCF 2912	L-Rhamnosa	●	-	●	-
	Hesperidin	x	x	x	-
	Naringin	x	-	x	-
<i>Fusarium nidulans</i> CCF 906	Rutin	x	●	●	-
	Naringin	●	●	●	-
<i>Mortierella alpina</i> CCF 2514	Rutin	x	-	-	●
<i>Mucor circinelloides grisco-cyanus</i> CCIM	Rutin	-	x	x	-
<i>Penicillium oxalicum</i> CCF 2430	L-Rhamnosa	-	-	●	●
<i>Talaromyces flavus</i> CCF 2686	L-Rhamnosa	x	-	-	●
	Naringin	●	-	●	●

Hydrolyza substrátu nebyla pozorována (-), hydrolyza substrátu pozorována v přítomnosti i nepřítomnosti 20% THF (x), hydrolyza byla pozorována jen v nepřítomnosti 20% THF (●)

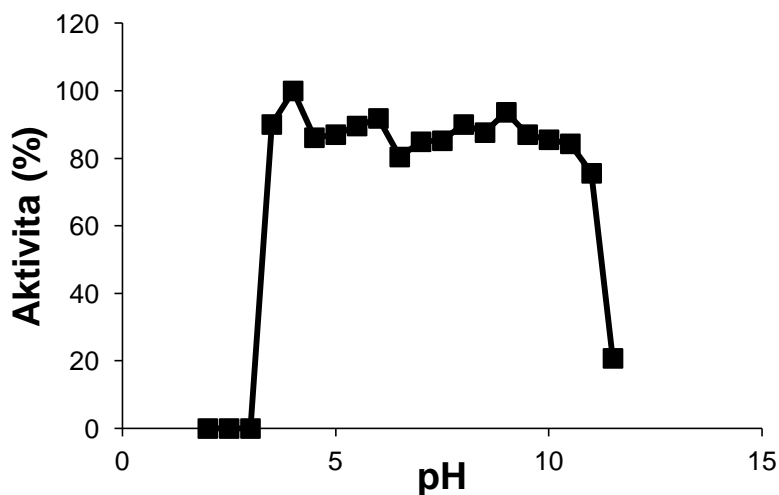
3.1.3 Příprava a vlastnosti rekombinantní α -L-rhamnosidasy

Pro přípravu α -L-rhamnosidasy byl využit organismus *Aspergillus terreus* CCF 3059, který přirozeně produkuje termostabilní α -L-rhamnosidasu se stabilitou v širokém rozmezí pH. Po kultivaci byla z mycelia izolována RNA a z ní následně mRNA, která byla použita jako vzor pro reverzní transkripci do cDNA. Následně byla cDNA namnožena pomocí PCR. Namnožená sekvence cDNA byla vnesena do expresního vektoru pPICZ α A, který byl linearizován a následně jím byla transformována *Pichia pastoris* KM71H pomocí elektroporace.¹⁴

Použitá α -L-rhamnosidasa z *Aspergillus terreus* vykazuje velkou stabilitu v širokém rozmezí pH a je termofilní. Její teplotní optimum je 70 °C (obr. 3.2) a pH optimum se pohybuje mezi hodnotami 4,5 a 5 (obr. 3.3).¹⁴



Obr. 3.2| Teplotní optimum rekombinantní α -L-rhamnosidasy¹⁴



Obr. 3.3| pH optimum a široké rozmezí pH stability rekombinantní α -L-rhamnosidasy¹⁴

3.2 Flavonoidy

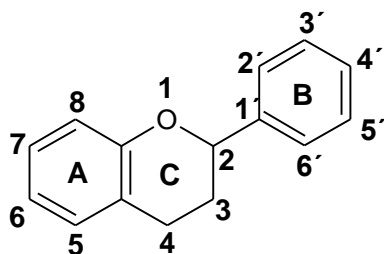
Flavonoidy jsou biologicky významnou skupinou látek patřící do rodiny polyfenolů. Jako sekundární metabolity jsou obsaženy v každé vyšší rostlině,¹⁵ a tudíž i v běžné stravě člověka (např. v citrusech, borůvkách, cibuli, čokoládě, víně, apod.).

Historie zkoumání flavonoidů je velice dlouhá. Už ve 30. letech 19. století byla izolována tříslovina obsahující mnoho polyfenolických látek.¹⁶ O století později, v roce

1936, Albert Szent Györgyi popsal tzv. vitamin P (tento termín se dnes již nepoužívá) a objevil souvislost mezi příjmem tohoto vitamínu a zlepšením stavu kapilár.¹⁷ Od té doby již bylo izolováno a popsáno více než 4000 flavonoidů.¹⁸ Bylo zjištěno, že flavonoidy mají kromě prospěšných účinků na stav kapilár další užitečné vlastnosti vzhledem ke zdraví člověka. Jsou schopné regulovat aktivitu enzymů a ovlivnit buněčné systémy a těmito cestami působit protizánětlivě, antihepatotoxicky, protialergicky, antiosteoporoticky, a dokonce vykazují i protinádorovou aktivitu.¹⁵ Za většinu těchto účinků jsou zodpovědné jejich antioxidační a chelatační vlastnosti.¹⁹

3.2.1 Chemická struktura flavonoidů

Flavonoidy jsou deriváty benzopyranu. Základní struktura flavonoidů je zobrazena na obr. 3.4. Flavonoidy jsou rozděleny do skupin dle jejich saturace a chemické povahy substituentů¹⁵. Nejčastějšími substituenty jsou hydroxylové skupiny, methoxy skupiny, sulfáty a navázané sacharidy.¹⁸



Obr. 3.4| Základní struktura flavonoidů

3.2.2 Příjem a metabolismus flavonoidů

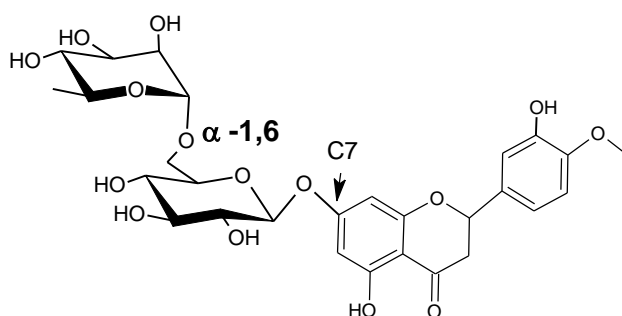
Jak již bylo zmíněno, flavonoidy jsou obsaženy v běžné stravě člověka. Průměrný příjem flavonolů a flavonů je 23 mg denně. Celkový příjem je odhadován na několik set miligramů denně. Bylo zjištěno, že největším zdrojem v potravě je čaj (48%), následovaný cibulí (29%) a jablky (7%).¹⁸

Metabolismus flavonoidů je dodnes málo prozkoumán. Je známo, že absorpce probíhá přes stěnu střeva, a to u glykosidů buď po hydrolýze mikrobiálními enzymy, nebo pomocí přenašečů. Jakmile se flavonoidy dostanou do jater, jsou konjugovány do formy glukuronidů a sulfátů.^{19,20}

3.3 Hesperidin

3.3.1 Struktura a vlastnosti

Hesperidin se skládá z aglykonu (hesperetin) a disacharidu (rutinosa) (obr. 3.5). Rutinosa je disacharid rhamnosy a glukosy vázaných α -1,6 vazbou. Čistý hesperidin se nalézá ve formě žlutých jehliček. Je rozpustný v alkalických roztocích, málo rozpustný v methanolu a skoro nerozpustný v acetonu.²¹



Obr. 3.5| Chemická struktura hesperidinu

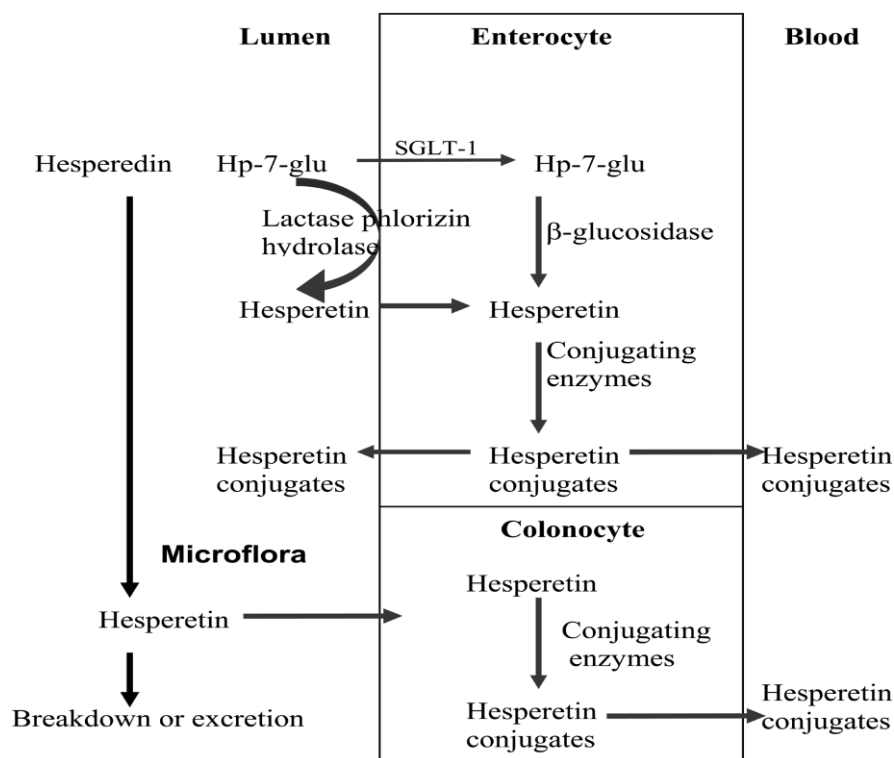
3.3.2 Toxicita

Hesperidin a obecně všechny citrusové flavonoidy jsou bezpečné a ani během těhotenství nemají žádné vedlejší účinky. Bylo také prokázáno, že podání fosforylovaného hesperidinu (metabolit) nezpůsobuje žádné toxické odezvy ani alergické reakce, a že se tato forma v těle nekumuluje.²¹

