

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Adéla Bártová

Enzymatické oxidace alkoholů v biosyntéze feromonů čmeláků

Enzymatic oxidations of alcohols in biosynthesis of bumblebee
pheromones

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Irena Valterová, CSc.

Praha 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou 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 vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

Adéla Bártová

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Ireně Valterové, CSc., Mgr. Michalu Tupcovi a Ing. Janě Brabcové, Ph.D., za pomoc při řešení mé bakalářské práce a za celkovou ochotu, trpělivou pomoc a poskytnuté rady, bez nichž by tato práce nevznikla. Můj dík náleží také celé výzkumné skupině *Infochemikálie* na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za celkovou vstřícnost.

Zvláště pak děkuji Mgr. Michalu Tupcovi za pomoc při vyhodnocení dat z nukleární magnetické resonance a za veškeré rady ohledně výběru a provedení měření, kterými mě podporoval po celou dobu výzkumu, a panu Mgr. Jiřímu Kindlovi, Ph.D., za laskavé poskytnutí biologického materiálu a fotografií čmeláčích hnízd.

Dále bych ráda poděkovala rodičům za umožnění studia jako takového.

Tato práce vznikla za finanční podpory v rámci projektu GAČR (15-06569S) a projektu na podporu ÚOCHB (RVO61388963).

Abstrakt

Sekret labiální žlázy samce velmi rozšířeného čmeláka zemního (*Bombus terrestris*) obsahuje směs terpenových alkoholů, alifatických alkoholů, esterů a alkanů s malým množstvím aldehydů potenciálně odvozených od majoritních alkoholů (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu a geranyleitronellolu. Tento sekret slouží jako značkovací a vábící feromon při patrolování.

Tato práce je zaměřena na studium oxidace terpenových alkoholů pomocí enzymů z hlavové labiální žlázy čmeláka. Byly provedeny *in vitro* inkubace homogenátu labiální žlázy s různými substráty: *E,E*-farnesol, geraniol, (*S*)-2,3-dihydrofarnesol, hexadekanol. Podmínky inkubací a následné analýzy pomocí plynové chromatografie byly postupně optimalizovány. U farnesolu a geraniolu byly detekovány dva produkty, které byly posléze identifikovány s využitím chemické oxidace pomocí pyridinium-chlorchromátu a následného měření NMR spekter a MS spekter jako dva isomery na 2,3-dvojně vazbě. Hexadekanol nebyl oxidován.

klíčová slova: plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, *Bombus terrestris*, terpenové alkoholy

Abstract

Secretion of cephalic labial gland of Buff-tailed bumblebee males (*Bombus terrestris*) contains a mixture of terpene alcohols, aliphatic alcohols, esters and alkanes with small amount of aldehydes potentially biosynthesized of (*S*)-2,3-dihydrofarnesol and geranylcitronellol (major alcoholic compounds). This secretion acts as a marking and luring pheromone during patrolling. This study is focused on oxidation of terpene alcohols using enzymes of cephalic labial gland of a bumblebee. *In vitro* incubations were accomplished with homogenate of cephalic labial gland and a various substrates: *E,E*-farnesol, geraniol, 2,3-dihydrofarnesol, hexadecanol.

Conditions of incubations and following analysis using gas chromatography were optimized. Two products were detected of farnesol and geraniol incubations, which then later were identified using chemical oxidation with pyridinium-chlorochromate, measurement of NMR specters and MS specters, as two isomers of 2,3-bond. Hexadecanol was not oxidized.

key words: gas chromatography, mass spectrometry, *Bombus terrestris*, terpene alcohols

Obsah

1	Úvod	10
1.1	Čmelák zemní	10
1.1.1	Životní cyklus čmeláka zemního	10
1.1.2	Sexuální feromony a páření čmeláka zemního	12
1.2	Metody stanovení geraniol- a farnesoldehydrogenáz	19
2	Cíl práce	23
3	Experimentální část	24
3.1	Materiál	24
3.1.1	Použité chemikálie	24
3.1.2	Pufry a roztoky	24
3.1.3	Biologický materiál	25
3.1.4	Přístrojové vybavení	25
3.1.5	Výpočetní technologie	26
3.1.6	Ostatní materiál	26
3.2	Metody	26
3.2.1	<i>In vitro</i> inkubace	26
3.2.2	Analytické metody	29
4	Výsledky a diskuze	33
4.1	<i>In vitro</i> inkubace	33
4.2	Oxidace alkoholů pomocí pyridinium-chlorchromátu	42
5	Závěr	49
6	Seznam použité literatury	50

Seznam zkratk a symbolů

%v	objemové procento
CLG	hlavová část labiální žlázy (z anglického <i>cephalic labial gland</i>)
CoA	koenzym A (z anglického <i>coenzyme A</i>)
COSY	korelační spektroskopie (z anglického <i>correlation spectroscopy</i>)
DAG	diacylglycerol
FID	plamenoionizační detektor (z anglického <i>flame ionization detector</i>)
FaDH	farnesoldehydrogenáza
FAS	syntáza mastných kyselin (z anglického <i>fatty acid synthase</i>)
GC	plynová chromatografie (z anglického <i>gas chromatography</i>)
GC/EAD	plynová chromatografie s elektroantenografickou detekcí (z anglického <i>gas chromatography coupled with electroantennographic detection</i>)
GeDH	geranioldehydrogenáza
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonová kyselina
HMG-CoA-reduktáza	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktáza
HPLC	vysokoúčinná kapalinná chromatografie s UV detekcí (z anglického <i>high-performance liquid chromatography</i>)
JH III	juvenilní hormon III
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>mass spectrometry</i>)
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a nábojového čísla iontu
NAD ⁺	nikotinamidadeninukleotid
NADP ⁺	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická resonance
PCC	pyridinium-chlorchromát
PCR	polymerázová řetězová reakce (z anglického <i>polymerase chain reaction</i>)
RPM	otáčky za minutu (z anglického <i>rotation per minute</i>)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (z anglického <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
TAG	triacylglycerol
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z anglického <i>thin-layer chromatography</i>)
<i>t_R</i>	retenční čas, [<i>t</i>] = min
UV	ultrafialová oblast záření (z anglického <i>ultraviolet</i>)
VIS	viditelná oblast záření (z anglického <i>visible</i>)
λ	vlnová délka, [λ] = nm
δ	chemický posun, [δ] = ppm

1 Úvod

Blanokřídlý hmyz a konkrétně čmeláci se v posledních letech stávají cílem intenzivního výzkumu. Zástupci čeledi včelovitých (Apidae) se uplatňují jako modelové organismy pro studium altruistického společenství a jeho genetického základu, v zemědělství jako ekonomicky významní opylovači, a též jako bioindikátory zdraví ekosystémů. Stejně jako včely, mravence a termity řadíme většinu druhů čmeláků mezi sociální hmyz, přičemž zásadním prvkem řídícím toto jejich společenské a kastovní chování jsou feromony vylučované různými endokrinními žlázami jednotlivých členů společenstva [1]. Enzymy nezbytné pro tvorbu těchto feromonů, stejně jako bioaktivní sloučeniny sloužící čmelákovi jako výchozí látky, jsou často velmi podobné jako u řady dříve zkoumaných organismů, například u jiných druhů hmyzu (lišaj tabákový) popřípadě u rostlin (čeleď zázvorníkovité) [2,3]. Studium biosyntetických drah vzniku čmeláčích feromonů lze proto mimo jiné zakládat na této podobnosti a předchozích studiích.

Čmelák zemní (*Bombus terrestris*) byl pro studium zvolen záměrně, neboť se jedná o druh v mnoha směrech probádaný a případné výsledky lze posléze vyložit v širších souvislostech. Z předchozích prací lze předpokládat, že enzymy hlavové části labiální žlázy samce čmeláka zemního slouží jedinci ke tvorbě vábicích feromonů, jejichž účelem je lákat mladé neoplozené matky během patrolování [1,4]. Tato práce je zaměřená konkrétně na vznik obsahově minoritních složek směsi sloučenin v labiální žláze – aldehydů 2,3-dihydrofarnesalu a geranylcitronellalu.

1.1 Čmelák zemní

1.1.1 Životní cyklus čmeláka zemního

Taxonomické členění čmeláků a pačmeláků se u různých autorů poněkud liší [5]. Patří do nadčeledi blanokřídlého hmyzu Apoidea, u níž se dělení rozchází buď na čeleď Apidae, v rámci které jsou definovány dva rody, *Bombus* a *Psithyrus*, nebo na samostatnou čeleď Bombidae. Ovšem i samotné zařazení jednotlivých druhů je problematické a podstatně se liší.

Dělení je založeno na mnoha faktorech, jakými jsou například výskyt, délka diapauzy, životní cyklus jednotlivých druhů čmeláka, složení feromonů labiální žlázy samců a podobně. Velmi zajímavým faktorem pak je zbarvení u čmeláků i pačmeláků (chovajících se podobně jako kukačky u ptáků), variabilní na základě prostředí a vykazující mimo jiné znaky Müllerových mimiker, v případě pačmeláků též často napodobující hostitelský druh čmeláka [5,6].

V České republice stabilně nacházíme 28 druhů čmeláků [7]. Konkrétně *B. terrestris* se vyznačuje zpravidla žlutým proužkem na předohrudí a v horní polovině zadečku, bílým koncem zadečku a velmi hlubokým tónem bzučení, které vydává matka. Existují ovšem i poddruhy s celočernou hrudí a různou intenzitou jednotlivých pruhů [8]. Hnízdo čmeláka zemního a zbarvení jedinců lze vidět na Obr. 1.1.



Obr. 1.1: Hnízdo čmeláka zemního (*B. terrestris*), chov v laboratorních podmínkách (Mgr. J. Kindl, Ph.D.).

Životní cyklus *B. terrestris* a mnohých dalších druhů čmeláků se v mnohém podobá tomu včelímu [1]. Oplozená matka vylétá v první polovině března, přičemž čím je mohutnější, tím později vylétá, a ihned hledá vhodné místo pro založení kolonie, v podmínkách mírného pásu jednoleté [5]. Existují i případy, kdy dochází ke konkurenčnímu zabírání hnízd už založených příslušnicí vlastního druhu, často i k zabíjení konkurentek.

Když matka nalezne vhodné hnízdo, vytvoří průměrně 3–8 vaječných buněk a naklade vajíčka (v každé buňce průměrně 2 vajíčka) [9]. Jakmile si larvy vytvoří

kokony, naklade na ně matka další sadu vaječných buněk (v každé průměrně 5 vajíček). Matka krmí potomky nasbíraným nektarem, dokud se během 20–25 dnů nevylihnuou první dělnice, což je pro matku impuls, aby nadále setrvala pouze v hnízdě a kladla další vaječné buňky (1–2 buňky denně), přičemž o sběr potravy se začnou starat právě dělnice. Není zcela jasné, co rozhoduje o tom, zdali se z dalších oplodněných vajíček vylihnuou další dělnice, nebo nové mladé matky – nabízí se závislost na druhu potravy, teplotě v hnízdě apod.

V hnízdě *B. terrestris*, nacházejícím se zpravidla v podzemní dutině na teplém a slunném stanovišti, se v závislosti na období a kvalitě potravy vyskytuje obvykle 100–800 jedinců [9].

Postupem času začne původní matka stárnout, klást neoplozená vajíčka a ztrácet feromonální nadvládu v hnízdě (tato fáze je nazývána bod zvratu = *switch point*, dochází k němu 6.–13. nebo 18.–22. den od začátku eusociální fáze života matky), což vyústí ve vyšší agresivitu dělnic vůči matce a vývoj a zrání vaječnicků u dělnic, které posléze též kladou neoplozená vajíčka a soupeří mezi sebou o nadvládu (*competition point*) [6,4]. V tomto bodě stará matka umírá. Začne upadat termoregulační schopnost hnízda. Mladé samice mezitím vylétají z hnízda a kopulují s pokud možno nepříbuznými samci, což je umožněno díky různé době líhnutí samců a mladých samic a také díky různé specializaci jednotlivých hnízd – hnízda s dřívějším bodem zvratu produkují převážně samce, hnízda s pozdějším bodem zvratu pak mladé matky.

Páření u *B. terrestris* trvá cca půl hodiny. Do dalšího jara přezimují jen oplozené samičky, období jejich zimního spánku se pak označuje jako diapauza [5].

B. terrestris je z genetického hlediska řazen mezi haplodiploidní organismy, u nichž je samice vždy diploidní, zatímco samci se líhnou z neoplozených vajíček, tudíž jsou haploidní [9]. Existuje teorie, že tento fakt je příčinou altruistického chování celého společenství.

1.1.2 Sexuální feromony a páření čmeláka zemního

Pro živé organismy, řád Hymenoptera nevyjímaje, je nezbytná schopnost vzájemné komunikace, ať už jde o jakýkoliv aspekt jejich života. Nezastupitelnou roli v tomto směru hraje široké spektrum chemických látek, souhrnně zvaných semiochemikálie, které podle jejich primárního účelu dělíme na feromony (určené k vnitrodruhové

komunikaci) a allelochemikálie (určené k mezidruhové komunikaci) [10,11]. Allelochemikálie se pak dále dělí na allomony, kairomony a synomony, a to podle jejich výhodnosti pro jednotlivé strany komunikace. Feromony pak lze rozdělit na sexuální, agregační, poplašné, značkovací, identifikační a dispersní.

Různé druhy hmyzu volí pro tvorbu svých chemických signálů různé strategie, ať už se jedná o biotransformaci látek z potravy, nebo tvorbu feromonů *de novo* ze základních dvou- nebo tříuhlíkatých řetězců [12]. Pochopení způsobu vzniku a fungování „chemické řeči“ je klíčové pro studium chování a fungování hmyzího společenství a také pro výzkum evolučních vztahů mezi primárním metabolismem a vývojově mladším sekundárním metabolismem.

U čmeláků nacházíme velmi široké spektrum semiochemikálií, sloužících k řízení celé kolonie, samotný jedinec je pak evolučně adaptován tyto látky vnímat speciálně uzpůsobenými orgány [13,14]. Zatímco u včel jsou feromony poměrně podrobně probádané, vývojově nižší druhy společenského hmyzu jako čmeláci jsou cílem dalšího výzkumu. Přesto už nyní víme, že feromony hrají v životě čmeláků i pačmeláků zásadní roli. Čmelákům slouží k „chemické řeči“ soubor až 500 alifatických sloučenin. Jedná se spíše o strukturně jednodušší látky, jakými jsou nasycené a nenasycené alifatické uhlovodíky s lichým počtem uhlíků (C10–C35, dvojná vazba nese konfiguraci *Z*) a kyslíkaté látky se sudým počtem uhlíků. Tyto látky mají široké spektrum funkcí od značení vlastního hnízda (čehož využívají i parazitující pačmeláci, když vyhledávají hostitele) a značení zdrojů potravy, přes samčí vábení mladých matek, až po signály hladu u larev. Kutikulární lipidy pak například zajišťují vzájemné rozpoznávání jedinců [15].

Zajímavým faktorem je, že dle některých studií potřebují dělnice kromě samotného feromonu být s královnou i v občasném fyzickém kontaktu, aby respektovaly její přítomnost [4].

Z exokrinních žláz je u matek nejdůležitější mandibulární žláza, která produkuje látky na krátkou vzdálenost vyvolávající v samcích sexuální chování, a zároveň uvolňující feromon korigující vývoj kast ve společenství [1]. Samotné dělnice se zároveň na základě podobnosti svých feromonů těm mateřským dělí mezi sebou na různě specializované skupiny. Nalézáme dělnice dominantní, podrázené a létavky (zásobovačky, shánějící nektar a pyl) – čím víc se spektrum feromonů podobá královně,

tím dominantnější dělnice je. Mateří látka primárně inhibuje činnost přilehlých tělísek (*corpora allata*) dělnic a tím i biosyntézu jejich juvenilního hormonu (dělnicím se proto nevyvíjejí vaječníky).