3.3.3 Dostupnost – porovnání hesperidinu a hesperetinu

To, jak se hesperidin absorbuje a metabolizuje, je dodnes předmětem rozsáhlých výzkumů. Z mnohých studií však vyplývá, že hesperidin je absorbován hlavně ve střevě poté, co je hydrolyzován enzymy z mikroflóry střeva. Naopak hesperetin je absorbován převážně aktivním transportem spřaženým s protonem a transcelulární pasivní difúzí²² (obr. 3.6)^{23,24}. S nízkou absorpcí souvisí i nízká dostupnost hesperidinu. Tento problém byl vyřešen enzymovou modifikací hesperidinu na jeho derhamnosylovaný aglykon – hesperetin-7-glukosid. Aglykon hesperidinu se absorbuje lépe než hesperidin, a tudíž je jeho biologická využitelnost vyšší.^{23,24} Tento jev má prozatím dvě možná vysvětlení – buď se glykosid hesperetinu hydrolyzuje phlorisinovou laktasou a úplný aglykon poté difunduje skrz epitel, nebo je aktivně transportován do enterocytů sacharidovým transportérem a poté

je deglykosylován v buňkách střeva.²³ Při zkoumání fekální flóry dobrovolníků byly izolovány a identifikovány tři kmeny anaerobních bakterií – *Bacteriodes distasonis*, *B. uniformis* a *B. ovatus*, které produkovaly β -glukosidasy. Některé kmeny *B. distasonis* vytvářely i α -rhamnosidasy a β -galaktosidasy.²⁵



Obr. 3.6| Metabolismus hesperidinu^{23,24}

3.3.4 Využití

Hesperidin je podáván pacientům trpícím křehkostí či zvýšenou propustností cév. Zvýšená propustnost cév je pozorována u nemocných s chronickou žilní nedostatečností, kurdějemi, různými vředy, diabetem melitus atd. V mnoha studiích bylo potvrzeno, že hesperidin snižuje propustnost cév.²⁶

Dalším pozitivním účinkem hesperidinu je schopnost snížit hladinu celkového cholesterolu, LDL (low density lipoprotein) cholesterolu, lipidů a triacylglyceridů a inhibovat HMG-CoA (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A reductasa) a ACAT (acylkoenzym A-cholesterol acyltransferasa).²⁷ Také bylo prokázáno, že inhibuje aktivitu lipasy z prasečí slinivky.²⁸

Je dobře známo, že hesperidin má vliv na různé enzymy – cyklooxygenasu²⁹, angiotensin I konvertující enzym³⁰ aj. Jejich prostřednictvím ovlivňuje krevní systém

a dokáže snižovat krevní tlak (antihypertenzní účinky). Byly prokázány i protizánětlivé a analgetické účinky hesperidinem.³¹ Hesperidin v kombinaci s diosminem chrání před zánětlivými procesy jak *in vivo*, tak *in vitro*. Mechanismem je zřejmě inhibice syntézy eikosanoidů hesperidinu a jeho schopnost vychytávat reaktivní kyslíkové radikály.³² Emim následně objevil, že po podání velké dávky se potkanům dokonce zmenšil záměrně vyvolaný edém.³³ Studium protizánětlivých účinků se zabýval i Crespo, který na TNBS (trinitrobenzensulfonová kyselina) modelu v potkanech ukázal, že podávání hesperidinu snižuje poškození tkáně. Navíc po orálním podání zmenšuje nekrotické oblasti. V biochemickém měřítku to znamená, že hesperidin byl schopen snížit aktivitu myeloperoxidasy. Myeloperoxidasa je považována za marker proniknutí neutrofilních granulocytů do poškozené tkáně.³⁴

Hesperidin a jeho deriváty přímo inhibují hyaluronidasu a potencují inhibiční aktivitu kyseliny askorbové (vitamin C).^{35,36} Hyaluronidasu je enzym, který hydrolyzuje polysacharid kyseliny hyaluronové, a tím zvětšuje propustnost tkáně. Hyaluronidasu produkují také mnohé kmeny bakterií za účelem snadnějšího průniku do tkání organismu.³⁷

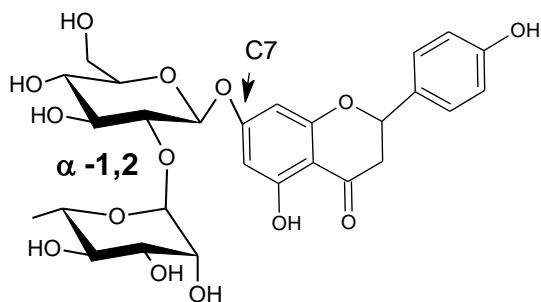
Hesperidin sám nebo v kombinaci s diosminem je také účinným antikarcinogenem. Tato jeho vlastnost byla prokázána v mnoha studiích proti různě indukovaným karcinogenesím.^{38,39,40} Bylo také zjištěno, že hesperetin má antimutagenní aktivitu vůči známému karcinogenu aflatoxinu B1 produkovaného bakterií *Salmonella typhirium* v přítomnosti savčího metabolického aktivačního systému.⁴¹

Další důležitou oblastí, ve které byly hesperidin a hesperetin zkoumány na základě jejich antioxidační aktivity, je ochrana před UV zářením. Po pokusech *in vitro* a *in vivo* v experimentálních systémech byla provedena studie i na lidských dobrovolnících, která ukázala, že hesperetin může být použit jako fotoochranný prvek.⁴²

3.4 Naringin

3.4.1 Struktura

Naringin je hlavní glykosidový flavanon obsažený v grepech a je příčinou jejich hořkosti. Má podobnou strukturu jako hesperidin. Rovněž je tvořen disacharidem rhamnosy a glukosy (ale spojených vazbou α -1,2) a jeho aglykonem naringininem (viz obr. 3.7 na straně 15).



Obr. 3.7| Chemická struktura naringinu

3.4.2 Toxicita

Jak již bylo poznamenáno u hesperidinu, citrusové flavonoidy jsou obecně netoxické.

3.4.3 Dostupnost – naringin versus jeho aglykony

Z výsledků výzkumu metabolismu naringinu a jeho aglykonů v potkanech můžeme soudit, že se naringin absorbuje hůře (se zpožděním) oproti aglykonům a je zřejmě absorbován až ve slepém nebo tlustém střevě, přičemž absorpce probíhá až po hydrolyze naringinu. Zatímco derhamnosylovaný (prunin) a úplný (naringinin) aglykon jsou absorbovány dříve a to v žaludku nebo v tenkém střevě.^{43,44,45}

3.4.4 Využití

Naringin je významný supresor produkce TNF- α (tumor nekrosový faktor) a oxidu dusnatého v makrofázích indukovaných bakteriálním lipopolysacharidem. TNF- α a oxid dusnatý jsou látky vyvolávající zánět a v akutních případech i endotoxický šok. Naringin potlačuje jejich produkci, a tím brání vzniku šoku.⁴⁶

Bylo také prokázáno, že tento flavonoid oslabuje H₂O₂ indukovanou cytotoxicitu, potlačuje kondenzaci chromatinu a chrání před poškozením DNA.⁴⁷ Jiná studie uvedla i oslabení cytosin-arabinosou indukovanou cytotoxicitu, a to inhibicí produkce reaktivních kyslíkových radikálů a mírným zvýšením aktivity antioxidantních enzymů naringinem⁴⁸.

Dalším příkladem antioxidantních vlastností naringinu je ochrana ledvin před glycerolem indukovaným selháním. Léčba naringinem před podáním glycerolu výrazně snížila poškození funkcí ledvin, vznik TBARS (radikály thiobarbiturové kyseliny) a také zvýšila aktivitu enzymů glutathion reductasy, superoxid dismutasy a katalasy.⁴⁹ Stejně účinky měl naringin i proti selhání ledvin indukovaném nitrilotriacetátem železa.⁵⁰

Naringin je také jedním z flavonoidů, které snižují propustnost membrány pro draselné ionty, která je způsobena volnými radikály kyslíku⁵¹.

Naringin také zvyšuje aktivitu ADH (alkoholdehydrogenasa) a ALDH (aldehyddehydrogenasa), čímž pomáhá metabolizovat alkohol. Dále zvyšuje hladinu HDL cholesterolu v plasmě a snižuje tak pravděpodobnost vzniku aterosklerozy.⁵² V dalším experimentu bylo poté zjištěno, že naringin inhibuje HMG-CoA reduktasu a ACAT.⁵³

Benzo(a)pyren je karcinogen, který se vyskytuje všude kolem nás. Slouží také jako prototyp při výzkumu karcinogenů. Jedním ze zásadních kroků aktivace benzo(a)pyrenu je jeho mikrosomální epoxidace cytochromem P450. Enzymy cytochromu P450 1A2 katalyzují reakce mnoha látek v těle (zejména cizorodých). Naringin snižuje hladinu cytochromu P450 1A2, a tím snižuje aktivitu benzo(a)pyren hydroxylasy.⁵⁴

V další studii byl prokázán antikarcinogenní efekt naringinu na potkanech. Tento experiment potvrdil, že citrusové flavonoidy jsou inhibitory růstu prsních rakovinotvorných buněk.⁵⁵

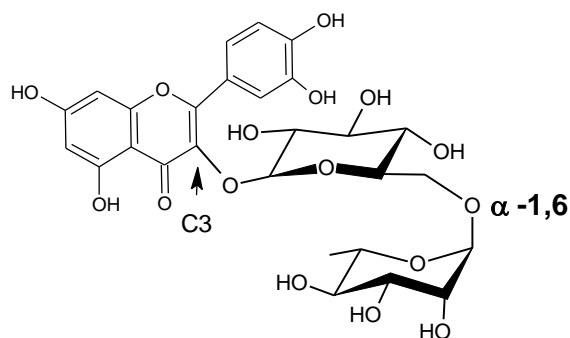
Naringin vykazuje i výjimečnou aktivitu proti mutagenезi v *Salmonella typhimurium* (kmen TA100 NR) indukované N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinem⁵⁶. Tento induktor byl použit i při studiu vlivu naringinu na karcinogenezi v žaludku. Naringin zmenšil velikost tumoru v potkanech, a dokonce zvýšil jejich tělesnou váhu.⁵⁷

Naringin inhibuje oxidaci dihydropyridinů (blokátory vápníkových kanálů). Tato oxidace je katalyzována pomocí cytochromu P. Cytochrom P450 3A4 je také důležitým katalyzátorem aktivace aflatoxinu B1, naringin by tedy mohl inhibovat i tuto reakci.⁵⁸

3.5 Rutin

3.5.1 Struktura

Rutin je citrusový flavonoid patřící mezi flavonoly. Je tvořen disacharidem rutinosem (glukosa spojená s rhamnosou α -1,6 vazbou) a aglykonem quercetinem (viz obr. 3.8 na straně 17).