V mandibulární žláze nacházíme zejména kyselinu (*E*)-9-oxodec-2-enovou, 3-hydroxydekanovou a oktadekanovou (tyto kyseliny slouží právě jako mateří tlumící látka), dále pak obranné látky (z nich je nejvíce zastoupena kyselina máselná), krátké alkoholy a ketony, dále geraniol a citronellool. Již nyní víme, že obranné látky nejsou specifické pro kastu [1].

U dělnic byla zkoumána zejména takzvaná Dufourova žláza, umístěná v zadečku, vylučující látky s řetězci s lichým počtem uhlíků (C₂₉), přičemž variabilita rozložení množství jednotlivých řetězců C₂₃–C₂₉ umožňuje odlišit jednotlivé kolonie od sebe. Dále byly zkoumány tarsální (chodidlové) žlázy, sloužící ke značení zdrojů potravy. Tarsální žlázy na rozdíl od Dufourovy a mandibulární žlázy obsahují pouze uhlovodíky [1,5]. Ukázalo se, že strategie svolávání a shánění potravy nejsou tak rozvinuté jako u včel, přesto jsou čmeláci schopni odlišit bohatý a již vyčerpaný zdroj potravy podle značení ostatních čmeláků [4].

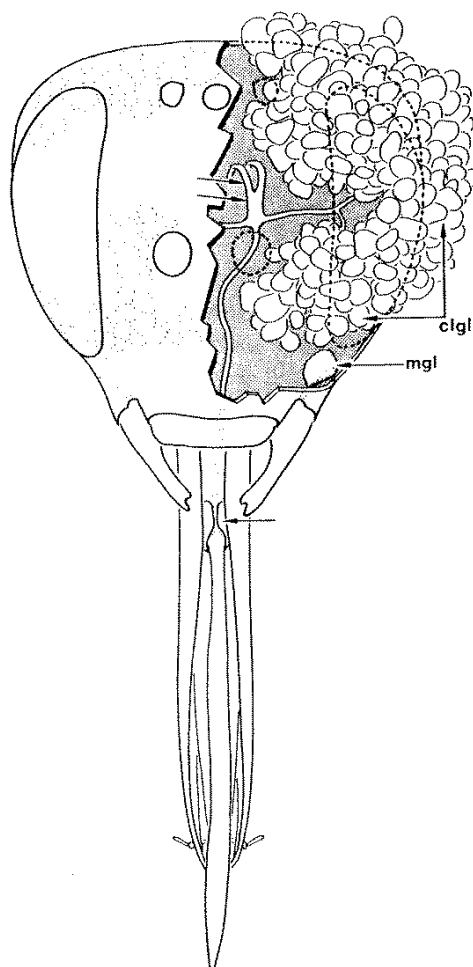
Další významnou exokrinní žlázou čmeláka je labiální žláza, vyskytující se jak u samců, tak u samic. Zatímco u samců zabírá většinu prostoru hlavy a její obsah je poměrně dobře probádaný, u samic proběhlo její zkoumání zatím v mnohem menší míře. Chemické složení látek v této samičí labiální žláze bylo u druhu *B. terrestris* studováno jak u dělnic, tak u matek, a to v různých sociálních podmínkách. Ukázalo se, že zatímco labiální žlázy neplodných dělnic obsahují převážně estery mastných kyselin (dodecylhexanoát až dodecyl-(*Z*)-9-oktadecenoát), plodné matky jich mají minimum, dokud nezačnou ztrácet nadvládu nad hnízdem, kdy se i u nich obsah těchto esterů začne postupně zvyšovat [16].

Samostatnou otázkou jsou poté hlavové labiální žlázy samců čmeláků, sloužící k produkci vábicích feromonů využívaných při páření. V tomto ohledu je nutné zmínit typy samčího sexuálního chování; samci čmeláků a pačmeláků při páření vykazují tři typy chování. Jsou jimi:

- **Patrolování** (*patroling*), které má někdy až formu tokání jako u hrabavých ptáků, kdy si samec vytyčí určitou oblast, kterou pravidelně kontroluje

a značkuje svými feromony z hlavové části labiální žlázy. U pačmeláků byl doposud zaznamenán pouze tento druh chování [15].

- Dále pak takzvané **čihání** (*perching*), nejvíce popsané u druhu *Bombus confusus*, kdy samec sice má labiální žlázu, ale zdaleka nevytyčuje území tolik jako při patrolování, pouze si označí některá významná stanoviště, odkud posléze aktivně nalétává na jakýkoliv ve vzduchu se pohybující předmět připomínající samičku [17].
- Posledním typem pak je **vyčkávání u hnízda**, kdy samci cíleně vyhledávají hnízda svého druhu a hlídkují kolem nich, přičemž se chovají teritoriálně až agresivně. Je třeba zmínit, že někteří čmeláci navíc kombinují tyto strategie [15].



Obr. 1.2: Uspořádání hlavové části labiální žlázy a její umístění v hlavě čmeláčího samce. (clgl = hlavová část labiální žlázy (*cephalic labial gland*), mgl = mandibulární žláza (*mandibular gland*)) [18].

Samci *B. terrestris* jako strategii využívají patrolování, takzvané svatební lety. Samec hlídkuje v různých vzdálenostech, přičemž cestou vylučuje značkovací feromony tak, že se tře o různé předměty (přízemní byliny, větvičky a tráva). Jeho chování je výrazně ovlivněno povětrnostními podmínkami. Za slunných, teplých dnů samci vylétají dříve a končí značkování později (zajímavým faktorem jsou v tomto směru opět pačmeláci, kteří v mírném chladnu neznačkují vůbec). Látky vylučované ústy samce, pocházejí z hlavové části labiální žlázy, fungují jako atraktanty (přilákají samičku) a arestanty (zdrží ji na místě), proto také některé složky těchto feromonů nejsou příliš těkavé a vydrží dlouhou dobu na místě aplikace [1,15]. Uspořádání hlavové části labiální žlázy samce čmeláka je vyobrazeno na obr. 1.2 (strana 15).

Při studiu hmyzích feromonů obecně se uplatňuje zejména metoda aplikace značených prekursorů feromonů. Značení ve struktuře substrátu probíhá například stabilním isotopem (^{13}C , ^2H , ^{18}O , ^{15}N , ^{31}P), nestabilním isotopem (^{14}C , ^3H , ^{19}F) [12].

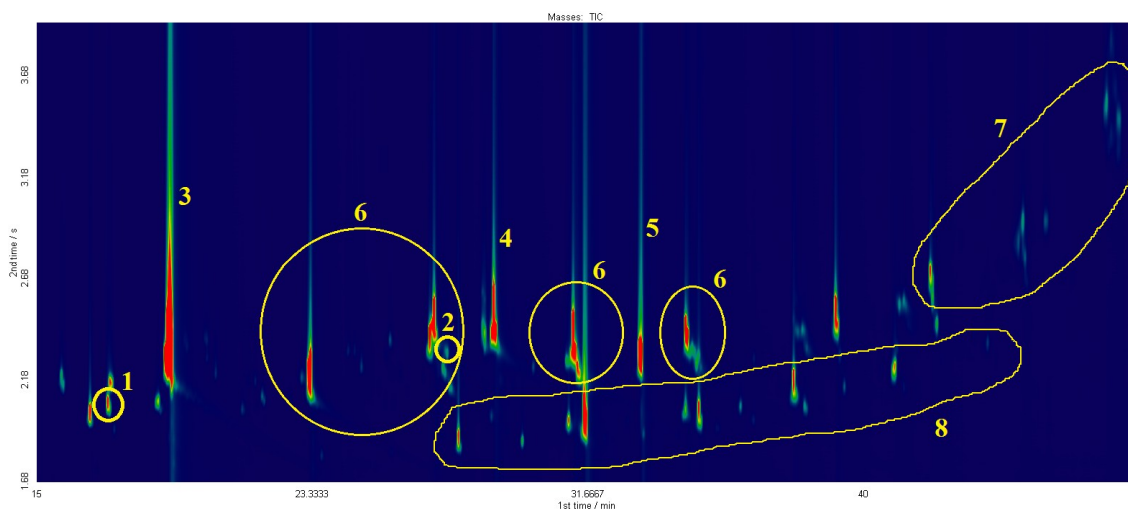
Co do chemické povahy jsou sexuální feromony poměrně široká skupina látek [19]. U významné části zástupců řádu motýlů (Lepidoptera) tomuto účelu slouží omezený počet typů nenasycených esterů, alkoholů, aldehydů. Jedná se o látky s řetězcí v rozmezí 10–16 uhlíků (u 77% prozkoumaných druhů), které se sice ve výsledku vzájemně liší u jednotlivých druhů, ale zachovávají délku řetězce a pozici dvojnás vazby. *In vivo* i *in vitro* studie potvrzují, že například u modelového obaleče smrkového (*Choristoneura fumiferana*) biosyntéza aldehydových feromonů probíhá z acetátového prekurzoru.

Konkrétně u čmeláků a pačmeláků je pak složení feromonů hlavové části labiální žlázy známé asi u 50 druhů. Směsi jsou druhově specifické [4]. Byly mezi nimi nalezeny monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, alifatické alkoholy, aldehydy a různé deriváty mastných kyselin, nasycené a nenasycené uhlovodíky s lichým počtem uhlíků (C21-C27). V sekretu nacházíme z terpenů například citronellool, dihydrofarnesol, geranyl citronellool, geranyl linalool a odvozené estery [13]. GC×GC/MS chromatogram extraktu hlavové části labiální žlázy samce *B. terrestris* je uveden na obr. 1.3 (strana 17).

Byly též zkoumány biochemické cesty vzniku těchto feromonů u druhů *B. lucorum* a *B. lapidarius*, a to pomocí deuteriem značené kyseliny palmitové, jejíž metabolity byly po podání do zadečku samců obou druhů detekovatelné v labiální

žláze. U druhu *B. lucorum* byl takto identifikován ethyl-[²H₂₉]-hexadec-9-enoát a ethyl-[²H₃₁]-hexadekanoát a u *B. lapidarius* [²H₃₁]-hexadekan-1-ol a [²H₂₉]-Z-hexadec-9-en-1-ol. Dále se zjistilo, že tento značený prekurzor se včlenil i do triacylglycerolů v tukovém tělese samců [20]. Složky feromonu hlavové části labiální žlázy se osvědčily jako spolehlivá reference při rozlišování jednotlivých druhů čmeláků (například u *B. lucorum*, který se často liší zbarvením i v rámci druhu) [21].

U *B. terrestris* se jako dominantní složka projevují seskviterpen terrestrol ((*S*)-2,3-dihydrofarnesol) v zastoupení 58 % a ester ethyl-dodekanoát (15 %), jejich zastoupení, konfigurace a biosyntéza byly posléze zkoumány pomocí isotopově značených látek, podávaných čmelákům v potravě [14], dále pak geranylcitronello, 2,3 dihydrofarnesylacetát, tetradekanol, hexadekanol, ethyl-tetradekanoát, ethyl-[²H₂₉]-hexadec-9-enoát a ethyl-[²H₃₁]-tetradec-9-enoát. Absolutní konfigurace byla metodou měření optické rotace a přípravy diastereoizomerů potvrzena zatím u terrestrolu (*S*-enantiomer) u *B. terrestris* [1] a nově také u citronellolu a 2,3-dihydrofarnesalu u jiných druhů čmeláků [22].



Obr. 1.3: GC×GC/MS chromatogram chloroformového extraktu CLG 2denního samce *B. terrestris* se zvýrazněním majoritních sloučenin. 1 2,3-dihydrofarnesal, 2 geranylcitronellal, 3 (*S*)-2,3-dihydrofarnesol, 4 geranylcitronello, 5 bromeikosan (interní standard), 6 alkoholy, 7 voskové estery, 8 alkany, alkeny.

Není známo, že by se terrestrol a 2,3-dihydrofarnesylacetát vyskytovaly ve větší míře i u jiných prozkoumaných druhů čmeláka. Zato geranylcitronello je dominantní složkou u pačmeláka *Bombus* (dříve *Psithyrus*) *rupestris*, v menší míře u čmeláka *B. hypnorum*. Hexadekanol se pak nachází u většího množství druhů, nikdy však není

dominantní. *E,E*-farnesol, užívaný jako modelový substrát v této práci, poté nacházíme jako majoritní složku hned u dvou druhů čmeláků *B. hortorum*, *B. pratorum* a u pačmeláka *B. barbutellus*. Geraniol se pak v menší míře nachází u druhů *B. cullumanus* a *B. pratorum*, jehož labiální žláza obsahuje též citronellool, který nacházíme i u druhu *B. bohemicus* [23].

Zatím nebyl proveden adekvátní souhrnný výzkum způsobu vzniku výše uvedených látek u většího množství čmeláků, avšak již nyní existují práce zabývající se vznikem ethylesterů mastných kyselin (převážně ethyl-*Z*-tetradec-9-enoát) u *B. lucorum* či alkoholů (převážně *Z*-hexadec-9-en-1-ol) u *B. lapidarius* a též u *B. terrestris* [13, 20].

Dráha biosyntézy pohlavních feromonů u *B. terrestris* byla nejnověji zkoumána spolu s dráhami *B. lucorum* a *B. lapidarius* metodou aplikace předpokládaných biosyntetických prekursorů feromonů izotopově značených atomy ^2H , ^{13}C a ^{14}C . Poinkubační analýza potvrdila jak hypotézu *de novo* biosyntézy přímo v labiální žláze, tak možnost distribuce vyšších mastných kyselin z tukového tělesa jako prekursorů pro následnou biosyntézu alifatických sloučenin pohlavního feromonu ve žláze [14,24,25].

Tyto dvě potenciální cesty vzniku byly posléze studovány podrobněji. První z možností je následující: biosyntéza mastných kyselin jako takových probíhá v tukovém tělese, kde jsou produkty následně i skladovány v adipocytech ve formě triacylglycerolů [14,26]. Působením lipáz jsou tyto mastné kyseliny mobilizovány a uvolňovány ve formě diacylglycerolů a pomocí selektivního hemolymfového lipoproteinu lipoforinu distribuovány do konkrétních tkání, tedy i do feromonálně aktivních žláz. Zde membránově vázaná lipoforinlipáza DAG hydrolyzuje na mastné kyseliny, ze kterých jsou posléze pomocí řady různých enzymů syntetizovány samotné feromony. Je opět třeba zmínit, že množství skladovaných mastných kyselin v TAG se liší u různých druhů čmeláků.

Druhým modelem biosyntézy feromonů z mastných kyselin je pak *de novo* biosyntéza z octanových jednotek (u *B. terrestris* využíván pro studium značený octan sodný) přímo v labiální žláze [27-30]. Předpokládá se, že klíčovým enzymem pro tyto reakce je u *B. terrestris* syntáza mastných kyselin (FAS), která katalyzuje syntézu nasycených mastných kyselin z acetyl-CoA, malonyl-CoA a NADPH. Stanovení

mRNA pro FAS pomocí kvantitativní PCR ukázalo na výraznou expresi sledovaného genu právě v labiální žláze samců *B. terrestris* a *B. lucorum*, což by napovídalo modelu *de novo* biosyntézy. Tento model podporuje také fakt, že obdobný způsob biosyntézy se uplatňuje u jiných druhů hmyzu (můry, včely, kůrovec,...).

Prozatím nebyla potvrzena ani jedna z výše uvedených drah, takže přesný způsob vzniku prekurzorů složek čmeláčích feromonů zůstává nejasný – zdá se ale, že by obě možnosti mohly fungovat alternativně v závislosti na konkrétním fyziologickém stavu jedince a dostupnosti jednotlivých prekurzorů [31].

Důkazem biosyntézy (S)-2,3-dihydrofarnesolu a geranylcitronellolu u čmeláků v *in vitro* podmínkách (po podání ³H-octanu vznikaly deuterovaný 2,3-dihydrofarnesol a geranylcitronellol) se zabýval Žáček – ukázalo se, že jsou podobně jako u jiných probádaných druhů hmyzu buď syntetizovány *de novo* (na syntéze se podílí například enzym mevalonátové dráhy HMG-CoA-reduktáza), nebo získávány z potravy [14,21,32].