Obr. 3.8| Chemická struktura rutinu

3.5.2 Toxicita

Přestože quercetin vykazuje silné antioxidační účinky, ve vysokých koncentracích může produkovat reaktivní formy kyslíku.⁵⁹ Bylo prokázáno, že úplný aglykon rutinu (quercetin) je inhibítoem topoisomerasy I.⁶⁰

3.5.3 Dostupnost – porovnání rutinu a jeho aglykonů

Quercetin a jeho sacharidové deriváty jsou již mnoho let zkoumány z hlediska jejich absorpce a metabolismu. I přes dlouholeté úsilí není dodnes popsán přesný mechanismus těchto dějů.

Při výzkumu absorpce quercetinu v potkanech se zjistilo, že začíná již v žaludku. Avšak jeho glykosidy v žaludku nepodléhaly ani absorpci, ani hydrolýze.⁶¹ V další studii na potkanech se prokázalo, že rutin ve srovnání s quercetinem není absorbován ani v tenkém střevě, a že je tudíž absorbován až v tlustém střevě zdejší mikroflórou.⁶² Jiného názoru však byly skupiny, které ve svých studiích, na základě zjištěné inhibice přenosu glukosy pomocí přenašeče SGLT1 za přítomnosti glykosidu quercetinu, tvrdí, že glykosidy quercetinu se absorbují již v tenkém střevě prostřednictvím tohoto přenašeče.^{63,64,65} Tyto závěry byly ale zpochybněny myšlenkou, že substráty inhibující SGLT1 by také mohly inhibovat phlorisinovou laktasu.⁶⁶ Tato hypotéza byla poté potvrzena ve studii Kotra a Daniela, kteří dokázali, že ani glykosidy ani aglykony nejsou substrátem pro přenos pomocí SGLT1.⁶⁷ Glykosidy by ale mohly být přenášeny pomocí přenašeče MRP2. Walgren se spolupracovníky prokázali přenos glykosidu quercetinu MRP2 transportérem a navíc dokázali umístění MRP2 v apikální membráně.⁶⁸

3.5.4 Využití

Stejně jako ostatní flavonoidy rutin a jeho aglykony vykazují antioxidační účinky. Bylo prokázáno, že isoquercitrin snižuje negativní dopad peroxidu vodíku na RGC-5 buňky, a tím zvyšuje i jejich životaschopnost. Navíc je schopen snižovat vznik reaktivních kyslíkových radikálů a s tím související vyčerpání glutathionu.⁶⁹ Peroxid vodíku negativně ovlivňuje i funkce mitochondrií. Quercetin mitochondrie chrání, a tím zabraňuje vzniku oxidativního stresu v RPE (sítnicové pigmentové epitelální buňky).^{70,71}

Rutin a isoquercitrin prokazatelně inhibují acetylcholinesterasu, která katalyzuje hydrolyzu acetylcholinu. Inhibice acetylcholinesterasy zmírňuje depresi, která je i jedním ze symptomů Alzheimerovy choroby.⁷²

Quercetin také pomáhá v léčbě hypertenze vzniklé z různých příčin, a to díky svým různorodým účinkům. Quercetin působí přímo na vazodilataci, interaguje s reaktivními formami kyslíku (ROS) a také ovlivňuje renální funkce snížením exprese epitelálního kanálu pro sodíkové ionty.^{73,74}

Dalším současným velice častým onemocněním je hyperlipidemie a s tím související aterosklerosa. Quercetin snižuje množství cholesterolu v krvi potkanů s vysokým příjmem tuku a také zabraňuje vzniku aterosklerosy.⁷⁵

Quercetin je rovněž významným protizánětlivým činidlem. Quercetin a isoquercitrin potlačují eozinofilní zánět, mohly by tudíž být využity při léčbě astmatu a alergie.⁷⁶ Isoquercitrin je schopen inhibovat stimulovanou degranulaci v RBL-2H3 buňkách (buňky užívané jako model degranulace žírných buněk), čímž pomáhá léčbě symptomů alergie.⁷⁷ Také snižuje odpověď na leukotrienem D₄ a karcholem indukovanou kontrakci. Toto snížení by mohlo být také užitečné při léčbě astmatu.⁷⁸

Quercetin dokáže *in vitro* inhibovat lipopolysacharidy indukovanou produkci oxidu dusnatého a prostaglandinu E₂ snížením exprese proteinů iNOS (indukovatelná syntasa oxidu dusnatého) a cyklooxygenasy-2. *In vivo* byl prokázán jen pokles oxidu dusnatého. Oxid dusnatý a prostaglandin E₂ jsou látky uvolňované při zánětu.⁷⁹

Quercetin vykazuje i protinádorové účinky. Je schopen inhibovat expresi androidního receptoru, a tím snižovat riziko vzniku rakoviny prostaty.⁸⁰ Také reguluje aktivitu P-glykoproteinu a snižuje expresi ABCB1. ABC transportéry, mezi něž patří i P-glykoprotein, jsou zodpovědné za rezistenci tumorů vůči chemoterapii.⁸¹

Na *Salmonella enteritidis* a *Bacillus cereus* bylo prokázáno, že quercitrin a quercetin působí i antibakteriálně. Navíc, pokud se zkombinují různé flavonoidy, projeví

se jejich inhibice ještě ve větším měřítku.⁸² Ke stejnému závěru (synergistický efekt) došli i vědci při zkoumání antivirového účinku na *Herpes simplex virus* typu I.⁸³

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- Acetonitril *J.T.Baker*, Nizození
- Biotin *Sigma–Aldrich*, USA
- Ethylacetát *Merck*, DE
- Hesperidin *Senn Chemical*, CH
- Hydroxid sodný *Chemapol*, CZ
- Kryokonzerva *P.pastoris* produkující α -L-rhamnosidasu Mikrobiologický ústav, AVČR
- Kyselina mravenčí *Merck*, DE
- Methanol *Lach:ner*, CZ
- Naringin *Senn Chemicals*, CH
- *p*-Nitrofenol *Lachema*, CZ
- *p*-Nitrofenyl- α -L-rhamnopyranosid *Sigma–Aldrich*, USA
- Uhličitan sodný *Chemapol*, CZ
- Rutin *Alchimica*
- Silikagel 60 *Merck*, DE
- YNB (Yeast Nitrogen Base) *Sigma–Aldrich*, USA

4.2 Přístroje

- Analytické váhy *Precisa*, CH
- Automatické pipety Eppendorf *Eppendorf*, DE
- Biohazard flow box – JOUNAN MSC 9 *Jounan–Bio Omega*, FR
- Centrifuga *Labnet*, CZ
- Centrifuga – Beckman J2–21 *Beckman Instruments. Inc.*, USA
- Horkovzdušná pistole *Steinel*, DE
- HPLC systém – Shimadzu Prominence *Shimadzu*, JP

- Monolitická HPLC kolona Chromolith Performance, RP–18e, 100 x 3 mm *Merck, DE*
- Lyofilizátor Lyovac *Leybold Vakuum, DE*
- Magnetická míchačka *Laboratorní přístroje Praha, CZ*
- Spektrofotometr – Shimadzu UV–1202 *Shimadzu, JP*
- Thermomixer Comfort *Eppendorf, DE*
- Třepačka Lab–Shaker *Adolf Kuhner AG, DE*
- Třepačka – IKA KS400 i control *Schoeller*
- Vakuová pumpa *Waters, USA*
- Vakuová odparka *Büchi, DE*
- Vortex – IKA–VERK VF 2 *Janke&Kunkel, DE*

4.3 Metody

4.3.1 Příprava enzymu

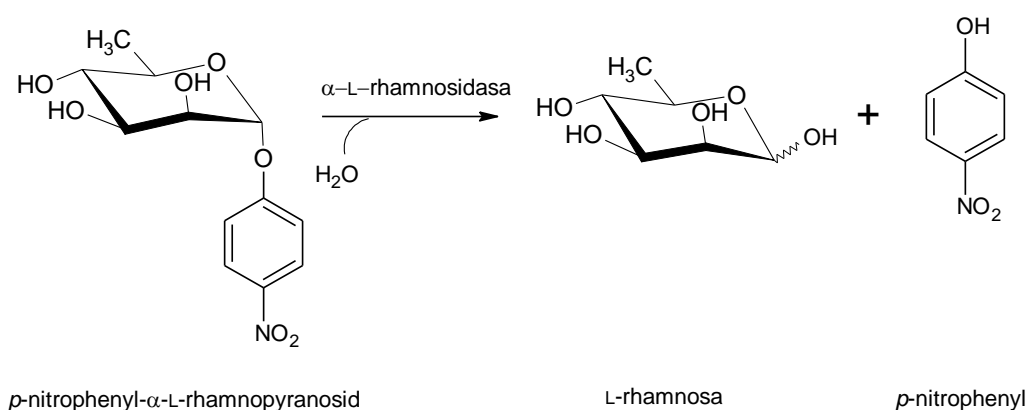
Kryokonzervy *P.pastoris* produkující α -L-rhamnosidasu byly připraveny Ing. Danielou Gestorferovou v Laboratoři biotransformací na Mikrobiologickém ústavu AVČR¹³.

Bylo připraveno médium pro zaočkování z kryokonzervy. Do třílitrové baňky bylo odměřeno 700 ml destilované vody. Po sterilizaci bylo do baňky za sterilních podmínek přidáno 100 ml glycerolu, 100 ml 1M draselno–fosfátového pufru, 100 ml YNB a 2 ml biotinu. Do media bylo poté očkováno 200 μ l z kryokonzervy. Kultura byla kultivována při 28 °C do $OD_{600nm} > 2$, poté byla centrifugována ve sterilních kyvetách při 4000 rpm a 20 °C 15 minut. Mezitím bylo připraveno médium pro kultivaci. Do jednolitrové baňky bylo odměřeno 140 ml destilované vody. Po sterilizaci bylo do baňky za sterilních podmínek přidáno 20 ml 5% methanolu (sterilizován filtrací), 20 ml 1M draselno–fosfátového pufru, 20 ml YNB a 400 μ l biotinu. Pelet byl sterilně resuspendován do připraveného média a poté třepán při 28 °C a 220 rpm. Následující dny byl každý den do média sterilně přidán 1 ml 100% methanolu do té doby, než byla naměřena dostatečná aktivita (přibližně 5U/ml, 3. den kultivace). Poté byla kultura centrifugována ve sterilních kyvetách při 4000 rpm a 20 °C 15 minut. Médium bylo sterilně odebráno a uchováno v lednici.

4.3.2 Měření aktivity α -L-rhamnosidasy

Aktivita α -L-rhamnosidasy byla měřena spektrofotometricky za použití chromogenního substrátu *p*-nitrophenyl- α -L-rhamnopyranosidu (viz reakce na obr. 4.1). Naměřená absorbance byla přímo úměrná koncentraci *p*-nitrophenylu, a to v jeho absorpčním maximu (420 nm)⁸⁴. Pro měření byla zkonstruována kalibrační křivka závislosti absorbance *p*-nitrophenolu na jeho koncentraci (0 – 2 mM) při 420 nm. Tato kalibrace byla poté použita na výpočet aktivity enzymu.

Pro měření byla připravena reakční směs obsahující 30 μ l enzymového roztoku, 10 μ l pufru (50mM citrát-fosfát pufr, pH=6) a 10 μ l substrátu. Slepý vzorek byl připraven ze 40 μ l pufru a 10 μ l substrátu. Reakce probíhala 10 minut při 35 °C a 750 rpm. Poté byla zastavena přidáním 1 ml 0,1M uhličitanu sodného a změřena spektrofotometrem proti slepému vzorku.



Obr. 4.1| Schéma hydrolýzy substrátu *p*-NP- α -Rha

$$a = \frac{A}{k} \cdot \frac{V_{vz}}{(V_{celk} \cdot t)} \cdot f$$

a	koncentrace katalytické aktivity enzymu (U/ml)
A	absorbance roztoku při 420 nm
k	kalibrační konstanta
V_{vz}	objem vzorku (ml)
V_{celk}	celkový objem roztoku (ml)
t	doba reakce (min)
f	faktor zředění

Koncentrace katalytické aktivity enzymu odpovídá aktivitě enzymu vztažené na jednotku objemu. Jednotkou aktivity enzymu je unit (U), který je definován jako množství enzymu, které přemění za definovaných podmínek 1 μ mol substrátu za 1 minutu.

4.3.3 Rekrystalizace hesperidinu

5 g hesperidinu (po rozetření v třecí misce) byl rozpuštěn v 1 litru ethanolu a pod zpětným chladičem byla směs přivedena k varu. Po asi 30 minutách byl var ukončen a směs byla přefiltrována. Přefiltrovaný roztok byl ponechán k vychladnutí při laboratorní teplotě do druhého dne. Utvořené krystaly byly přefiltrovány a po vysušení použity v reakci s α -L-rhamnosidasou.

4.3.4 Reakce substrátů s α -L-rhamnosidasou

Objem enzymu byl rozdělen na dvě poloviny. V první části bylo pH upraveno pomocí NaOH na pH=6, v druhé na pH=8. Byla změřena koncentrace katalytické aktivity v obou roztocích a upravena destilovanou vodou na koncentraci 3,5 U/ml.

Na analytických vahách bylo naváženo příslušné množství rutinu, hesperidinu a naringinu, tak aby jejich koncentrace odpovídala 2 g/l, 5 g/l a 10 g/l ve 20 ml roztoku enzymu. Celkem tedy 6 navážek pro každý substrát (2 různé pH a 3 různé koncentrace). Do baněk se vzorky bylo přidáno 20 ml roztoku enzymu a následně byly umístěny na třepačku (50 °C, 220 rpm).

Během 24 hodin bylo každou hodinu odebíráno 100 μ l z každé reakce do mikrozkuvek a reakce byla zastavena varem na 3 min při 99 °C. Následně byly uchovávány v mrazáku. Po posledním odběru (tj. 24. hodina) byla reakční směs povařena, zamražena tekutým dusíkem a následně lyofilizována.

4.3.5 TLC (*Thin Layer Chromatography*)

Ke sledování průběhu reakce byla použita metoda TLC. Jako mobilní fáze byla použita směs – ethylacetát/kys. mravenčí/dest. voda = 9/0,5/0,5 (v/v/v). Vzorky na destičce byly poté detegovány pod UV světlem a následně smočením v 5% ethanolovém roztoku kyseliny sírové a vystavením proudu horkého vzduchu z horkovzdušné pistole (300 °C).

4.3.6 HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Vzorky byly před použitím HPLC upraveny dle následujícího postupu. Nejdříve byly zředěny methanolem (viz tab. 4.1, 4.2, 4.3) a poté byly centrifugovány při 4 °C a 13500 rpm 5 minut. Do HPLC vialek byla pomocí pipety přenesena horní vrstva.

Tab. 4.1| Ředění vzorků hesperidinu pro různé koncentrace a pH

Hesperidin			
	2 g/l	5 g/l	10 g/l
pH 6	5x	10x	20x
pH 8	4x	7x	12x

Tab. 4.2| Ředění vzorků naringinu pro různé koncentrace a pH

Naringin			
	2 g/l	5 g/l	10 g/l
pH 6	5x	10x	20x
pH 8	15x	30x	60x

Tab. 4.3| Ředění vzorků rutinu pro různé koncentrace a pH

Rutin			
	2 g/l	5 g/l	10 g/l
pH 6	10x	10x	20x
pH 8	10x	10x	20x

Stacionární fází byla reverzní monolitická C18 kolona na bázi silikagelu Chromolith Performance (100 × 3 mm). Pro eluci analytů byla použita binární mobilní fáze, složka A (acetonitril/voda/kyselina mravenčí (5/95/0,1, v/v/v), složka B (acetonitril/voda/kyselina mravenčí (80/20/0,1, v/v/v). Před použitím byla mobilní fáze přefiltrována přes 0,45µm filtr za použití vakuové pumpy.

Vzorky byly analyzovány metodou HPLC s gradientovou elucí s DAD (200- 400 nm) detekcí (extrahován signál detektoru 283 nm u vzorků hesperidinu a naringinu a 360 nm u rutinu). Průběh gradientu pro hesperidin a naringin : 0 – 2 min 100% A; 2 – 5 min 0 – 60% B; 5 – 5,1 min 60% B; 5,1 – 6,1 min 60 – 0% B; 6,1 – 7,5 min 0% B, pro rutin: 0 – 4 min 7 – 30% B; 4 – 5 min 30% B; 5 – 6 min 30 – 7% B; 6 – 7,5 min 7% B.

4.3.7 Sloupcová chromatografie na silikagelu (tzv. „flash“ chromatografie)

Vybrané lyofilizované vzorky (hesperidin o koncentraci 5 g/l a pH=6, naringin o koncentraci 5 g/l a pH=8) byly preparativně přečištěny na koloně se silikagelem. Jako mobilní fáze byla použita směs – ethylacetát/kys. mravenčí/dest. voda = 9/0,5/0,5 (v/v/v). Po přečištění byly roztoky odpařeny do sucha na vakuové odparce.

4.3.8 Lyofilizace

Vodné roztoky vzorků byly zamrazeny tekutým dusíkem a poté lyofilizovány na přístroji Lyovac.

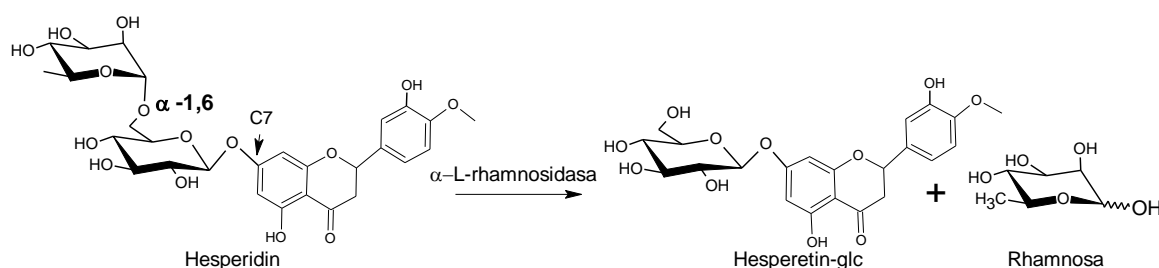
4.3.9 NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) a MS (*Mass Spectrometry*)

K potvrzení struktury byly izolované a lyofilizované vzorky analyzovány pomocí NMR a MS (viz příloha č.1) RNDr. Helenou Pelantovou a Doc. Miroslavem Šulcem.