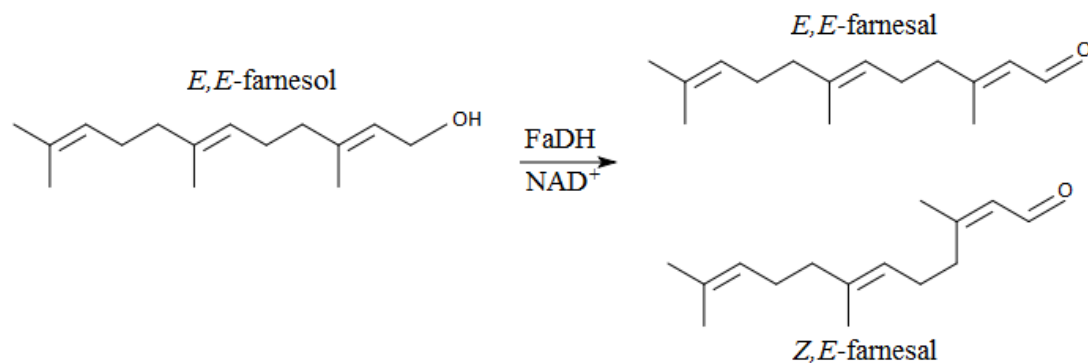
Množství jednotlivých složek feromonu v průběhu života u samce kolísá, přičemž maxima dosahuje u *B. terrestris* v sedmém dni věku, čemuž napovídá i zvýšený zájem neoplozených matek právě o 7–10 dní staré samce [4]. U *B. terrestris* toto maximální množství od sedmého dne rychle klesá (sběrné buňky labiální žlázy podléhají apoptóze), zatímco například u *B. lucorum* spíše stagnuje, popřípadě klesá jen mírně (buňky labiální žlázy se nemění v průběhu života) [33,34].

1.2 Metody stanovení geraniol- a farnesoldehydrogenáz

Vzhledem k obsahovým látkám labiální žlázy čmeláka zemního byl výběr metod pro zkoumání enzymatických reakcí a vznikajících produktů zakládán na předchozích studiích geranioldehydrogenázy (zkoumána zejména u rostlin), farnesoldehydrogenázy (zkoumána zejména u hmyzu) a jim příbuzných enzymů. Centrem zájmu byla oxidace geraniolu na geranial a farnesolu na farnesal (viz Obr. 1.4). Je třeba zmínit, že zatímco směs *E,E*-farnesalu a *Z,E*-farnesalu nemá v literatuře jednoslovný triviální název, pro přírodně se vyskytující směs aldehydů geranialu (jinak také citral A, konfigurace *E*) a neralu (citral B, konfigurace *Z*) se souhrně používá označení citral.

Samotnou GeDH velmi často nacházíme v rostlinách čeledi routovité (*Rutaceae*), které nezdřídka obsahují takzvané citrusové esence (ty napovídají

přítomnosti farnesolu, geraniolu, citronellolu atp.), tudíž u nich lze předpokládat i existenci enzymů reagujících s uvedenými látkami.



Obr. 1.4: Enzymová oxidace *E,E*-farnesolu na *E,E*-farnesal a *Z,E*-farnesal

Ideálním modelem pro studium reverzibilní oxidace geraniolu na geranial je tak například pomerančovník pravý (*Citrus chinensis*) [35]. Tento zástupce čeledi *Rutaceae* byl zkoumán už v roce 1970, přičemž k enzymové reakci bylo využíváno přímo extraktu plodu pomerančovníku. K reakční směsi byl dodáván primárně koenzym NADP^+ , který sice snižoval konverzi geraniolu, ale zároveň udržoval rovnováhu poměru geraniol/geranial. Reakce probíhala i s využitím NAD^+ jako koenzymu. Samotná aktivita přítomných enzymů pak byla měřena spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm a produkty byly stanoveny pomocí plynové chromatografie.

Plynová chromatografie se obecně uplatňuje jako základní metoda pro studium složení biologických materiálů obsahujících *GeDH* nebo *FaDH*, popřípadě produktů reakcí terpenických alkoholů s těmito enzymy [36,37]. Konkrétně GC/MS metodu využívali například Luan a Iijima.

Dalším častým modelem je typický zástupce čeledi zázvorníkovitých zázvor lékařský (*Zingiber officinale*) [3]. Acetonový prášek oddenku zázvoru byl homogenizován s 15 % glycerolem a pufrý a následně centrifugován – enzymovou směs s *GeDH* využívající jak NAD^+ , tak NADP^+ poskytoval supernatant. Podobný postup se širším spektrem substrátů z čerstvého zázvoru používal autor původního výzkumu Iijima i později [38]. Opět vznikalo množství derivátů geraniolu jako geranial, geranyl-acetát, citronellol a minimum nerolu a neralu. U konverze geraniolu na citral

pomocí GeDH se v jiných pracích uvádí, že aktivita enzymu je výrazně ovlivněna poměrem oxidované/redukované formy NADP⁺ [39,40]. Aktivita enzymu je opět měřena spektrofotometricky, finální aldehydový produkt pak stanoven plynovou chromatografií.

Výše uvedené enzymy – například FaDH – byly také již dříve purifikovány z plísně *Ceratocystis fimbriata* z nakažené hlízy lilku bramboru (*Solanum tuberosum*) a pak opět použity k oxidaci *E,E*-farnesolu na *E,E*-farnesal se zapojením koenzymu NADP⁺ [41]. Enzym vykazuje širokou specifitu, jeho aktivita byla opět stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 340 nm.

Existují ovšem i studie metabolismu farnesolu (jako prekursoru pro juvenilní hormon III) u jiných druhů hmyzu, například u lišaje tabákového (*Manduca sexta*) a jeho převod na farnesal, kyselinu farnesoovou, kyselinu 10,11-epoxyfarnesolovou a methylfarnesoát [2]. Tyto studie zpravidla uvádějí FaDH jako NAD⁺-dependentní enzym, přičemž NADP⁺ je při použití v reakci vysoce neefektivní. Ukázalo se, že FaDH se chová různě v závislosti na organismu, z něhož pochází [42]. Například u larev *Manduca sexta* vykazoval enzym vysokou substrátovou specifitu (neschopnost oxidovat krátké alkoholy) a zapojení NAD⁺. FaDH není schopna zpracovávat ethanol a oktanol, což se prokázalo například i u octomilek (*Drosophila*).

Jinak se ale FaDH projevila jako enzym s širokým spektrem substrátů (*E,E*-farnesol, *Z,Z*-farnesol, 2-dekanol, geraniol, nerol, citronellool, oktanol) u komára egyptského (*Aedes aegypti*), (v tomto konkrétním případě byl používán koenzym NADP⁺) [43]. Výrazně snížená míra oxidace farnesolu u tohoto organismu se pak také jeví jako limitující krok v syntéze juvenilního hormonu JH III u dospělců. Jako inhibitory oxidace farnesolu se pak uvádí ionty Cu²⁺ a 1,10-fenathrolin [44].

U dalších modelových organismů, například u členovců (Arthropoda), nebyla nalezena pouze FaDH, ale například i GeDH u roztoče mlékohuba obecného (*Carpoglyphus lactis*) je opět NAD⁺-dependentní [45,46]. V tomto případě dochází k asi o 50 % účinnější oxidaci *E,E*-farnesolu oproti geraniolu, což naznačuje, že roztoč buď vytváří v malém množství oba enzymy, nebo že dokáže zpracovávat pomocí GeDH i farnesol. Podobně se chová i enzymová směs u samic obaleče (*Choristoneura fumiferana*), která byla opět NAD⁺-dependentní a byla

zkoumána hlavně ve vztahu k biosyntéze a degradaci sexuálního feromonu *E*-11-tetradecenalu [47].

Výše uvedené enzymy navíc nebyly zkoumány pouze *in vivo* v původním organismu, ale také heterologní expresí v bakterii *Escherichia coli*, například GeDH z bazalky pravé (*Ocimum basilicum*) [37] nebo z bakterie *Castellaniella defragrans* [48].

Kromě plynové chromatografie se pro studium FaDH a GeDH oplatňuje též SDS-PAGE a to hlavně při separaci dvou izoenzymů s různým isoelektrickým bodem, substrátovou specifitou a kinetickými parametry (mají stejnou molekulární hmotnost, optimální teplotu a pH), například GeDH I a GeDH II z listů rdesna menšího (*Polygonum minus*) [40].

Další ze studií zabývajících se GeDH sledovala její aktivitu s následujícími substráty: geraniol, nerol, citronellol, (*S*)-(-)-perillyl-alkohol a další, během růstu bakterie *Castellaniella defragrans* za přídavku koenzymu NAD⁺ [48]. V tomto výzkumu se uplatnilo několik různých metod: SDS-PAGE pro identifikaci enzymu, UV spektrofotometrie s detekcí při vlnové délce 340 nm a HPLC-UV při vlnové délce 215 nm pro sledování aktivity enzymu a hlavně GC/FID pro separaci směsí produktů. Metody GC/MS a GC/FID, koenzym NADP⁺ pak byly využívány například při stanovení GeDH z perily křovité (*Perilla citriodora*) rekombinantně exprimované v *E. coli* [49].

V menší části prací byl používán jako rozpouštědlo alkoholů aceton [41,50], častějším byl DMSO [36,37,49,50].

2 Cíl práce

Tato bakalářská práce se zaměřuje na následující:

1. Stručně shrnout problematiku studia feromonů čmeláků a studia enzymových směsí s geraniol-/farnesoldehydrogenázovou aktivitou.
2. Popsat produkty enzymatických oxidací alkoholů o různých délkách v homogenátu hlavové části labiální žlázy samců čmeláka zemního (*B. terrestris*).
3. Ověřit složení produktů výše zmíněných oxidací pomocí chemické oxidace.

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

- deionizovaná voda (systém *Milli-Q*).
- Fluka, SRN: NAD⁺ (≥95 %, nikotinamidadeninukleotid), NADP⁺ (≥90 %, nikotinamidadeninukleotidfosfát), Tween 80 (≥58,0 %, polyoxyethylensorbitan-monooleát).
- Lachema, ČR: chlorid draselný (≥99 %), hexahydrát chloridu hořečnatého (č.), octan sodný (≥99 %), hexan (p.a.).
- Pracoviště ÚOCHB AV ČR: 2,3-dihydrofarnesol (č.), bromodekan (č.), hexadekanol (č.), vanilin (č.).
- Penta, ČR: aceton (p. a.), dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát, p. a.), dichlormethan pro HPLC (≥99,8 %, stabilizovaný amylenem), ethyl-acetát (p. a.), hydroxid sodný (p. a.), chlorid sodný (≥99,9 %), chlorid vápenatý (čistota ≥98,3 %), chlorid vápenatý (bezvodý granulovaný, p. a.), chloroform (stabil. 1% ethylalkohol, p. a.), kyselina sírová (čistota ≥95–97,5 %), methanol (p. a.), petrolether (p. a., destilační rozmezí 40–65 °C), síran sodný (bezvodý, p. a.), toluen (p. a.).
- Sigma-Aldrich, SRN: (*E,E*)-farnesol (≥96,0 %), geraniol (≥98,0 %), glycerol pro molekulární biologii (≥99 %), β-merkapt ethanol (≥99 %), kyselina *N*-2-hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-ethansulfonová (HEPES, ≥99,5 %), pyridinium-chlorochromát (≥98 %).
- TCI Europe, Belgie: tetramethylsilan (pro NMR, >99 %)

3.1.2 Pufry a roztoky

V této práci byly použity následující roztoky:

- **Inkubační pufr:** 150mM NaCl, 10mM KCl, 1mM CaCl₂ a 1mM MgCl₂ v 10mM sodnofosfátovém pufru o pH = 7,0; před použitím filtrován přes filtr s 0,22μm póry.
- **Extrakční pufr:** 20%v glycerol, 0,1%v Tween-80 a 10mM β-merkapt ethanol v inkubačním pufru; před použitím filtrován přes filtr s 0,22μm póry.
- **Roztok standardu substrátu:** 100mM alkohol (farnesol, geraniol,...) v destilovaném acetonu.

- **Roztok interního standardu:** 2mM bromeikosan v destilovaném ethylacetátu.
- **Roztok koenzymu:** 50mM NAD⁺ nebo NADP⁺ (oxidované formy) v destilované vodě.

3.1.3 Biologický materiál

Samci čmeláka zemního použití v této práci pocházejí z chovu Mgr. Jiřího Kindla, Ph.D.; pitva žláz byla provedena u různě starých jedinců (staří se pohybovalo v rozmezí 0–2 dní po vylíhnutí) a zároveň byly pro pokusy využívány žlázy odebrané v různých letech (2009–2016). Přesné datum odběru žlázy a staří konkrétního jedince v době pitvy je uvedeno u příslušného experimentu.

Po odebrání byly tkáně z usmrcených čmeláků uchovávány při -20°C.

3.1.4 Přístrojové vybavení

- Denville Scientific, USA: stolní centrifuga *MICRO 240A*.
- Hamilton, USA: pH elektroda *SlimTrode*.
- Hanna Instruments, USA: pH metr *pH 213*.
- Heidolph Instruments, SRN: rotační vakuová odparka *Laborota 4002*, lázeň k rotační vakuové odparce *WB*.
- IKA, SRN: vortex *MS2 Minishaker* (maximální výkon 3000 RPM).
- Kern, SRN: laboratorní váhy *440-35N*.
- Mettler Toledo, USA: analytické váhy *AT261 Delta Range*.
- Kraitek, Česká republika: průmyslová ultrazvuková vana *K-5IM*, výkon UZ 150 W, objem 6 L.
- MLW, Polsko: magnetická míchačka s ohřevem *RH3*
- Hewlett-Packard, USA: plynový chromatograf *HP 6890 Series* s FID detektorem; automatický dávkovač vzorků pro GC *HP 6890 Series Injector*.
- N-BIOTEK, Jižní Korea: třepací inkubátor *NB-205*.
- Thermo scientific, USA: plynový chromatograf *Trace 1310* s MS detektorem ISQ LT; automatický dávkovač vzorků pro GC *AI 3000*.
- Wilmad-LabGlass, USA: ruční mixér *Micro Tube Homogenizer System* s polypropylenovým pístem.

3.1.5 Výpočetní technologie

- Chemické vzorce byly kresleny v programu *BKChem 0.13* (Beda Kosata).
- Grafy byly tvořeny v *MS Office Excel 2016*. Chybové úsečky byly zhotoveny vždy ze tří opakování, pokud není v grafu uvedena chybová úsečka, měření bylo provedeno bez opakování.
- Chromatogramy z plynové chromatografie byly zpracovány v programu *Clarity 5.0 (DataApex, ČR)* a exportovány do *MS Excel*.
- Spektra z nukleární magnetické rezonance byla získána v programu *SpinWorks 4* (Kirk Marat). U signálu *free-induction decay* ze spektrometru byla provedena Fourierova transformace a spektrum bylo manuálně fázováno. Následně byly hodnoty chemického posunu vztaženy k referenci (tetramethylsilan), byly označeny jednotlivé signály a tyto integrovány. Podobně se postupovalo i při generování 2D NMR spekter.

3.1.6 Ostatní materiál

- Fluka AG, Švýcarsko: silikagel 60 pro kolonovou chromatografii (póry 60 Å, částice 40–63 µm).
- Macherey-Nagel, SRN: TLC desky *Polygram Sil G* (silikagel na plastové folii, tloušťka vrstvy 0,2 mm, velikost pórů 60 Å), filtr ze skelných vláken GF-6 (velikost póru 0,6 µm).
- Phenomenex, USA: analytická kolona pro kapilární GC *Zebtron ZB-5MS* [5% fenyl-arylen, 95% dimethylpolysiloxan, tloušťka filmu 0,25 µm, (30000×0,25) mm]
- Whatman, USA: stříkačkové filtry Puradisc 25 PP (průměr pórů 0,2 µm).

3.2 Metody

3.2.1 *In vitro* inkubace

3.2.1.1 Výběr extrakčního rozpouštědla

Jako typový alkohol byl vybrán farnesol (2,8 µL.mL⁻¹ v acetonu, ~4 mM), který byl ve třech opakováních extrahován pěti různými rozpouštědly: ethyl-acetátem, dichlormethanem, toluenem, chloroformem a hexanem. Do vialky bylo nejprve přidáno

500 μL pufru HEPES (25 mM, pH = 7,2) a 20 μL roztoku farnesolu v acetonu, důkladně promícháno (2500 RPM, 30 s), poté bylo přidáno 300 μL příslušného extrakčního rozpouštědla a opět promícháno (2500 RPM, 60 s).

K měření na GC/FID bylo posléze odebráno 200 μL organické fáze a k tomuto objemu přidáno 200 μL roztoku bromodekanu v hexanu (interní standard, 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, ~4,5 mM).

3.2.1.2 Příprava homogenátu labiální žlázy

Veškeré kroky byly prováděny na ledu, aby nedošlo k poklesu aktivity enzymů v důsledku denaturace. Na každou žlázu v mikrozkuhavce (max. 3 kusy) bylo přidáno 50 μL extrakčního pufru. Homogenizace tkáně byla provedena pomocí ručního homogenizátoru s plastovým pístem po dobu 2 minut, dokud nepřestala být patrná vyšší struktura žláz. Následovala pětiminutová sonikace homogenátu (stupeň výkonu 9 – nejvyšší) a poté krátké míchání (2500 RPM, 10 s). V rámci některých experimentů byla část tohoto homogenátu odebrána a dále centrifugována, nebo filtrována pomocí centrifugace přes 0,6 μm filtr (3000 RPM, 2 minuty). Pokud extrakt nebyl ihned použit k experimentu, byl uchován při -20 °C.

3.2.1.3 Inkubace homogenátu CLG s alkoholovými substráty

Inkubace probíhaly v 1,5mL plastových mikrozkuhavkách nebo ve vialkách. Enzymová reakce (inkubace) byla prováděna v režimu *end-point* s následným stanovením produktů pomocí GC. Všechny inkubace byly provedeny podle obecného postupu:

Do inkubační nádoby byl přidán inkubační pufr, roztok koenzymu a roztok substrátu a nakonec homogenát CLG, směs byla poté inkubována několik hodin v horizontální poloze při teplotě 35 °C a otáčkách 200 RPM. Po ukončení inkubace bylo ke směsi přidáno 500 μL ethyl-acetátu a po důkladné homogenizaci (2500 RPM, 1 min) bylo odebráno minimálně 300 μL vrchní organické fáze pro analýzu. Jako reference sloužily inkubační směsi bez přídavku homogenátu CLG a bez přídavku koenzymu.

Byla provedena série několika inkubací mírně se lišících se ve složení inkubačních směsí či v provedení inkubace. Konkrétní podmínky jsou uvedeny v tabulkách 1–5:

Tab. 1: Série A, podmínky inkubace.

substrát: farnesol, geraniol

koenzym: NAD⁺, NADP⁺ (20mM)

homogenát CLG: 2× 2denní samec, rok 2011

homogenát CLG μL	ekvivalent CLG	substrát μmol	molární poměr substrát/koenzym	délka inkubace hod
25	0,5	125	5	16

Tab. 2: Série B, podmínky inkubace.

substrát: farnesol, geraniol

koenzym: NAD⁺ (50mM)

homogenát CLG: 3× 1denní samec, 1× 0denní samec, rok 2012

homogenát CLG μL	ekvivalent CLG	substrát μmol	molární poměr substrát/koenzym	délka inkubace hod
10	0,2	100	2	16

Tab. 3: Série C, podmínky inkubace.

substrát: farnesol, geraniol, hexadekanol

koenzym: NAD⁺ (50mM)

homogenát CLG: 3× 1denní samec, 18.12.2015

homogenát CLG μL	ekvivalent CLG	substrát μmol	molární poměr substrát/koenzym	délka inkubace hod
10	0,2	100	2	16

Tab. 4: Série D, podmínky inkubace.

substrát: farnesol, geraniol

koenzym: NAD⁺ (50mM)

homogenát CLG: 3× 1denní samec, 9.1.2016

homogenát CLG μL	ekvivalent CLG	substrát μmol	molární poměr substrát/koenzym	délka inkubace hod
10	0,2	100	2	24

Tab. 5: Série E, podmínky inkubace.

substrát: farnesol, geraniol

koenzym: NAD⁺ (50mM)

homogenát CLG: 2× 1denní samec, 2× 0denní samec, 16.2.2016

homogenát CLG μL	ekvivalent CLG	substrát μmol	molární poměr substrát/koenzym	délka inkubace hod
5	0,1	100	2	4, 8 a 21

3.2.2 Analytické metody

3.2.2.1 Plynová chromatografie

Pro analýzu složení výsledné reakční směsi produktů enzymových oxidací alkoholů byl použit plynový chromatograf vybavený analytickou kolonou pro kapilární GC (5 % fenyl-arylen, 95 % dimethylpolysiloxan) a plamenoionizačním detektorem (GC/FID) sloužila k určení množství a retenčních časů jednotlivých produktů.. Plynový chromatograf se stejnou kolonou a hmotnostním spektrometrem (GC/MS) byla použita pro analýzu chemických oxidací alkoholů.

Plynová chromatografie s plamenoionizační detekcí

Automatickým dávkovačem nebo ručně byl do předního inletu (250 °C, splitovací poměr byl variabilní v rozmezí 1:1 až 100:1 v závislosti na koncentraci konkrétních analytů, nejčastěji byl splitovací poměr 60:1) dávkován 1 μL vzorku. V kolonovém prostoru byl použit následující teplotní program:

gradient °C.min ⁻¹	cílová teplota °C	rampa min
0	50	1,00
5	200	0,00
25	300	5,00

Průtok mobilní fáze (helium) byl 1,0 mL.min⁻¹. Analyty elující z kolony byly detekovány spálením v detektoru (300 °C, průtok vodíku 40 mL.min⁻¹, průtok vzduchu

400 mL.min⁻¹, průtok dusíku (*make-up flow*) 20 mL.min⁻¹). Chromatogramy byly automaticky integrovány a pro výpočet stupně konverze byly použity plochy píků.

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Při analýze pomocí GC/MS byl dávkován 1 µL vzorku do předního inletu (250 °C, splitovací poměr 40:1). Během analýzy byl v kolonovém prostoru použit následující teplotní program:

gradient	cílová teplota	rampa
°C.min ⁻¹	°C	min
0	50	1,00
4	200	0,00
25	300	2,00

Průtok mobilní fáze (helium) byl 1,2 mL.min⁻¹. *Transfer line* měla teplotu 260 °C. Analyty byly detekovány v pozitivním módu elektronové ionizace (iontový zdroj 200 °C, emisní proud 45 µA) pomocí kvadrupólového analyzátoru (skenovací rozmezí 29–650, frekvence 5 s⁻¹).

3.2.2.2 Chemická oxidace alkoholů

Bylo použito 100 µmol v případě farnesolu a geraniolu, 50 µmol v případě 2,3-dihydrofarnesolu, v 1 mL dichlormethanu [51,52]. Reakce probíhala se dvěma ekvivalenty PCC a jednou polovinou ekvivalentu octanu sodného (stabilizační činidlo). Inkubace probíhala na míchačce (3 hodiny), přičemž průběh reakce byl průběžně monitorován pomocí TLC (mobilní fáze petrolether/dichlormethan 1:2). Následovala adsorpční filtrace reakční směsi (0,5 g silikagelu, promytí 5 mL dichlormethanu a 5 mL petroletheru, vialka s reakční směsí vymyta 3×0,5 mL petroletheru, roztok nanesen na filtrační kolonu, závěrečné promytí filtrační kolony 5 mL petroletheru). Objem filtrátu by snížen na cca 300 µL odpařením za sníženého tlaku a toto množství posléze dávkováno na 20×10 TLC desku předvyvinutou methanolem, vzorek byl aplikován na delší stranu desky. Deska byla vyvíjena mobilní fází petrolether/dichlormethan 1:2. Z desky byly odstřiženy oba vertikální okraje (1 cm široký pruh)) a separované složky reakční směsi detekovány pomocí vanilinového

činidla. Následovalo seškrabání vybraných pásů na desce a extrakce do směsi petrolether/dichlormethan (1:4). Objem roztoku byl po filtraci snížen na cca 1 mL, ze kterého byl odebrán 1 μ L a smíchán s 1,00 mL hexanu pro analýzu na GC/MS a GC/FID, metody jsou uvedeny výše.

3.2.2.3 Tenkovrstvá chromatografie

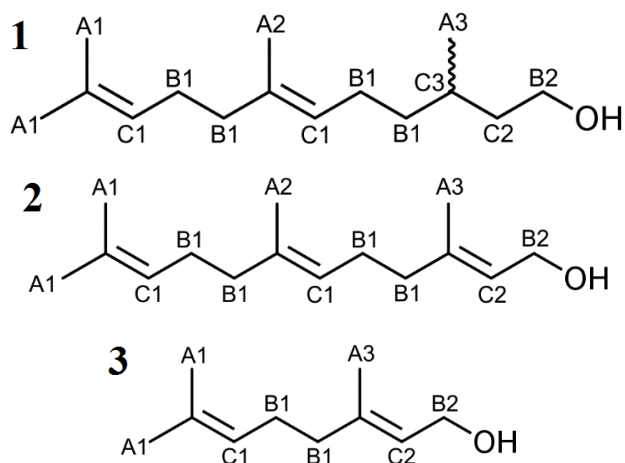
Při TLC bylo využíváno výhradně směsi destilovaného petroletheru a destilovaného dichlormethanu a to v různých poměrech v závislosti na analytu.

Detekční roztok vanilinu obsahoval 0,1 g vanilinu, 0,5 mL kyseliny sírové a 50 mL ethanolu byl nanášen skleněným rozprašovačem. Deska byla po nanesení zahřívána na ploténce.

3.2.2.4 Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie

Měření na NMR spektrometru *Bruker Avance III HD 400 MHz* vybaveném kryosondou *Prodigy*, automatickým měničem vzorků *SampleXpress* a softwarovým rozhraním *Topspin 3.2* probíhalo na oddělení NMR a molekulové spektroskopie na ÚOCHB.

Vzorek v množství několika desítek μ mol byl nejprve rozpuštěn ve vialce pomocí 0,50 mL deuterovaného chloroformu, a byla přidána referenční látka tetramethylsilan v minimálním množství ($<1 \mu$ L). Roztok vzorku byl promíchán a pipetován do NMR kyvety (180 \times 4 mm) – otvor kyvety byl utěsněn teflonovou páskou.



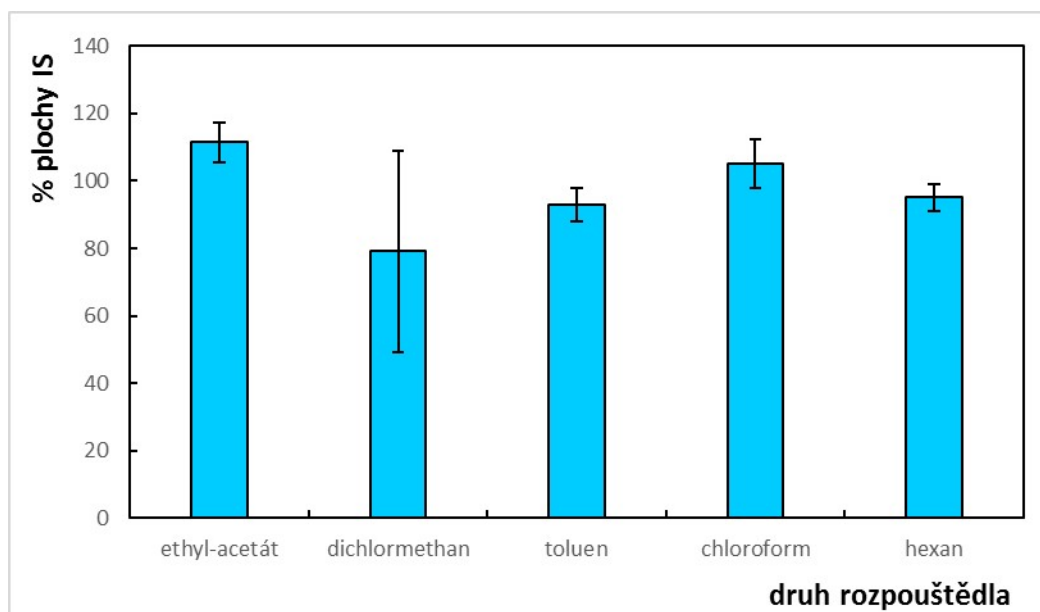
Obr. 3.1: Obecné číslování uhlíků u referenčních sloučenin **1** 2,3-dihydrofarnesolu, **2** *E,E*-farnesolu a **3** geraniolu.

U všech vzorků byla získána jednorozměrná spektra protonová (^1H) a uhlíková (^{13}C s testem vázaných protonů (APT) a ^1H dekaplingem) a dále pak spektra dvourozměrná homonukleární ^1H COSY. Dvourozměrná spektra byla použita jako podpůrný materiál při přiřazování jednotlivých signálů k atomům v molekule. Obecné číslování vodík nesoucích uhlíků u referenčních sloučenin 2,3-dihydrofarnesolu, *E,E*-farnesolu a geraniolu je uvedeno na obrázku 3.1 (strana 31).

4 Výsledky a diskuze

4.1 *In vitro* inkubace

Na základě předchozích studií se předpokládalo, že výsledný produkt enzymové oxidace bude obsahovat směs výchozího alkoholu a příslušného aldehydu. Tuto směs bylo třeba extrahovat z vodného inkubačního roztoku a zároveň zastavit enzymatickou reakci.

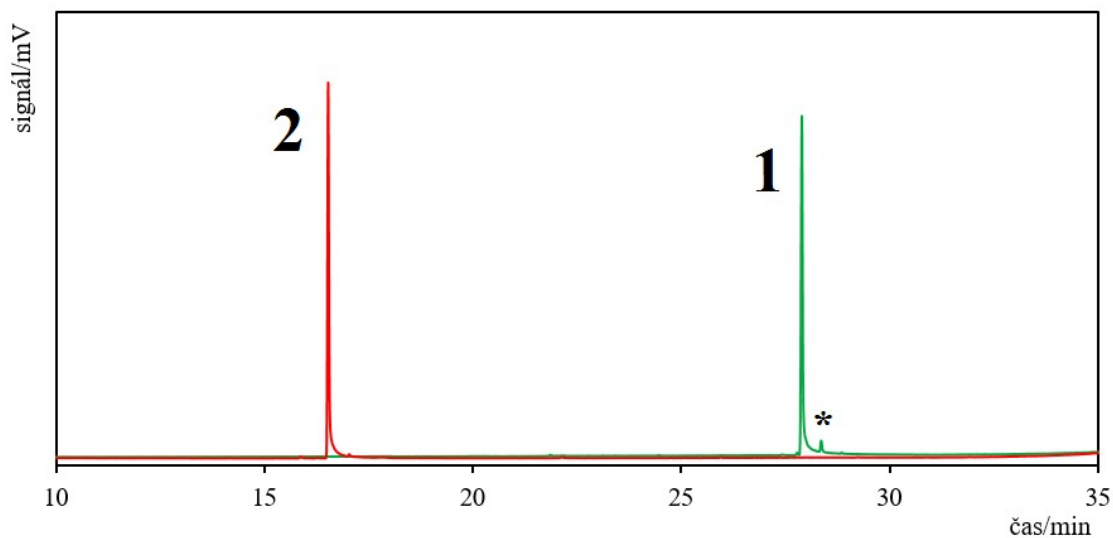


Obr. 4.1: Graf účinnosti extrakce farnesolu pomocí různých rozpouštědel.