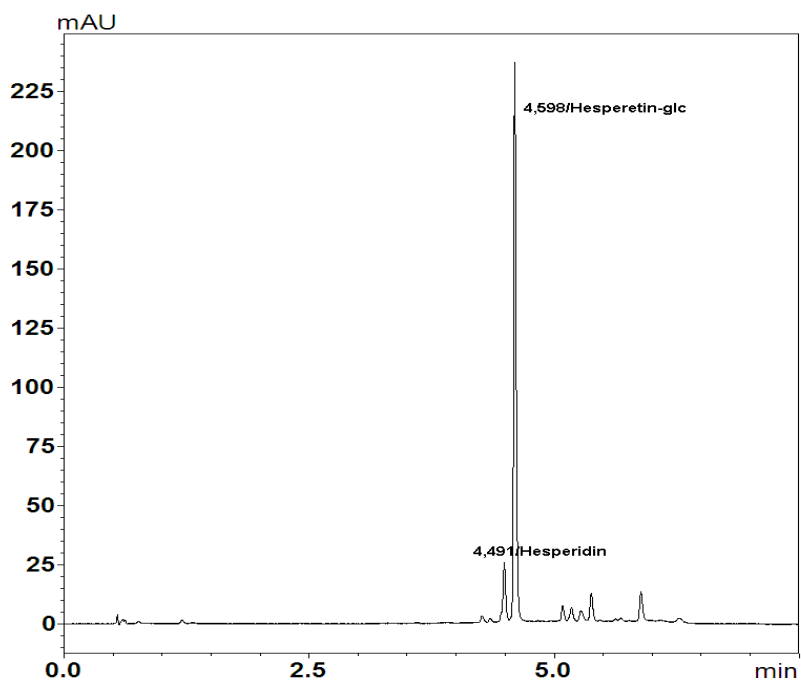
5 Výsledky

5.1 Hesperidin

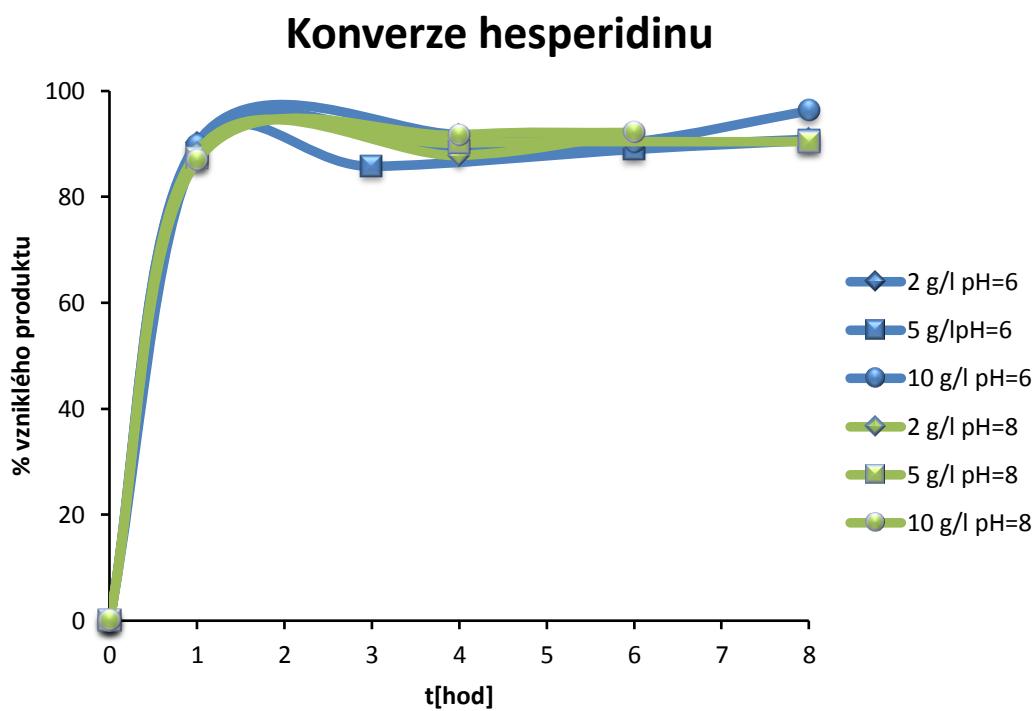
Z počátku hydrolýza hesperidinu (obr. 5.1) dosahovala pouze 70%. Substrát byl proto přečištěn na koloně se silikagelem, ani poté však konverze nedosáhla 100% a ani na základě dat získaných z HPLC se nepotvrdila čistota hesperidinu. Hesperidin byl tudíž přečištěn rekrystalizací z ethanolu. Z časových důvodů nebylo možno naměřit data pro překrystalizovaný hesperidin. Uvedená data jsou platná pro přečištěný hesperidin.



Obr. 5.1| Schéma hydrolýzy hesperidinu



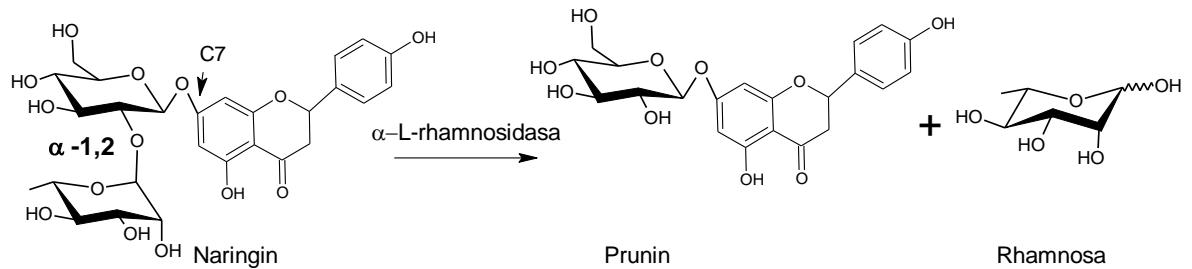
Obr. 5.2| HPLC chromatogram reakce hesperidinu (4. hodina, koncentrace 5 g/l, pH=8)
viz metoda 4.3.6



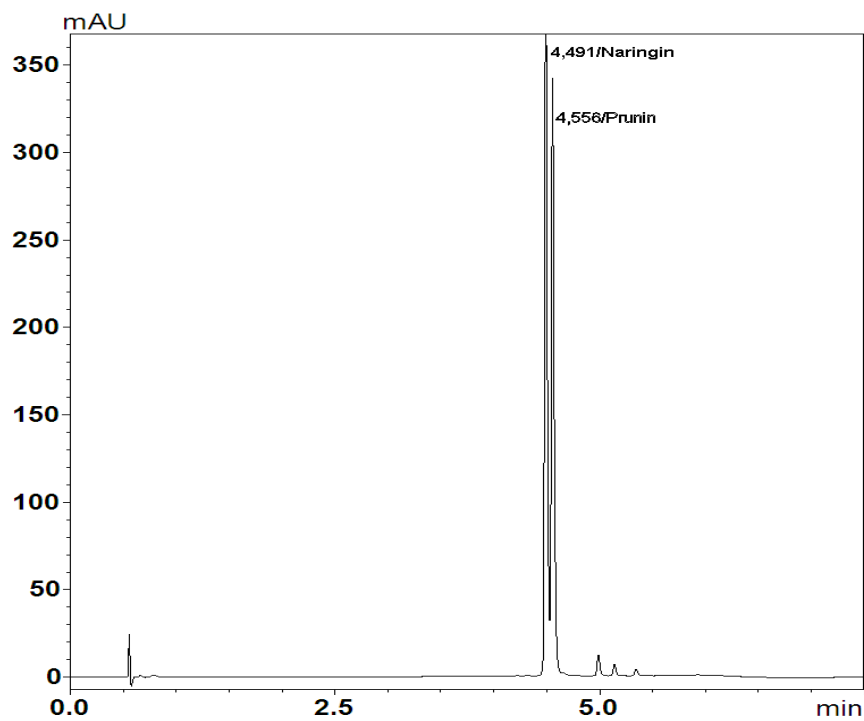
Obr. 5.3| Konverze hesperidinu v závislosti na čase

5.2 Naringin

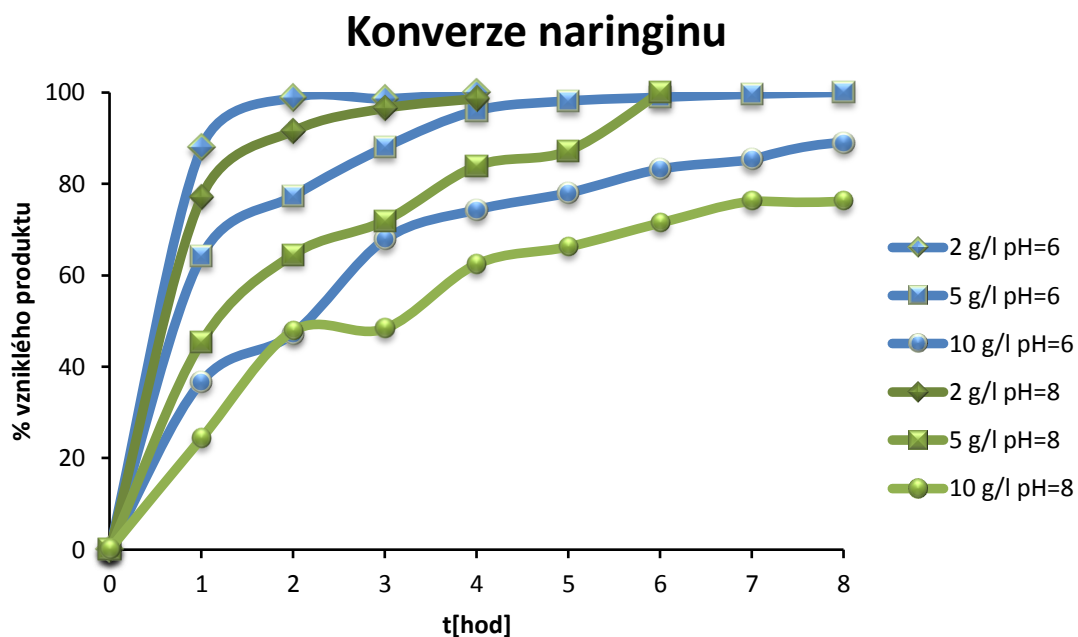
Hydrolýza naringinu (obr. 5.4) proběhla se 100% účinností. Jak je vidět v grafu (obr. 5.6), reakce probíhala nejrychleji při pH=6 a při nejnižší koncentraci substrátu.



Obr. 5.4| Schéma hydrolýzy naringinu



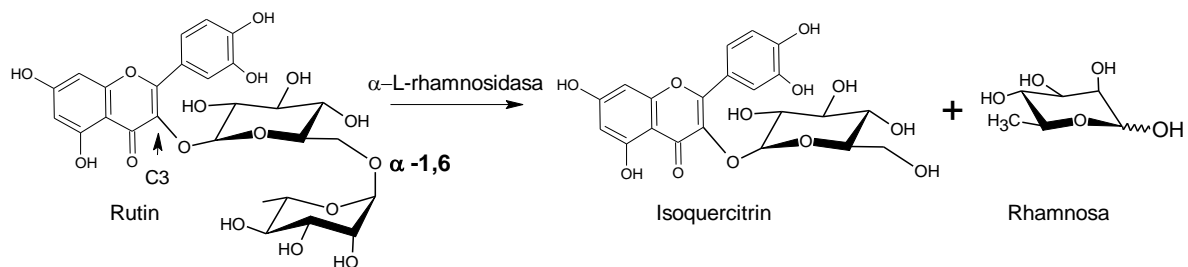
Obr. 5.5| HPLC chromatogram reakce naringinu (2. hodina, koncentrace 10 g/l, pH=8)
viz metoda 4.3.6