Modelová směs farnesolu v pufru byla proto extrahována pěti rozpouštědly: ethyl-acetát, dichlormethan, toluen, chloroform, hexan. Z obr. 4.1 vyplývá, že všechna použitá rozpouštědla extrahovala farnesol s podobnou účinností, přičemž nejvyšší množství bylo extrahováno za pomoci ethyl-acetátu a chloroformu. Pro další experimenty byl jako extrakční rozpouštědlo vybrán ethyl-acetát, protože tvoří s vodným roztokem vrchní organickou fázi, a tak usnadňuje odběr vzorků z inkubačních vialek, zatímco chloroform nebo dichlormethan tvoří fázi těžší než voda. Další rozpouštědlo, toluen, má vysoký bod varu.

Následně byla provedena řada *in vitro* inkubací homogenátu CLG s potenciálními alkoholovými substráty: farnesol, geraniol, hexadekanol s cílem zjistit,

zda a které z těchto látek jsou schopny enzymy CLG biotransformovat, a s cílem optimalizovat podmínky provedení. Jednotlivé experimenty se lišily od výchozího postupu v některých aspektech (množství homogenátu, délka inkubace, množství substrátu,...).

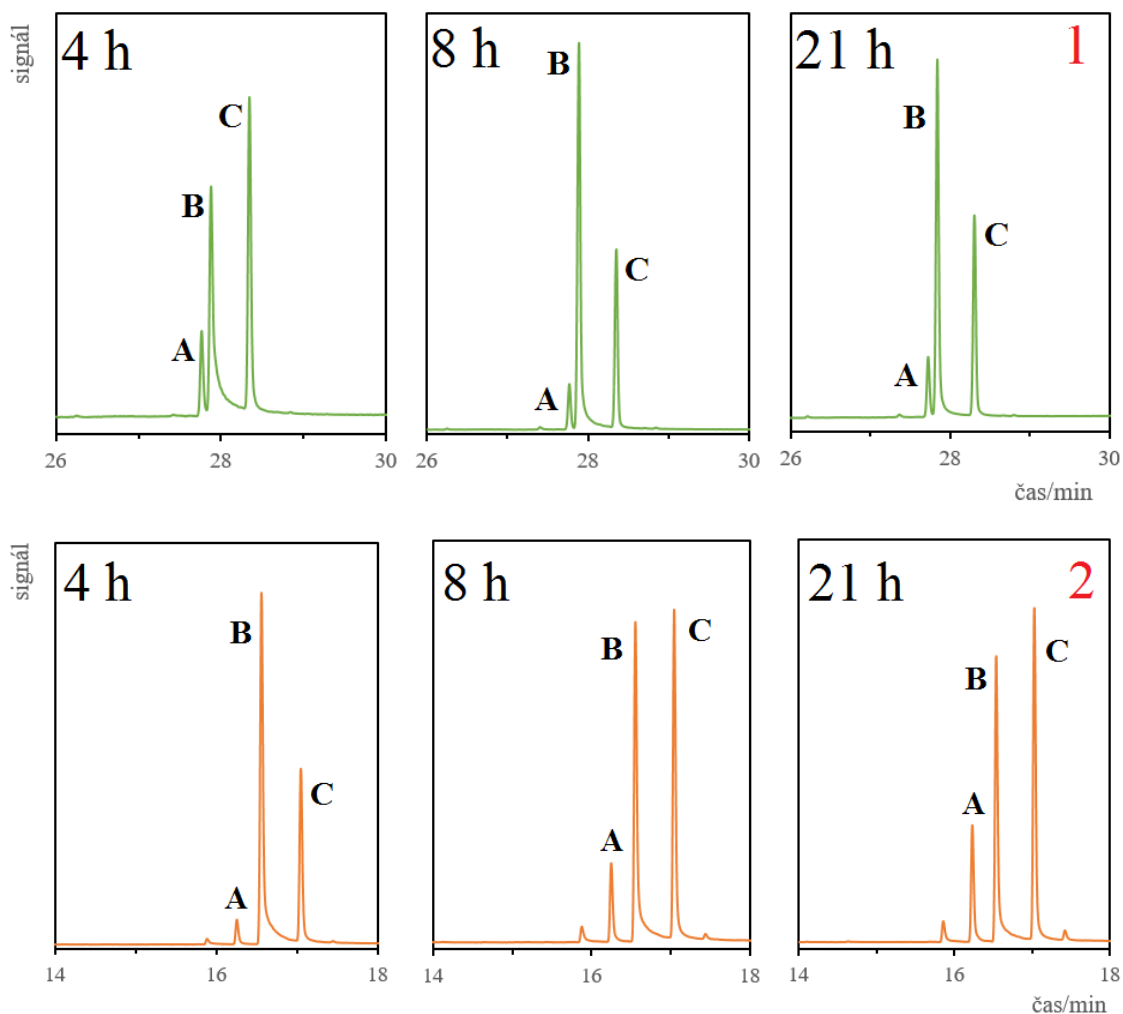


Obr. 4.2: Chromatogramy z GC/FID standardu **1** *E,E*-farnesolu, **2** standardu geraniolu. * původní nečistota standardu *E,E*-farnesolu (*E,E*-farnesal + *Z,E*-farnesal).

Po extrakci inkubačních směsí byla pro stanovení produktů použita plynová chromatografie s plamenoionizační detekcí, protože je vhodná pro kvantitativní vyhodnocení dat. Ukázalo se, že enzymovou oxidací *E,E*-farnesolu a geraniolu vznikají dva produkty u každého z nich (píky **A** a **C** na chromatogramech na obr.4.3 **1** pro *E,E*-farnesol a na obr. 4.3 **2** pro geraniol, strana 35), přičemž jednoho z produktů vzniká větší množství. Na chromatogramu pozorujeme nejdříve pík jednoho z produktů, poté eluuje výchozí látka (pík na obr. 4.2 **1** *E,E*-farnesol a na obr. 4.2 **2** geraniol, píky **B** na chromatogramech na obr. 4.3, strana 35) a nakonec druhý produkt. Retenční časy produktů z *in vitro* inkubací souhlasily s retenčními časy aldehydů získaných chemickou oxidací výchozích látek pomocí PCC (pro způsob identifikace isomerů viz dále); dva produkty odpovídají *E/Z* isomerům na 2,3-dvojně vazbě.

První inkubace sloužily zejména k ověření funkčnosti celého procesu, optimalizaci GC/FID metody atd. Výsledky však nebyly prováděny s dostatkem opakování a vykazovaly velkou odchylku, proto zde nejsou uvedeny. Tyto počáteční pokusy potvrdily, že zkoumané enzymy CLG katalyzují oxidaci za přítomnosti

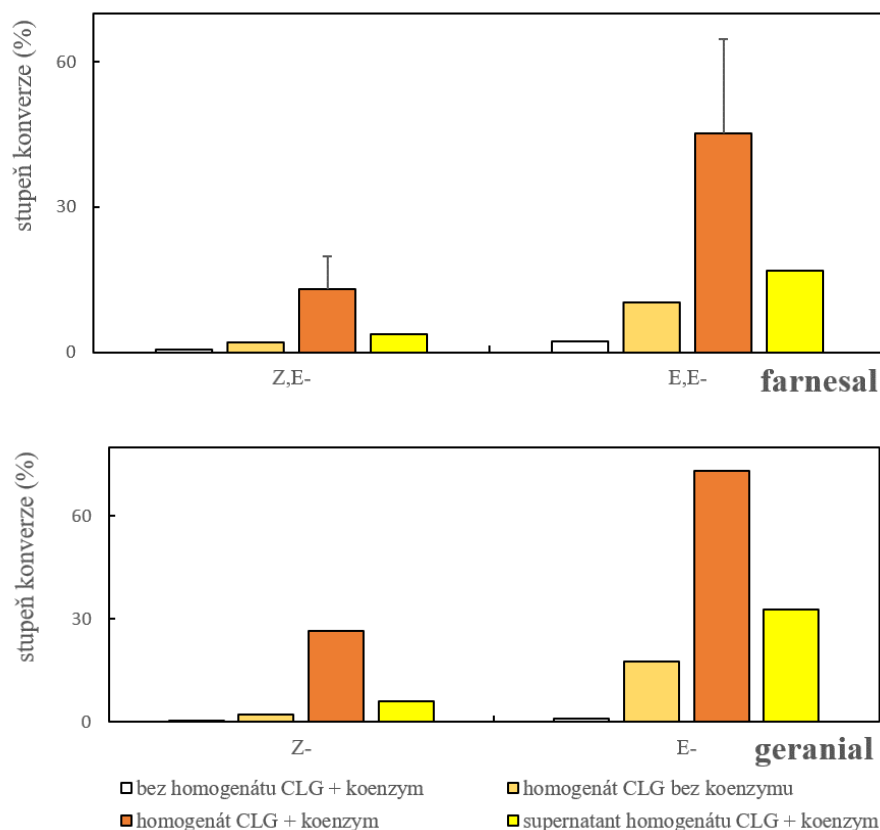
koenzymu NAD^+ i NADP^+ přibližně stejně rychle, tento jev je rovněž popsán v literatuře [41,42,45,46]. Pro další pokusy byl zvolen koenzym NAD^+ vzhledem k jeho nižší ceně. V rámci prvotních inkubací byla optimalizována GC metoda tak, aby byly detekovány všechny produkty reakce.



Obr. 4.3: Chromatogramy GC/FID inkubací *E,E*-farnesolu a geraniolu o různých časech. **1** farnesal a **2** citral, **A** *Z,E*-isomer, **B** výchozí látka, **C** *E,E*-isomer.

Inkubace, jejíž výsledky jsou uvedeny na obr. 4.4 (strana 36), probíhala na základě obecného postupu v plastových mikrozkuvkách s víčky obalenými parafilmem. V průběhu inkubace došlo k výrazné ztrátě výchozí látky a produktů, zřejmě z důvodu netěsnosti nebo permeace plastového materiálu, tudíž výsledky nelze považovat za směrodatné. Přesto je z nich jasně patrné, že vzorky obsahující pouze supernatant homogenátu CLG, katalyzují oxidaci podstatně pomaleji. Na základě těchto

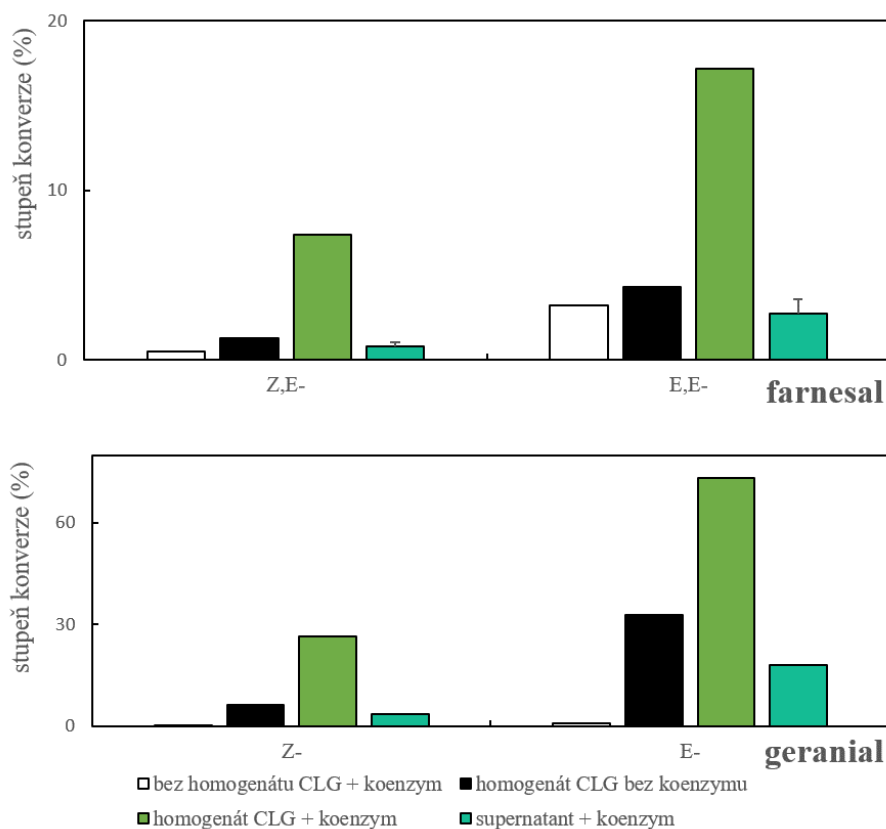
výsledků se zdá, že ve směsích neobsahujících koenzym NAD^+ vzniká až třikrát menší množství aldehydů než ve směsích s koenzymem. Tato skutečnost se projevila pouze v prvních měřeních a může být způsobena stářím CLG (rok 2011) a nebo jejím dosud neoptimalizovaným zpracováním.



Obr. 4.4: Grafy ploch píku *Z,E*-aldehydu a *E,E*-aldehydu v jednotlivých inkubovaných směsích (souhrnné průměry hodnot chromatogramů inkubovaných směsí reakce farnesolu a geraniolu s extraktem CLG na GC/FID série B).

Inkubace s farnesolem, geraniolem a hexadekanolem, jejíž výsledky jsou uvedeny na obr. 4.5 (strana 37), probíhala podle standardního postupu, ovšem byl při ní ještě využíván jak homogenát CLG – tj. nefiltrovaná homogenizovaná směs CLG obsahující veškeré enzymy, koenzymy a části buněk, tak filtrovaný supernatant původního homogenátu, aby došlo k ověření katalytické účinnosti obou typů zpracování žlázy. Ukázalo se, že filtrace homogenizované směsi nijak neprospívá průběhu oxidační reakce. Je možné, že homogenizace nebyla úplná a většina enzymů zůstala navázána na buněčné struktury, které se centrifugací odstranily.

Ze tří substrátů při této inkubaci byly oxidovány pouze dva a to terpeny farnesol a geraniol, hexadekanol jako zástupce alifatických alkoholů nevykazoval žádnou změnu – chromatogram čisté látky a směsi po inkubaci se jevil takřka totožný, proto není uveden ve výsledcích a s hekadekanoem nebyla prováděna ani následná chemická oxidace pomocí PCC.

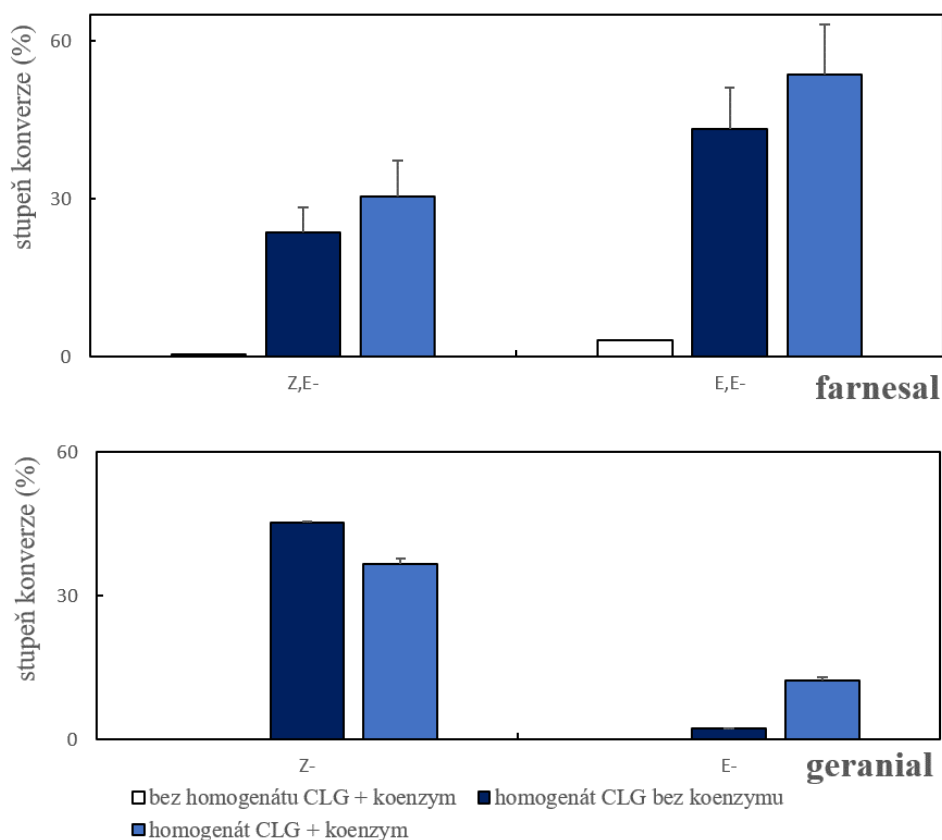


Obr. 4.5: Grafy ploch píku *Z,E*-aldehydu a *E,E*-aldehydu v jednotlivých inkubovaných směsích (souhrnné průměry hodnot chromatogramů inkubovaných směsí reakce farnesolu a geraniolu s extraktem CLG na GC/FID série C).