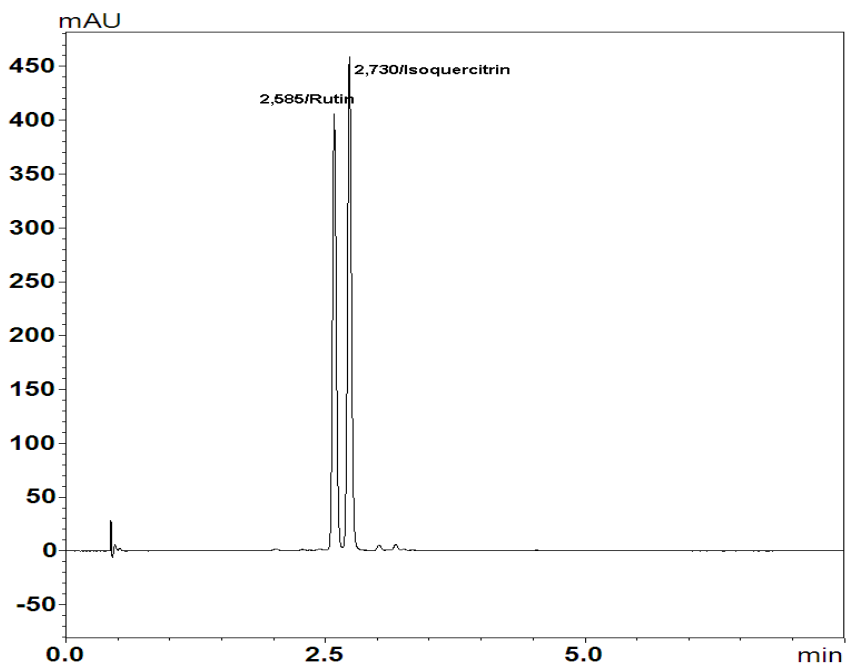
Obr. 5.6| Konverze naringinu v závislosti na čase

5.3 Rutin

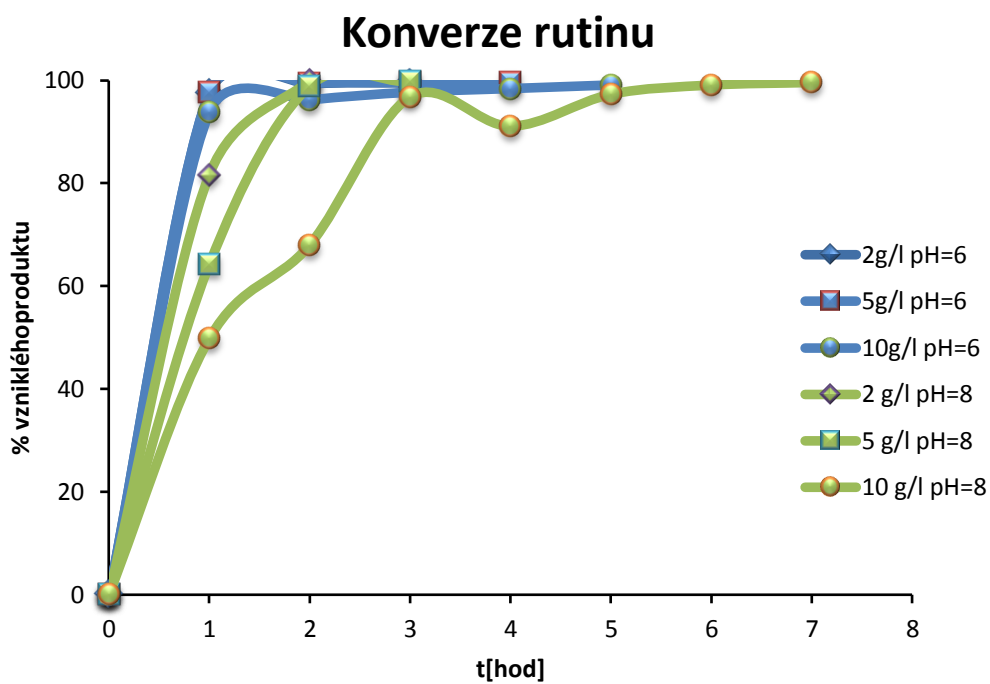
Reakce rutinu s α -L-rhamnosidasou (obr. 5.7) proběhla také ze 100%. Z grafu (obr. 5.9) je opět vidět, že reakce nejlépe probíhala při pH=6 a nejnižší koncentraci substrátu.



Obr. 5.7| Schéma hydrolyzy rutinu



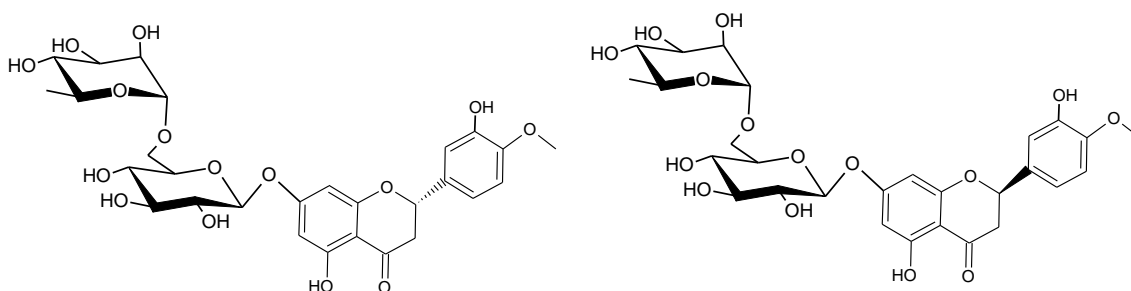
Obr. 5.8| HPLC chromatogram reakce rutinu (1. hodina, koncentrace 2 g/l, pH=6)
viz metoda 4.3.6



Obr. 5.9| Konverze rutinu v závislosti na čase

6 Diskuze

Použitá rekombinantní α -L-rhamnosidasa dokáže derhamnosylovat všechny zkoumané substráty – hesperidin, naringin i rutin. Jediným substrátem, který nebyl hydrolyzován ze 100%, je hesperidin. Komerční substrát nebyl dostatečně čistý, byl proto přečištěn na koloně se silikagelem, ale ani poté nebyla čistota dostatečná. Z tohoto důvodu ho bylo třeba překrystalizovat z ethanolu. Z časových důvodů ještě nebylo možno data pro překrystalizovaný hesperidin naměřit. Pokud by ale ani konverze překrystalizovaného hesperidinu nedosáhla 100%, dalo by se uvažovat i o preferenci α -L-rhamnosidasy k jednomu z optických izomerů, které hesperidin vytváří (obr. 6.1) a ten druhý není schopna hydrolyzovat.



Obr. 6.1| Optické izomery hesperidinu

I přes neschopnost použité α -L-rhamnosidasy dosáhnout 100% konverze u hesperidinu se dá tento substrát považovat za nejvhodnější (po 1 hodině bylo dosaženo 90% konverze). Nejnižší specifitu měla α -L-rhamnosidasa k naringinu. Je to nejspíše dáno tím, že použitá α -L-rhamnosidasa lépe hydrolyzuje α -1,6 vazbu a rhamnosa v naringinu je vázána s glukosou α -1,2 vazbou.

Ze všech tří substrátů se u naringinu nejvíce projevoval rozdíl „kvality“ hydrolýzy použití různých koncentrací a pH. Zatímco při pH=6 a koncentraci 2 g/l bylo konvertováno skoro 90% naringinu již po 1 hodině, při stejném pH ale koncentraci 10 g/l to bylo necelých 40% a při pH=8 a koncentraci 10 g/l dokonce jen 25%. Hydrolýza hesperidinu se výrazně nelišila v závislosti na pH reakce a koncentraci substrátu. U rutinu se koncentrační rozdíly při pH=6 také na hydrolýze příliš neprojevovaly. Při pH=8 však byly tyto rozdíly zřetelnější (po 1 hodině při koncentraci 2 g/l byla konverze 80%, při 10 g/l již jen 50%).

Předpoklad, že vhodnější pH bude pH=8, díky vyšší rozpustnosti substrátů ve více alkalickém prostředí, se tedy nepotvrdil. Vhodnějším pH se ukázalo být pH=6, ale rozdíl nebyl příliš výrazný. I když byly koncentrace katalytické aktivity enzymu zpočátku v obou pH srovnatelné ($a=3,5$ U), muselo v průběhu reakce dojít při pH=8 k poklesu aktivity enzymu.

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat rešerši o základních informacích o α -L-rhamnosidase a vybraných flavonoidech (hesperidin, naringin, rutin) a dále zjistit substrátovou specifitu rekombinantní α -L-rhamnosidasy. Jako substráty byly použity hesperidin, naringin a rutin.

- Nejvyšší specifitu měla α -L-rhamnosidasa k hesperidinu, nejhorším substrátem byl naringin. U hesperidinu se z časových důvodů nepodařilo upravit podmínky reakce, aby proběhla se 100% účinností. U ostatních substrátů (naringin, rutin) bylo dosaženo během 24 hodin 100% konverze.
- Z použitých pH bylo lepší pH=6, ale rozdíl mezi pH nebyl výrazný.
- Se zvyšující koncentrací substrátu je potřeba delší čas k přeměně substrátu.

8 Literatura

1. http://www.cazy.org/GH78_all.html ke dni 8.5.2012
2. Yadav, V., Yadav, P.K., Yadav, S., Yadav, K.D.S.: *Process Biochem.* **45**, 1226–1235 (2010)
3. Prakash, S., Singhal, R.S., Kulkarni, P.R.: *J. Sci. Food Agric.* **82**, 394–397 (2002)
4. Puri, M., Marwaha, S.S., Kothari, R.M., Kennedy, J.F.: *Crit. Rev. Biotechnol.* **16**, 145–155 (1996)
5. Norouzian, D., Hosseinzadeh, A., Inanlou, D.N., Moazami, N.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 501–502 (1999)
6. Manzanares, P., Orejas, M., Gil, J.V., deGraaff, L.H., Visser, J., Ramón, D.: *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7558–7562 (2003)
7. Sánchez, M.A., Romero, C., Manjón, A., Iborra, J.L.: *Biotechnol. Lett.* **9**, 871–874 (1987)
8. Yokozawa, T., Owada, S.: *Nephron* **81**, 200–207 (1999)
9. diLazzaro, A., Morana, A., Schiraldi, C., Martino, A., Ponzzone, C., deRosa, M.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **11**, 307–314 (2001)
10. Takatsu, T., Takahashi, S., Nakajima, M., Haneishi, T., Nakamura, T., Kuwano, H., Kinoshita, T.: *J. Antibiot.* **40**, 933–940 (1987)
11. Takatsu, T., Takahashi, S., Takamatsu, Y., Shioiri, T., Iwado, S., Haneishi, T.: *J. Antibiot.* **40**, 941–945 (1987)
12. Trummler, K., Effenberger, F., Syldatk, C.: *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 563–571 (2003)
13. Monti, D., Pišvejcová, A., Křen, V., Lama, M., Riva, S.: *Biotech. Bioeng.* **87**, 763–771 (2004)
14. Gestorferová, D., Fliedrová, B., Halada, P., Marhol, P., Křen, V., Weignerová, L.: *Process Biochem.* **47**, 828–835 (2012)
15. diCarlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F.: *Life Sci.* **65**, 337–353 (1999)
16. Harborne, J. B.: *Recent. Adv. Phytochem.* **4**, 107–141 (1972)
17. Bentsath, A., Rusznyak, S., Szent-Gyorgy, A.: *Nature* **138**, 798 (1936)
18. Hollman, P.C.H., Katan, M.B.: *Food Chem. Toxicol.* **37**, 937–942 (1999)
19. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J.: *J. Nutr. Biochem.* **13**, 572–584 (2002)
20. Walle, T.: *Free Radical Biol. Med.* **36**, 829–837 (2004)

21. Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K.: *Phytother. Res.* 15, 655–669 (2001)
22. Kobayashi, S., Tanabe, S., Sugiyama, M., Konishi, Y.: *Biochim. Biophys Acta* 1778, 33–41 (2008)
23. Nielsen, I.L.F., Chee, W.S.S., Poulsen, L., Offord–Cavin, E., Rasmussen, S.E., Frederiksen, H., Enslin, M., Barron, D., Horcajada, M.N., Williamson, G.: *J. Nutr.* 136, 404–408 (2006)
24. Habauzit, V., Nielsen, I.L., Gil–Izquierdo, A., Trzeciakiewicz, A., Morand, C., Chee, W., Barron, D., Lebecque, P., Davicco, M.J., Williamson, G., Offord, E., Coxam, V., Horcajada, M.N.: *Br. J. Nutr.* 102, 976–984 (2009)
25. Bokkenheuser, V.D., Shackleton, C.H.L., Winter, J.: *Biochem. J.* 248, 953–956 (1987)
26. Bouskela, E., Donyo, K.A.: *Angiology* 48, 391–399 (1997)
27. Bok, S.H., Lee, S.H., Park, Y.B., Bae, K.H., Son, K.H., Jeong, T.S., Choi, M.S.: *J. Nutr.* 129, 1182–1185 (1999)
28. Kawaguchi, K., Mizuno, T., Aida, K., Uchino, K.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 61, 102–104 (1997)
29. Jin, Y.R., Han, X.H., Zhang, Y.H., Lee, J.J., Lim, Y., Chung, J.H., Yun, Y.P.: *Atherosclerosis* 194, 144–152 (2007)
30. Miyake, Y., Kuzuya, K., Ueno, C., Katayama, N., Hayakawa, T., Tsuge, H., Osawa, T.: *Food Sci. Technol. Int., Tokyo* 4, 29–32 (1998)
31. Galati, E.M., Monforte, M.T., Kirjavainen, S., Forestieri, A.M., Trovato, A., Tripodo, M.M.: *Farmaco* 40, 709–712 (1994)
32. Jean, T., Bodinier, M.C.: *Angiology* 45, 554–559 (1994)
33. Emim, J.A.D.S., Oliiera, A.B., Lapa, A.J.: *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 118–122 (1994)
34. Crespo, M.E., Gálvez, J., Cruz, T., Ocete, M.A., Zarzuelo, A.: *Planta Med.* 65, 651–653 (1999)
35. Beiler, J.M., Martin, G.J.: *J. Biol. Chem.* 171, 507–511 (1947)
36. Beiler, J.M., Martin, G.J.: *J. Biol. Chem.* 174, 31–35 (1948)
37. Meyer, K.: *Physiol. Rev.* 27, 335–359 (1947)
38. Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Tanaka, T., Ogawa, H.: *Carcinogenesis* 18, 957–965 (1997)

39. Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Kakumoto, M., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Fukutani, K., Tanaka, T., Ogawa, H.: *Carcinogenesis* 18, 761–769 (1997)
40. Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Mori, H., Satoh, K., Hara, A., Sumida, T., Fukutani, K., Tanaka, T., Ogawa, H.: *Cancer Res.* 57, 246–252 (1997)
41. Choi, J.S., Park, K.Y., Moon, S.H., Rhee, S.H., Young, H.S.: *Arch. Pharmacol. Res.* 17, 71–75 (1994)
42. Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Giacchi, M., Pasquale, A., Bonina, F.: *Int. J. of Pharm.* 175, 85–94 (1998)
43. Felgines, C., Texier, O., Morand, C., Manach, C., Scalbert, A., Régerat, F., Rémésy, C.: *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G1148–G1154 (2000)
44. Day, A.J., DuPont, S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J.C., Morgan, M.R.A., Williamson, G.: *FEBS Lett.* 436, 71–75 (1998)
45. Choudhury, R., Chowrimootoo, G., Srail, K., Debnam, E., Rice–Evans, C.A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 410–415 (1999)
46. Kanno, S., Shouji, A., Tomizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Ujibe, M., Obara, Y., Nakahata, N., Ishikawa, M.: *Life Sci.* 78, 673–681 (2006)
47. Kanno, S., Shouji, A., Asou, K., Ishikawa, M.: *J. Pharmacol. Sci.* 92, 166–170 (2003)
48. Kanno, S., Shouji, A., Hirata, R., Asou, K., Ishikawa, M.: *Life Sci.* 75, 353–365 (2004)
49. Singh, D., Chander, V., Chopra, K.: *Toxicology* 201, 143–151 (2004)
50. Singh, D., Chander, V., Chopra, K.: *Toxicology* 201, 1–8 (2004)
51. Maridonneau–Parini, I., Braquet, P., Garay, R.P.: *Pharmacol. Res. Commun.* 18, 61–72 (1986)
52. Seo, H.J., Jeong, K.S., Lee, M.K., Park, Y.B., Jung, U.J., Kim, H.J., Choi, M.S.: *Life Sci.* 73, 933–946 (2003)
53. Shin, Y.W., Bok, S.H., Jeong, T.S., Bae, K.H., Jeoung, N.H., Choi, M.S., Lee, S.H., Park, Y.B.: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 69, 341–347 (1999)
54. Ueng, Y.F., Chang, Y.L., Oda, Y., Park, S.S., Liao, J.F., Lin, M.F., Chen, C.F.: *Life Sci.* 65, 2591–2602 (1999)

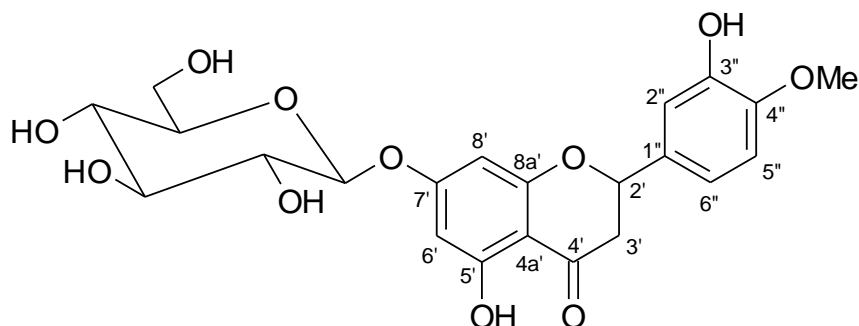
55. So, F.V., Guthrie, N., Chambers, A.F., Moussa, M., Carroll, K.K.: *Nutr. Cancer* 26, 167–181 (1996)
56. Francis, A.R., Shetty, T.K., Bhattacharya, R.K.: *Carcinogenesis* 10, 1953–1955 (1989)
57. Ekambaram, G., Rajendran, P., Magesh, V., Sakthisekaran, D.: *Nutr. Res.* 28, 106–112 (2008)
58. Peter, F., Kim, D.H.: *Carcinogenesis* 11, 2275–2279 (1990)
59. Metodiewa, D., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickancaité, E., Segula–Aguilar, J.: *Free Radical Biol. Med.* 26, 107–116 (1999)
60. Webb, M.R., Ebeler, S.E.: *Biochem. J.* 384, 527–541 (2004)
61. Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 618–621 (2002)
62. Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., Remesy, C.: *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 277, G120–G126 (1999)
63. Wolfram, S., Blöck, M., Ader, P.: *J. Nutr.* 132, 630–635 (2002)
64. Cermak, R., Landgraf, S., Wolfram, S.: *Br. J. Nutr.* 91, 849–855 (2004)
65. Ader, P., Blöck, M., Pietzsch, S., Wolfram, S.: *Cancer Lett.* 162, 175–180 (2001)
66. Arts, I.C.W., Sesink, A.L.A., Hollman, P.C.H.: *J. Nutr.* 132, 2823 (2002)
67. Kottra, G., Daniel, H.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322, 829–835 (2007)
68. Walgren, R.A., Karnaky, K.J., Lindenmayer, G.E., Walle T.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 830–836 (2000)
69. Jung, S.H., Kim, B.J., Lee, E.H., Osborne, N.N.: *Neurochemistry* 57, 713–721 (2010)
70. Kook, D., Wolf, A.H., Yu, A.I., Neubauer, A.S., Priglinger, S.G., Kampik, A., Welge–Lussen, U.C.: *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 49 1712–1720 (2008)
71. Maher, P., Hanneken, A.: *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 46 4796–4803 (2005)
72. Hernandez, M.F., Falé, P.L.V., Araújo, M.E.M., Serralheiro, M.L.M.: *Food Chem.* 120 1076–1082 (2010)
73. Perez–Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos–Buelga, C., Osuna, A.: *Pharmacol. Rep.* 61 67–75 (2009)
74. Cassidy, A., O’Reilly É.J., Kay, C., Sampson, L., Franz, M., Forman, J.P., Curham, G., Rimm, E.B.: *Am. J. Clin. Nutr.* 93 338–347 (2011)