Inkubace, jejichž výsledky jsou uvedeny na obr. 4.6 (strana 38), byly následně provedeny s tím rozdílem, že bylo přidáno poloviční množství alkoholu oproti předchozím experimentům. To způsobilo, že výsledné chromatogramy nejsou dostatečně průkazné - pík standardu výchozího alkoholu se jeví buď zanedbatelně nízký, nebo žádný.

Zatímco u farnesolu vznikalo asi o třetinu větší množství *E,E*-farnesalu než *Z,E*-farnesalu, u geraniolu vznikl skoro trojnásobek *E,E*-geranialu oproti *Z,E*-geranialu, přičemž

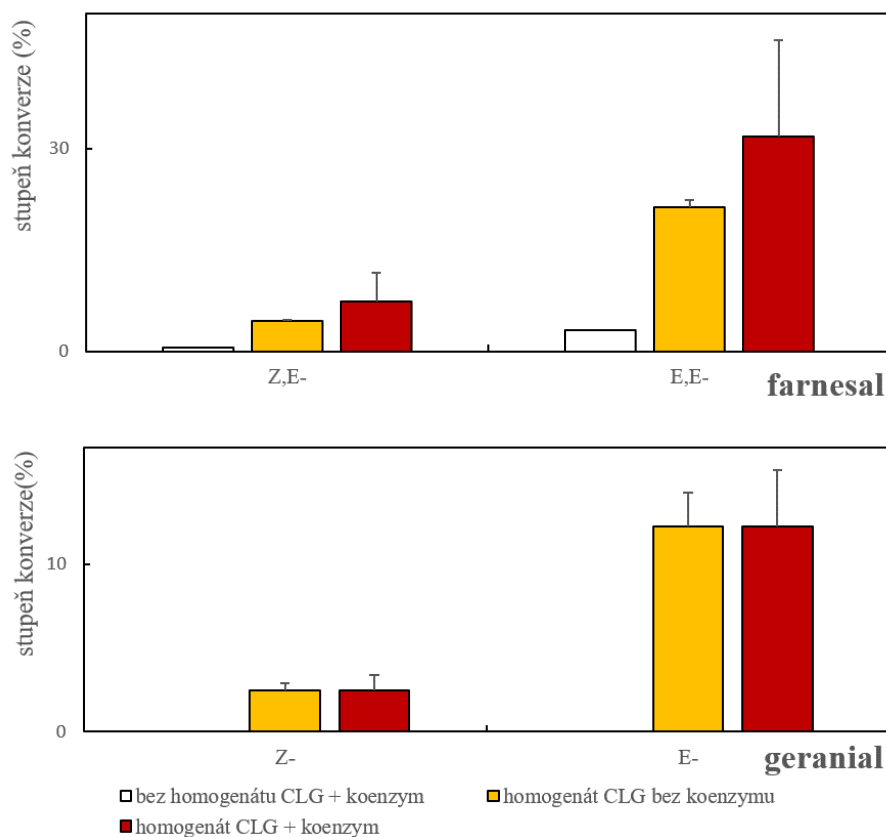
větší množství produktu se vytvářelo v roztocích s přidaným NAD^+ , což může být způsobeno snížením molárního poměru substrát/koenzym.



Obr. 4.6: Grafy ploch píku *Z,E*-aldehydu a *E,E*-aldehydu v jednotlivých inkubovaných směsích (souhrnné průměry hodnot chromatogramů inkubovaných směsí reakce farnesolu a geraniolu s extraktem CLG, GC/FID série D).

V dalším pokusu byla zkoumána časová závislost průběhu oxidace farnesolu a geraniolu, a to provedením tří paralelních inkubací ukončených po 4, 8 a 21 hodinách. Bylo použito poloviční množství homogenátu CLG oproti předešlým experimentům. Výsledky nejkratší inkubace jsou uvedeny na obr. 4.7 (strana 39). Je patrné, že v případě obou substrátů látky vznikají postupně a dříve se tvoří *E,E*-farnesal a geraniol, než *Z,E*-farnesal a neral. Z předchozích výzkumů víme, že některé druhy hmyzu využívají *E,E*-farnesal k biosyntéze JH III [43], je tedy možné, že i čmelák tento isomer produkuje předněji. Je patrné, že oba isomery aldehydů odvozených od farnesolu vznikají rychleji než isomery aldehydů odvozených od geraniolu. V případě inkubačních směsí s farnesolem bez NAD^+ probíhá reakce v tomto čase rychleji.

Na obr. 4.9 (strana 40) jsou zaznamenány výsledky osmihodinové inkubace, pozorujeme na nich rychlý nárůst množství obou isomerů aldehydů odvozených od geraniolu a také postupné snižování poměru neralu vůči geranialu. Ve vzorcích, ke kterým byl přidán NAD^+ vznikalo v této fázi nepatrně větší množství produktů.

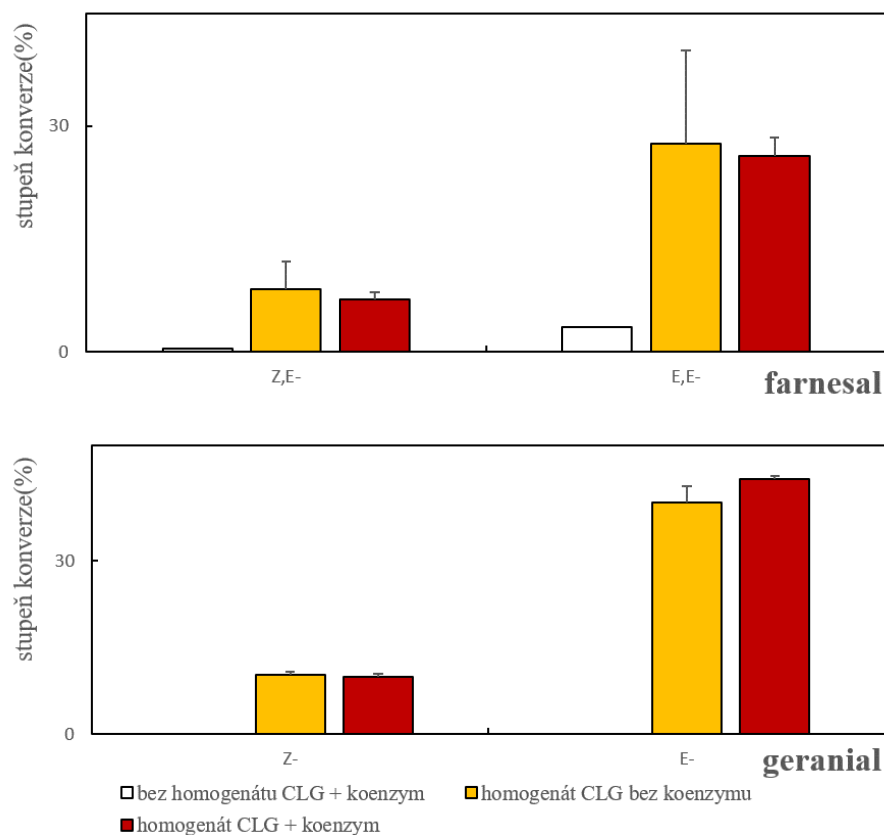


Obr. 4.7: Grafy ploch píku *Z,E*-aldehydu a *E,E*-aldehydu v jednotlivých inkubovaných směsích (souhrnné průměry hodnot chromatogramů inkubovaných směsí reakce farnesolu a geraniolu s extraktem CLG, GC/FID ze Série E – čtyřhodinová inkubace).

U jednadvacetihodinové inkubace (výsledky na obr. 4.9, strana 41), je z grafů patrné, že směs produktů vznikajících za 21 hodin ještě není ve stejném poměru jako směs vznikající za 24 hodin inkubace. Přesto je z celé časové řady jasné, že *Z,E*-farnesal a neral vznikají pomaleji než *E,E*-farnesal a geranial a ve výsledku jich je tedy méně. Poměr mezi isomery se pohybuje asi kolem hodnoty 2:1 u obou aldehydů.

V případě všech provedených inkubací se ukázalo, že u inkubačních směsí, ke kterým nebyl přidán homogenát nebo supernatant homogenátu CLG, tj. nebyla v nich žádná směs enzymů, pouze koenzym NAD^+ a substrát standardu alkoholu,

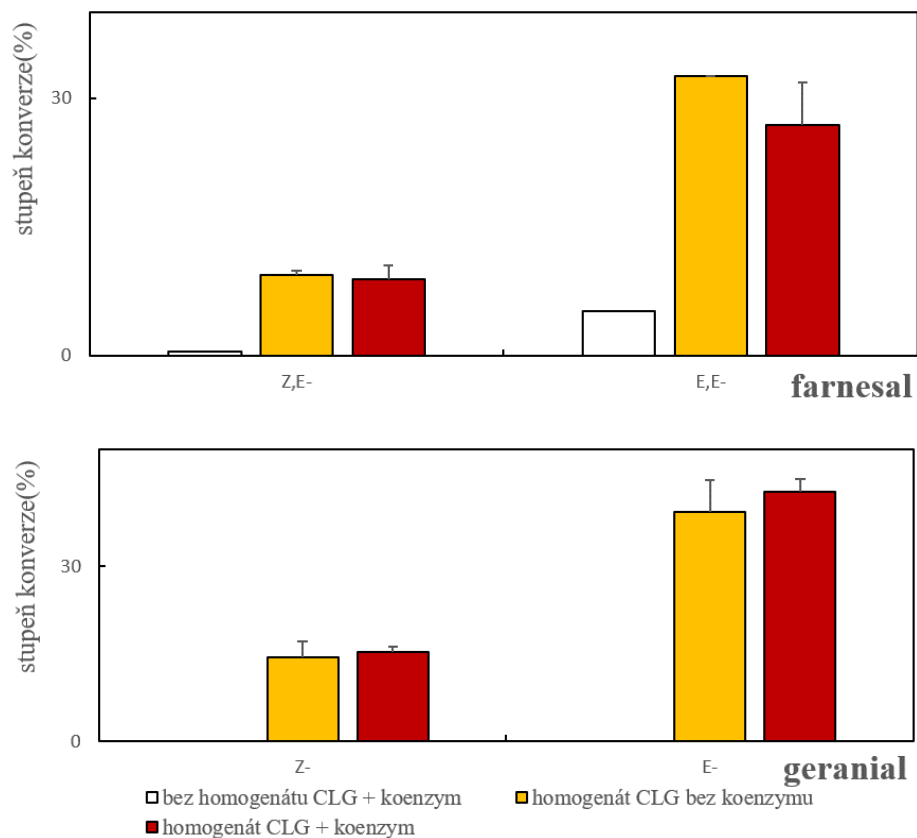
nedochází k žádnému samovolnému vzniku aldehydů. U farnesolu představují píky odpovídající retenčními časy aldehydovým produktům u referenční směsi bez homogenátu CLG pouze nečistotu, která je přítomna už v komerční látce v množství přibližně 3 % (viz obr. 4.2 *).



Obr. 4.8: Grafy ploch píky *Z,E*-aldehydu a *E,E*-aldehydu v jednotlivých inkubovaných směsích (souhrnné průměry hodnot chromatogramů inkubovaných směsí reakce farnesolu a geraniolu s extraktem CLG, GC/FID ze série E - osmihodinová inkubace).

Je třeba zmínit, že v této práci byla využívána nepurifikovaná směs CLG, jež obsahovala veškeré koenzymy (včetně NAD^+), enzymy, výchozí látky a produkty, které se v CLG čmeláka přirozeně vyskytují (viz obr. 1.3, strana 17), čímž lze také vysvětlit velice malou nebo žádnou účinnost přidaného koenzymu NAD^+ .

Substráty pro enzymové oxidace byly rozpuštěny v acetonu, což mohlo urychlit regeneraci redukované formy koenzymů z důvodu paralelně probíhající redukce acetonu na 2-propanol, tj. popsané reakce alkoholdehydrogenáz [53,54,55].



Obr. 4.9: Grafy ploch píku *Z,E*-aldehydu a *E,E*-aldehydu v jednotlivých inkubovaných směsích (souhrnné průměry hodnot chromatogramů inkubovaných směsí reakce farnesolu a geraniolu s extraktem CLG na GC/FID ze Série E - jednadvacetihodinová inkubace).

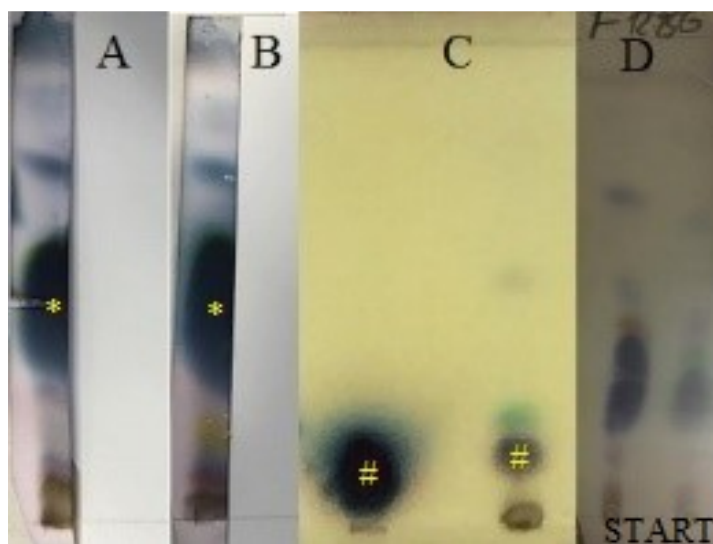
Oxidace probíhaly u geraniolu i *E,E*-farnesolu podobně rychle, přičemž se zdá, že přítomné enzymy mají vyšší afinitu pro geraniol. V průběhu studia tohoto systému nebyly detekovány žádné produkty deprivatizace do dalších stupňů, například příslušné karboxylové kyseliny (nevznikají ani chemickou oxidací s PCC), je možné, že inkubační doby byly příliš krátké.

Jak již bylo řečeno, z chromatogramů extraktů inkubačních směsí je sice patrná přeměna reaktantů na produkty, není ale zřejmé, který z aldehydových produktů má jakou konfiguraci dvojné vazby. Z tohoto důvodu následovala série pokusů s chemickým oxidačním činidlem a následné využití nukleární magnetické rezonanční spektroskopie.

4.2 Oxidace alkoholů pomocí pyridinium-chlorchromátu

Oxidace pomocí PCC byly prováděny pouze u substrátů, u nichž byla potvrzena enzymová oxidace – tedy u geraniolu a farnesolu – a mimo to také u (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu, v CLG *B. terrestris* majoritně zastoupené látky. Cílem bylo provést oxidaci ve větším měřítku, než umožňovaly enzymové reakce a zjistit přesnou konfiguraci vznikajících aldehydů.