75. Juźwiak, S., Wójcicki, J., Mokrzycki, K., Marchlewicz, M., Bialecka, M., Wenda-Rózewicka, L., Gawrońska-Szklarz, B., Drożdżik, M.: *Pharmacol. Rep.* 57 604–609 (2005)
76. Rogerio, A.P., Kanashiro, A., Fontanari, C., da Silva, E.V.G., Lucisano-Valim, Y.M., Soares, E.G., Faccioli, L.H.: *Inflammation Res.* 56 402–408 (2007)
77. Itoh, T., Ohguchi, K., Nakajima, C., Oyama, M., Iinuma, M., Nozawa, Y., Akao, Y., Ito, M.: *Food Chem.* 126, 289–294 (2011)
78. Fernandez, J., Reyes, R., Ponce, H., Oropeza, M., vanCalsteren, M.R., Jankowski, C., Campos, M.G.: *Eur. J. Pharmacol.* 522, 108–115 (2005)
79. Shen, S.C., Lee, W.R., Lin, H.Y., Huang, H.C., Ko, C.H., Yang, L.L., Chen, Y.C.: *Eur. J. Pharmacol.* 446, 187–194 (2002)
80. Xing, N., Chen, Y., Mitchell, S.H., Young, C.Y.F.: *Carcinogenesis* 22, 409–414 (2001)
81. Borska, S., Sopel, M., Chmielewska, M., Zabel, M., Dziegel, P.: *Molecules* 15, 857–870 (2010)
82. Arma, H., Ashida, H., Danno, G.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 66, 1009–1014 (2002)
83. Amoros, M., Simoes, C.M.O., Girre, L., Sauvager, F., Cormier, M.: *J. Natur. Prod.* 55, 1732–1740 (1992)
84. Romero, C., Manjón, A., Bastida, J., Iborra, J.L.: *Anal. Biochem.* 149, 566–571 (1985)

9 Přílohy

9.1 NMR data derhamnosylovaných produktů

Hesperetin-glc



NMR spektroskopie:

Přístroj: Bruker Avance III 600 MHz (600.23 MHz pro ^1H , 150.94 MHz pro ^{13}C , CD_3OD , 30°C)

Provedená stanovení: ^1H , ^{13}C , gCOSY, gHSQC, gHMBC.

Tab. 9.1|NMR data hesperetin-glc

Atom	δ_{X}	m.	δ_{H}	n_{H}	m.	J[Hz]	HMBC (C to H)
1	101.55, 101.58	D	5.008, 4.998	1	d	7.IV	
2	74.97	D	3.46 ^a	1	m		1 w
3	78.12	D	3.48 ^a	1	m		1
4	71.50	D	3.42 ^a	1	m		6u, 6d
5	78.57	D	3.48 ^a	1	m		1, 6u, 6d w
6	62.66	T	3.903, 3.899	1	dd	12.1, 2.7	
			3.723, 3.715	1	dd	12.1, 5.3	
2'	80.74, 80.80	D	5.402, 5.396	1	dd	12.4, 3.1	3'd, 2'c, 6''
			3.146	1	dd	17.2, 12.4	
3'	44.32, 44.46	T	2.815, 2.804	1	dd	17.2, 3.1	2' w
4'	198.68	S	-				2', 3'u, 3'd, 6' w, 8'
4a'	105.30, 105.27	S	-				3'u, 6', 8'
5'	165.20, 165.23	S	-				6'

6 ^c	98.36	D	6.215, 6.213	1	d	2.I	8 ^c
7 ^c	167.29, 167.36	S	-				1, 6 ^c , 8 ^c
8 ^c	97.32, 97.29	D	6.245, 6.248	1	d	2.I	6 ^c
8a ^c	164.77, 164.78	S	-				2 ^c , 8 ^c
1 ^u	133.18, 133.21	S	-				2 ^c , 3 ^u , 3 ^d , 2 ^u , 5 ^u , 6 ^u
2 ^u	114.93, 114.92	D	6.984	1	d	1.IX	2 ^c , 5 ^u , 6 ^u
3 ^u	148.12	S	-				2 ^c , 5 ^u , 6 ^u
4 ^u	149.75	S	-				2 ^c , 5 ^u , 6 ^u , OMe
5 ^u	112.98	D	6.966	1	d	8.III	2 ^c , 6 ^u
6 ^u	119.41, 119.39	D	6.939	1	dd	8.3, 1.9	2 ^c , 2 ^u , 5 ^u
OMe	56.80	Q	3.888	3	s		

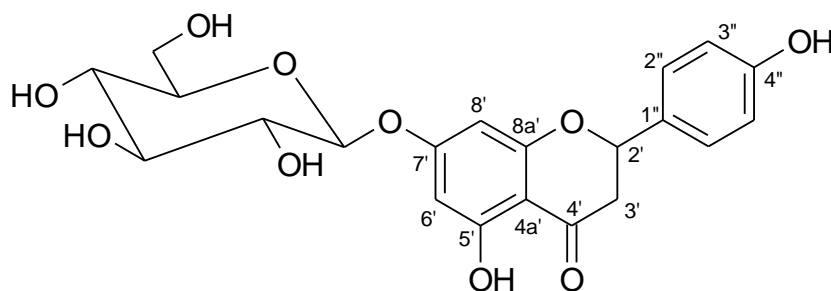
^a odečet z HSQC

s – singlet, d – dublet, dd – dublet dubletů, m – multiplet, J – interakční konstanta

Poměr diastereomerů je cca 3:2

V tabulce jsou uvedeny chemické posuny nejprve pro hlavní složku, potom pro minoritu

Prunin



NMR spektroskopie:

Přístroj: Bruker Avance III 600 MHz (600.23 MHz pro ¹H, 150.94 MHz pro ¹³C, CD₃OD, 30°C)

Provedená stanovení: ¹H, ¹³C, gCOSY, gHSQC, gHMBC.

Tab. 9.2|NMR data pruninu

Atom	δ_X	m.	δ_H	n_H	m.	J[Hz]	HMBC (C to H)
1	101.55, 101.58	D	4.993, 5.004	1	d	7.II	2
2	74.97, 74.98	D	3.46 ^a	1	m		
3	78.13	D	3.47 ^a	1	m		1, 4
4	71.49, 71.50	D	3.41 ^a	1	m		6u w, 6d
5	78.57, 78.58	D	3.48 ^a	1	m		1, 4, 6u, 6d w
6	62.68	T	3.897, 3.898 3.710	1 1	dd dd	12.2, 2.3 12.2, 5.0	4 w
2'	80.96, 81.00	D	5.414, 5.419	1	dd	12.8, 3.0	3'd, 2''
3'	44.29, 44.43	T	3.192, 3.193 2.784, 2.792	1 1	dd dd	17.2, 12.8 17.2, 3.0	
4'	198.87	S	-	0			2', 3'u, 3'd, 6' w
4a'	105.25, 105.27	S	-	0			3'u, 6', 8'
5'	165.23, 165.27	S	-	0			6'
6'	98.33, 98.34	D	6.213, 6.216	1	d	2.I	8'
7'	167.29, 167.36	S	-	0			1, 6', 8'
8'	97.25, 97.27	D	6.235, 6.238	1	d	2.I	6'
8a'	164.91, 164.92	S	-	0			2' w, 8'
1''	131.14, 131.18	S	-	0			2' w, 3'u, 3'd, 3''
2''	129.39, 129.41	D	7.343	2	d	1.IX	2', 2''
3''	116.67, 116.68	D	6.844	2			2'', 3''
4''	159.39, 159.40	S	-	0			2'', 3''

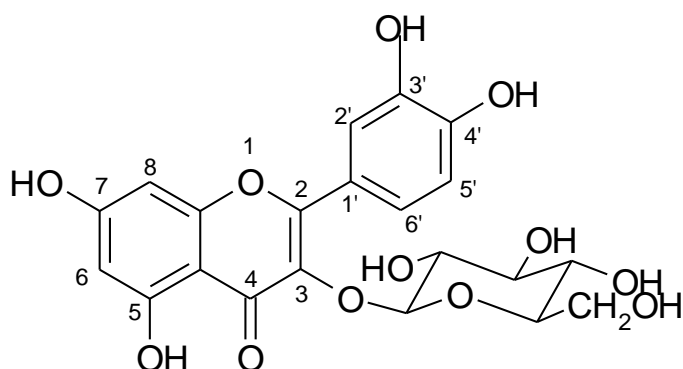
^a odečet z HSQC

d – dublet, dd – dublet dubletů, m – multiplet, J – interakční konstanta

Poměr obou diastereomerů je cca 1:1

V tabulce jsou uvedeny chemické posuny v pořadí up-field, down-field

Isoquercitrin



NMR spektroskopie:

Přístroj: Varian Mercury-300 (300.07 MHz for ^1H , 75.45 MHz for ^{13}C , DMSO- d_6)

Provedená stanovení: ^1H , ^{13}C , gCOSY.

Literatura: 1. M. Bouktaib, A. Atmani, Ch. Rolando *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6263-6266

NMR data porovnána (300.07 MHz pro ^1H , 75.45 MHz pro ^{13}C , CD_3OD , pokojová teplota) s literaturou¹

Tab. 9.3|NMR data isoquercitrinu

Atom	δ_{X}	$\delta_{\text{X}}^{\alpha}$	m.	δ_{H}	$\delta_{\text{H}}^{\alpha}$	n_{H}	m.	J[Hz]
2	159.28	159.00	S	-	-	0		
3	135.90	135.65	S	-	-	0		
4	179.73	179.41	S	-	-	0		
5	163.30	162.93	S	-	-	0		
6	100.28	99.98	D	6.376	VI.33	1	d	2.0
7	166.59	165.91	S	-	-	0		
8	95.08	94.75	D	6.188	VI.15	1	d	2.0
9	158.76	158.37	S	-	-	0		
10	105.88	105.67	S	-	-	0		
1'	123.35	123.04	S	-	-	0		
2'	117.85	117.62	D	7.710	VII.70	1	d	2.0
3'	146.19	145.76	S	-	-	0		

4^c	150.15	<i>149.81</i>	S	-	-	0		
5^c	116.30	<i>116.00</i>	D	6.865	<i>VI.75</i>	1	d	8.VIII
6^c	123.49	<i>123.23</i>	D	7.580	<i>VII.57</i>	1	dd	8.8, 2.0
1^{cc}	104.64	<i>104.32</i>	D	5.239	<i>V.23</i>	1	d	7.V
2^{cc}	76.01	<i>75.73</i>	D			1	m	
3^{cc}	78.66	<i>78.34</i>	D	3.20 – 3.52		1	m	
4^{cc}	71.49	<i>71.19</i>	D		3.18 – 3.78	1	m	
5^{cc}	78.40	<i>78.10</i>	D			1	m	
6^{cc}	62.83	<i>62.55</i>	T	3.578		1	dd	11.8, 5.4
				3.718		1	dd	11.8, 2.4

^a lit.¹

d – dublet, dd – dublet dubletů, m – multiplet, J – interakční konstanta