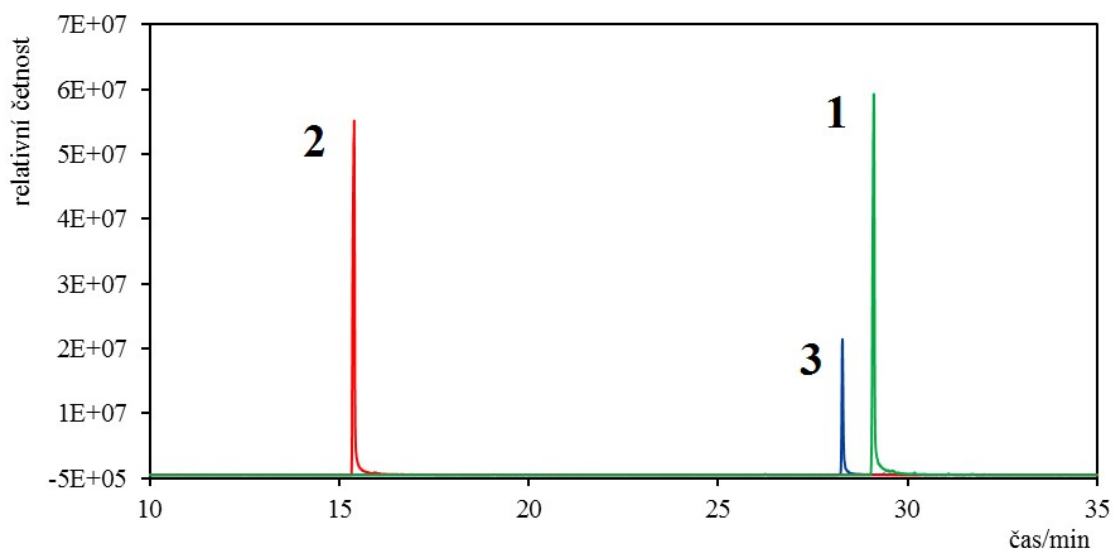
Pro oxidaci farnesolu na farnesal a geraniolu na geranial, se již dříve osvědčil například MnO_2 [51]. Funguje jako stabilní činidlo umožňující oxidaci alkoholů na příslušné aldehydy bez izomerizace a další oxidace na karboxylové kyseliny, což by i v této práci imitovalo enzymovou reakci. Dostupný MnO_2 byl ovšem zřejmě starý a tedy neaktivní. Proto byl postup nahrazen reakcí alkoholu s PCC [52]. Konkrétně například Corey ve své práci uvádí oxidaci terpenu citronellolu na citronellal za přítomnosti octanu sodného, z čehož bylo vycházeno i v této práci.



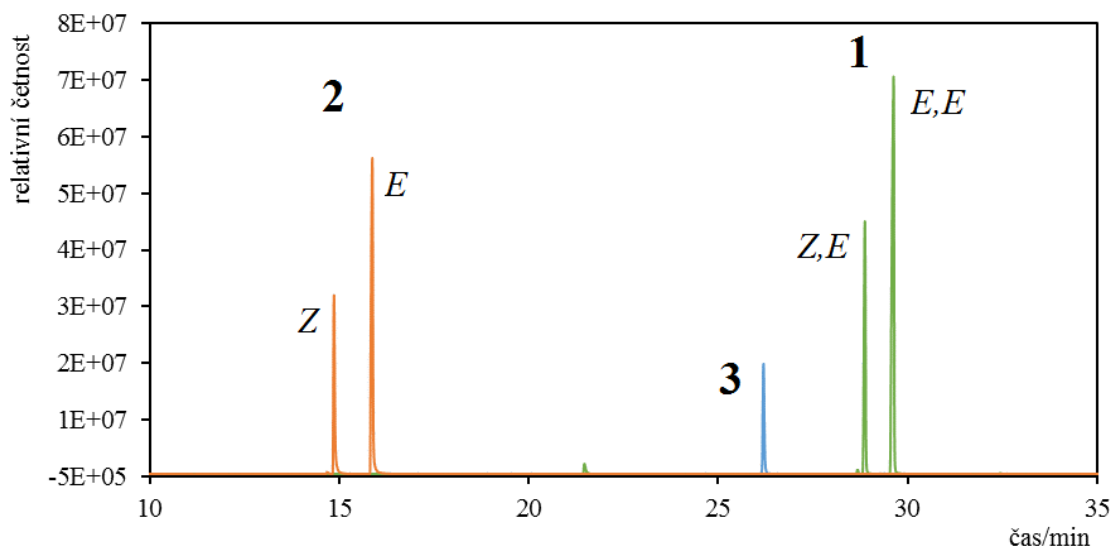
Obr. 4.10: Fotografie TLC desek po detekci vanilinovým činidlem. **A** semipreparativní TLC po chemické oxidaci farnesolu a **B** geraniolu, **C** TLC deska se standardy farnesolu a geraniolu, **D** TLC deska během sledování průběhu oxidace farnesolu a geraniolu.

Jednotlivé produkty oxidace PCC byly purifikovány semipreparativní tenkovrstvou chromatografií. Stejná metoda byla využívána i pro průběžné sledování vývoje reakce. Při studiu FaDH TLC metodu stejným způsobem využívá například Sen

a Bhandari [42,56]. Příklad TLC desky po detekci vanilinovým činidlem je uveden na obr. 4.10.



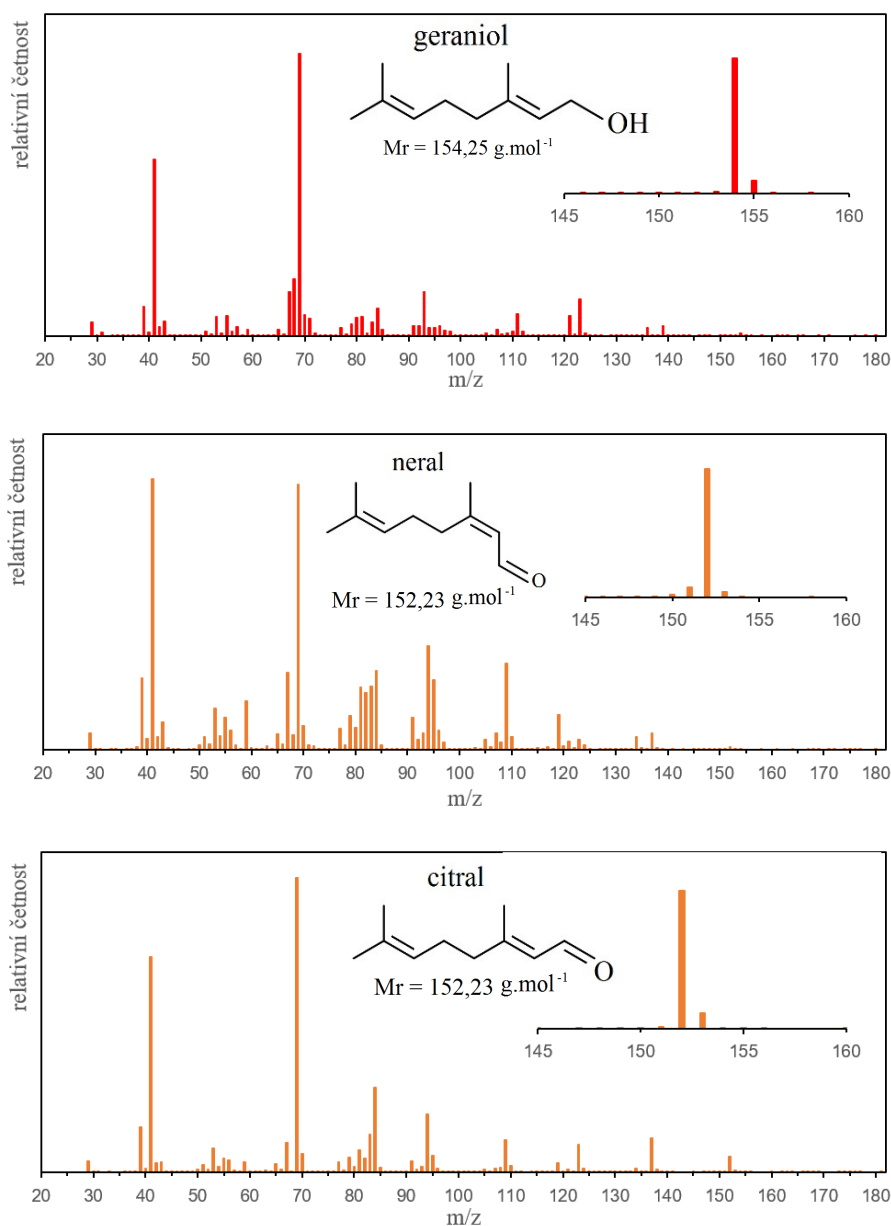
Obr. 4.11: GC/MS chromatogramy **1** *E,E*-farnesolu, **2** geraniolu a **3** (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu vzniklých chemickou oxidací s PCC a separovaných preparativní TLC.



Obr. 4.12: GC/MS chromatogramy **1** farnesalu, **2** citralu a **3** 2,3-dihydrofarnesalu vzniklých chemickou oxidací s PCC a separovaných preparativní TLC.

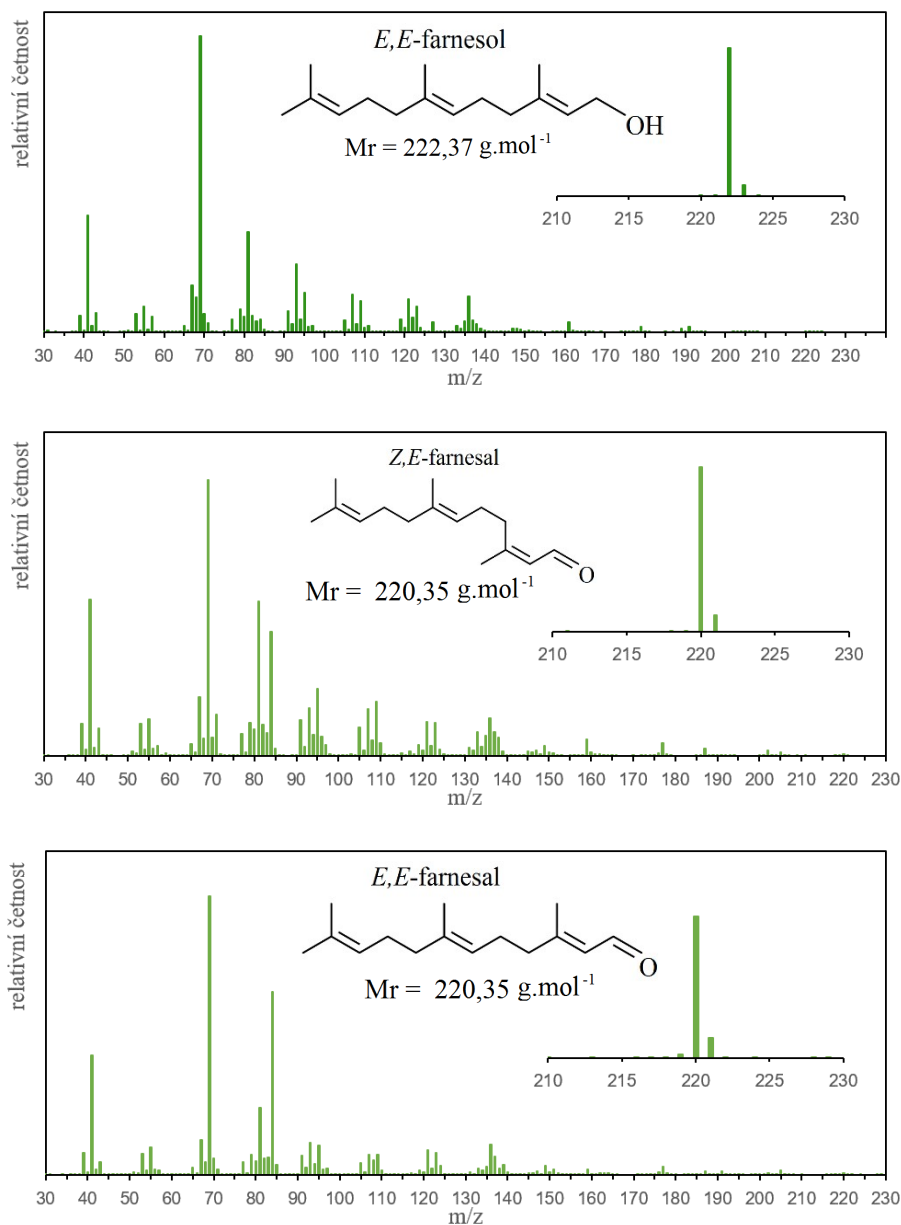
Úspěšnost purifikace byla ověřena pomocí GC/MS a GC/FID. Z chromatogramů z GC/MS na obr. 4.12 je patrné, že z *E,E*-farnesolu stejně jako u enzymových reakcí vznikal *Z,E*-farnesal a *E,E*-farnesal (na chromatogramu v tomto pořadí), z geraniolu citral (tedy směs geranialu a neralu – na chromatogramu opět v tomto pořadí) a v případě (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu vznikal jeden produkt, a to 2,3-dihydrofarnesal,

což lze vysvětlit absencí 2,3-dvojných vazby. Na obr. 4.11 (strana 43) jsou zobrazeny chromatogramy výchozích látek.



Obr. 4.13: GC/MS spektra **1** geraniolu, **2** neralu a **3** geraniolu.

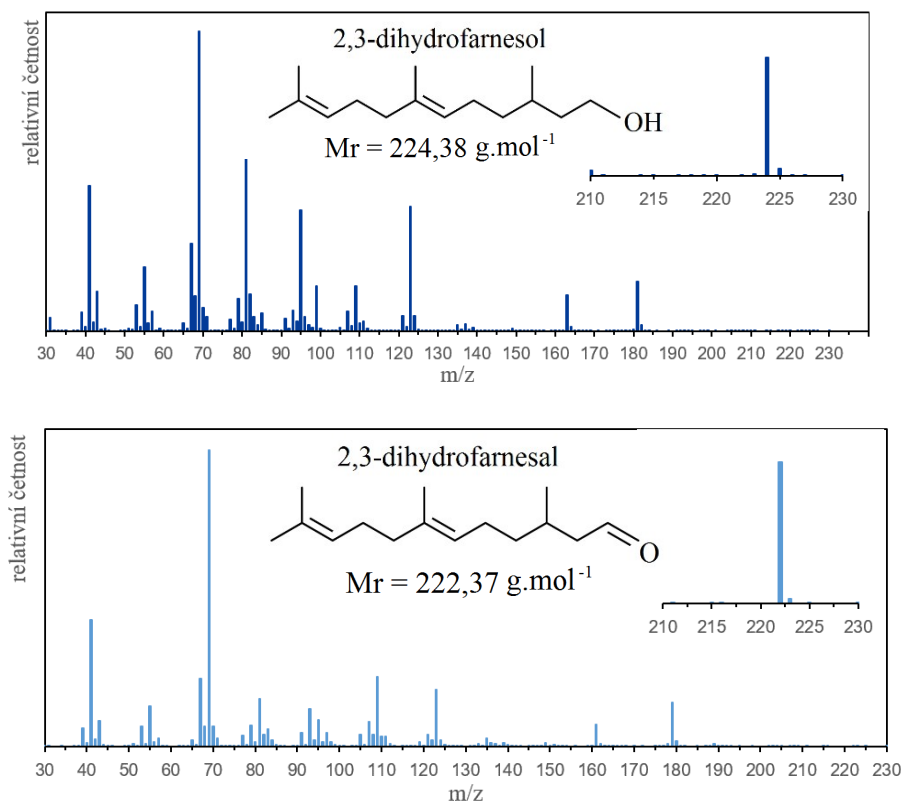
Na obr. 4.13 – obr. 4.15 (strana 46) jsou uvedena hmotnostní spektra výchozích látek a purifikovaných produktů, získaná pomocí elektronové ionizace. Porovnáním s knihovnými spektry bylo potvrzeno, že pozorované produkty jsou aldehydy (posuny -2 hmotnostní jednotky oproti výchozí látce). Je zřejmé, že pouze na základě porovnání spekter aldehydových produktů nebylo možné přiřadit pík k jednotlivým isomerům. Z tohoto důvodu následovalo měření spekter NMR.



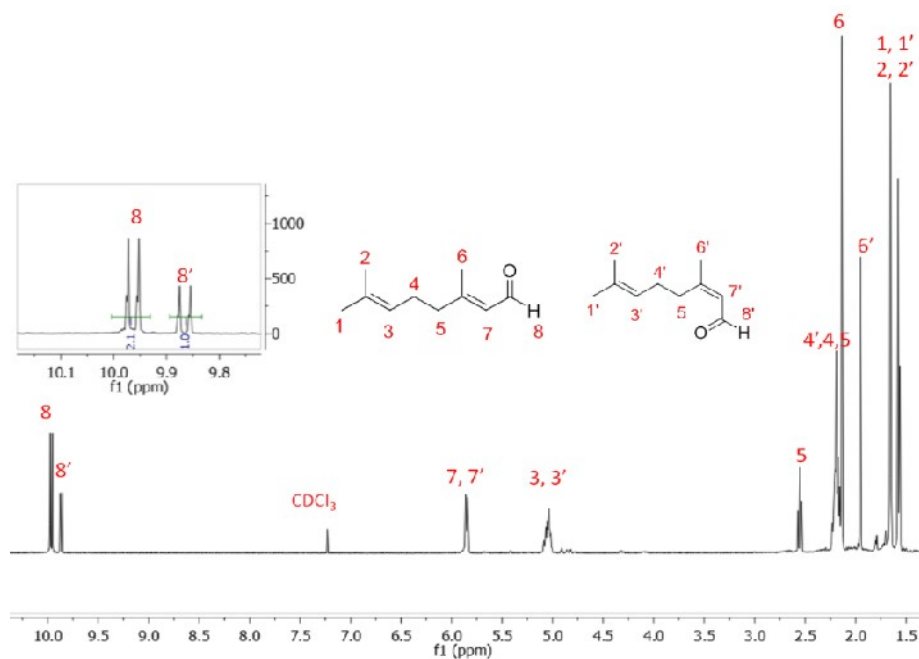
Obr. 4.14: GC/MS spektra **1** farnesolu, **2** *Z,E*-farnesalu a **3** *E,E*-farnesalu.

Nukleární magnetické resonance bylo již dříve využíváno k určení přesné konfigurace isomerů při určování polohy inkorporovaného uhlíku ¹³C u kůrovce *Ips* [12]. Možností rozpoznání isomerů aldehydů vznikajících oxidací geraniolu (tj. geranialu a neralu, kterými se zabývá i tato práce), na základě jejich NMR spektra se zabýval Zeng [57], (viz Obr 4.16, strana 46). Tato práce sloužila jako reference během přiřazování signálů protonů (viz obr. 3.1, strana 31) k signálům v získaných ¹H NMR spektrech (viz obr. 4.17, strana 47), včetně signálů lišících se u jednotlivých isomerů. Na obrázku 4.16 je patrné, že z NMR spektra lze zjistit přítomnost dvou

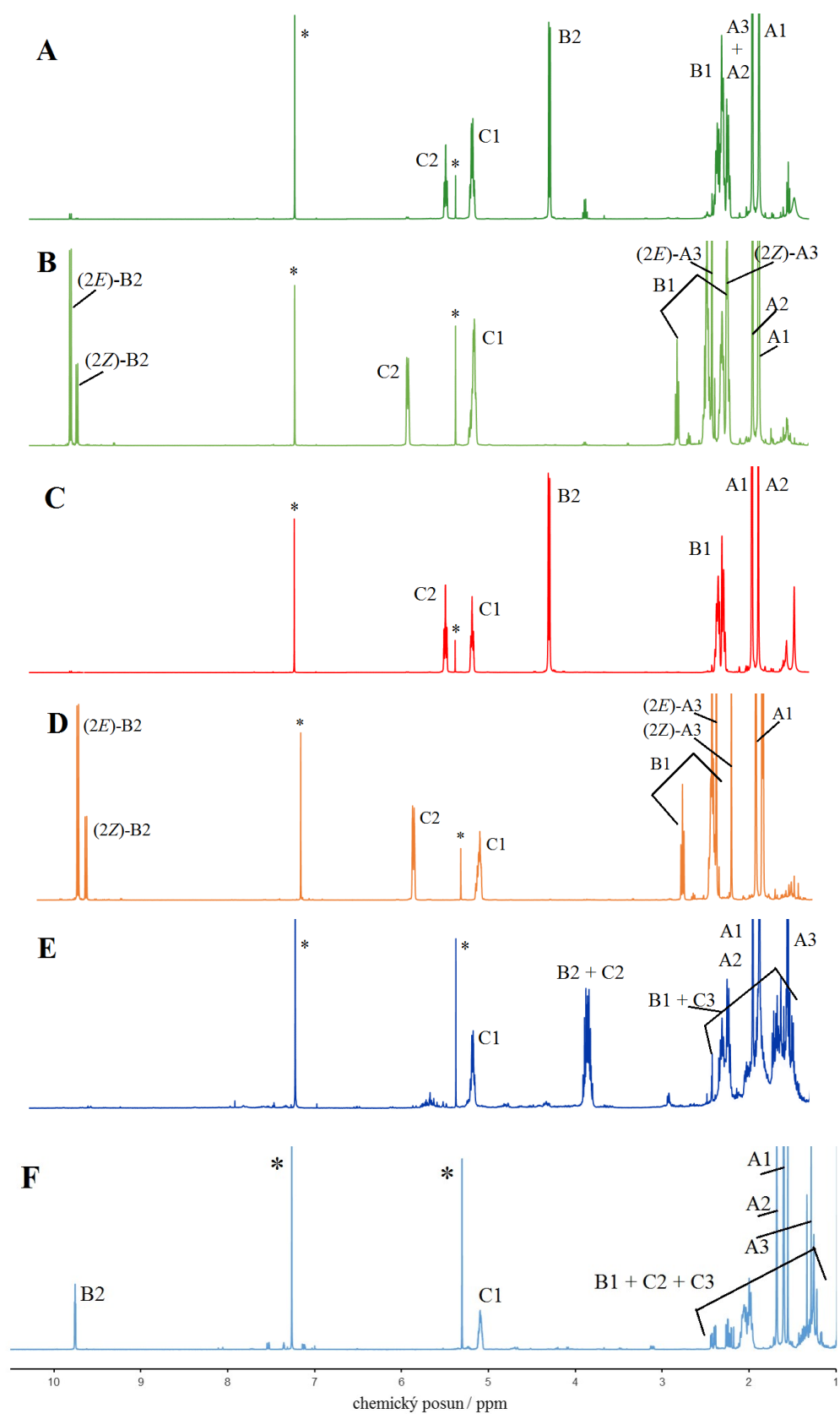
isomerů, zvláště díky signálu aldehydového protonu (chemický posun cca 10 ppm), a kvantifikovat jejich poměr.



Obr. 4.15: GC/MS spektra 1 2,3-dihydrofarnesolu a 2 2,3-dihydrofarnesalu.



Obr. 4.16: ¹H NMR spektrum přírodní směsi citralu [57].



Obr. 4.17: Přibližní ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spekter **A** *E,E*-farnesolu, **B** směsi *E,E*-farnesalu a *Z,E*-farnesalu, **C** geraniolu, **D** citralu, **E** 2,3-dihydrofarnesolu a **F** 2,3-dihydrofarnesolu. * označují rezidua rozpouštědel.

Intenzivnější signál aldehydového protonu u farnesalu a geranialu náleží píku aldehydu s větší koncentrací, v tomto případě *E,E*-farnesalu, nebo geranialu (*E*). Tímto způsobem bylo možné určit, že prvně eluující produktový pík v GC/FID a v GC/MS chromatogramech z enzymových oxidací s menší plochou náleží méně koncentrovanému *Z,E*-farnesalu (viz obr. 4.3 1 A, strana 35) a druhý pík s větší plochou *E,E*-farnesalu (viz obr. 4.3 1 C, strana 35), v případě geraniolu neralu (viz obr. 4.3 2 A, strana 35) a geranialu (viz obr. 4.3 2 C, strana 35).

Kromě ^1H spekter byla pro všech šest standardů měřena také spektra uhlíková a COSY spektra. Uhlíková spektra potvrdila existenci dvou isomerů (signály většiny uhlíků byly oproti těm u výchozí látky zdvojené). COSY spektra napomohla přiřazení signálů protonů.

Na obr. 4.17 A (strana 47) se znovu potvrzuje, že výchozí komerční *E,E*-farnesol nebyl zcela čistý. I z výsledků inkubací je posléze zřejmé, že nečistotou je směs *E,E*-farnesalu a *Z,E*-farnesalu, pravděpodobně vznikající vzdušnou oxidací *E,E*-farnesolu.

V případě (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu byla výchozí látka ve formě roztoku (nejspíše v hexanu, jsou patrné signály alifatického rozpouštědla), avšak tento fakt nebránil potvrzení vzniku příslušného aldehydu.

5 Závěr

Byla vypracována metoda pro stanovení a určování aldehydových produktů reakcí alkoholdehydrogenáz. Potvrdilo se, že enzymy obsažené v hlavové části labiální žlázy jsou schopny oxidovat řadu terpenových alkoholů. *In vitro* inkubace byly částečně optimalizovány.

Produkty enzymových reakcí byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s plamenoionizační detekcí. Ukázalo se, že u 2,3-nenasycených alkoholů vznikají dva isomery, konfigurace *E/Z*, přičemž převažuje *E*-forma. Pro ověření konfigurací produktů bylo posléze využito dalších metod. Jednalo o chemickou oxidaci alkoholů pyridinium-chlorchromátem, při níž docházelo ke tvorbě stejných isomerů, jaké vznikaly biochemickou oxidací. Tyto produkty byly purifikovány pomocí tenkovrstvé chromatografie a následně byly získány jejich hmotnostní spektra pomocí GC/MS a změřena jejich protonová NMR spektra. Tyto dvě metody umožnily potvrzení aldehydové funkční skupiny a přiřazení jednotlivých isomerů k píkům na chromatogramu.

Hexadekanol jako zástupce lineární nasycených alkoholů nebyl enzymy oxidován. V případě (*S*)-2,3-dihydrofarnesolu, látky v přírodě dominantně zastoupené v labiální žláze *B. terrestris*, vzniká pouze jeden produkt a to 2,3-dihydrofarnesal.

6 Seznam použité literatury

- [1] Valterová, I., Urbanová, K.: *Chemické listy*. 1997, **91**(10):856–857.
- [2] Baker, F. C., Mauchamp, B., Tsai, L. W., Schoeley, D. A.: *J. Lipid Res.* 1983, **24**(12):1586–1594.
- [3] Sekiwa-Iijima, Y., Aizawa, Y., Kubota, K.: *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**(12):5902–6.
- [4] Ayasse, M. & Jarau, S.: *Annu. Rev. Entomol.* 2014, **59**:299–319.
- [5] Pavelka, M., Smetana, V.: *Čmeláci, Metodika ČSOP číslo 28*. Valašské Meziříčí: 76/03 ZO ČSOP, 2003.
- [6] Alford, D. V.: *Bumblebees*. Londýn, VB: Davis-Pontyer Limited, 1975.
- [7] Přidal, A.: *Checklist of the bees in the czech republic and Slovakia with comments on their distribution and taxonomy*. Dostupné z URL: <<http://user.mendelu.cz/apridal/text/016.pdf>> [cit. 25.4.2016].
- [8] Ptáček, V., et al.: *Základy hromadného chovu čmeláka zemního (Bombus terrestris L.) a jeho využití k opylování*. Troubsko: Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r. o. Troubsko; Zemědělský výzkum, spol. s r. o. Troubsko, 2010.
- [9] Krieg, P., Hofbauer, J., Komzáková, O.: *Čmeláci a jejich podpora v zemědělské krajině*. Praha: Výzkumný ústav včelařský DoI, 2009.
- [10] Schulz, S. (ed.): *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals*. 2. vydání. Berlín: Springer, 2005:134–169.
- [11] Goulson, D.: *Bumblebees: Behaviour, Ecology, and Conservation*. Dostupné z URL: <http://site.ebrary.com/lib/cuni/reader.action?docID=10353944> [cit. 12.3.2016].
- [12] Luxová, A., Valterová, I.: *Chemické Listy*. 2006, **100**:243–255.
- [13] Morgan, E. D.: *Biosynthesis in Insects*. Cambridge, GB: Royal Society of Chemistry, 2004.
- [14] Žáček, P., Prchalová-Hornáková, D., Tykva, R., Kindl, J., Vogel, H., Svatoš, A., Pichová, I., Valterová, I.: *ChemBioChem*. 2013, **14**(3):361–371.
- [15] Kindl, J., Valterová, I., Hovorka O.: *Živa*. 1998, **4**:169-172.
- [16] Amsalem, E., Kiefer, J., Shultz, S.: *J. Chem. Ecol.* 2014, **40**(8):900–912.
- [17] Kindl, J., Valterová, I., Hovorka, O.: *J. Chem. Ecol.* 1998, **25**(7):1489–1500.
- [18] Ågren, L., Cederberg, B., Svensson, B. G.: *Zoon*. 1979, **7**:1–14.

- [19] Morse, D., Meighen, E.: *J. Chem. Ecol.* 1986, **12**(2):335–351.
- [20] Luxová, A., Valterová, I., Stránský, K., Hovorka, O., Svatoš, A.: *Chemoecology*. 2003, **13**(2):81–87.
- [21] Urbanová, K., Valterová, I., Hovorka, O., Kindl, J.: *Eur. J. Entomol.* 2001, **98**:111–115.
- [22] Luxová, A., Urbanová, K., Valterová, I., Terzo, M., Borg-Karlson, A-K.: *Chirality*. 2004, **16**(4):228–233.
- [23] Kullenberg, B., Bergström, G., Ställberg-Stenhagen, S.: *Acta. Chem. Scand.* 1970, **24**(4):1481–1485.
- [24] Žáček, P., Kindl, J., Frišonsová, K.: *ChemPlusChem*. 2015, **80**:839–850.
- [25] Kofroňová, E., Nekola, A., Cvačka, J., Kindl, J., Valterová, I.: *Molecules*. 2014, **19**(2): 2330–2343.
- [26] Bermejo, J., Blanco, C. G., Guillen, M. D.: *Chromatogr.* 1986, **351**:425–432.
- [27] Plettner, E., Slessor, K. N., Winston, M. L.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1998, **28**:31–42.
- [28] Plettner, E., Slessor, K. N., Winston, M. L.: *Science*. 1996, **271**:1851–1853.
- [29] Meinert, C., Meierhenrich, U. J.: *Angew. Chem.* 2012, **51**:10460–10470.
- [30] Bartell, L. S., Higginbotham, H. K. J.: *Chem. Phys.* 1965, **42**:851.
- [31] Prchalová D, Buček Arabcová J, Žáček P, Kindl J, Valterová I, Pichová I. *Chembiochem*. 2016 Feb;17(3):260-7
- [32] Matucha, M., Jockisch, V., Verner, P., Anders, G. J.: *Chromatogr.* 1991, **588**:251–258.
- [33] Žáček, P., Kalinová, B., Šobotník, J., Hovorka, O., Ptáček, V., Coppée, A., Verheggen, F., Valterová, I.: *J. Chem. Ecol.* 2009, **35**(6):698–705.
- [34] Strube-Bloss, M. F., Brown, A., Spaethe, J., et al.: *PloS one*. 2015, **10**(9), p.e0139296.
- [35] Potty, V. H., Bruemmer, J. H.: *Phytochemistry*. 1970, **9**(5):1003–1007.
- [36] Luan, F., Mosandl, A., Münch, A., Wüst, M.: *Phytochemistry*. 2005, **66**(3):295–303.
- [37] Iijima, Y., Wang, G., Fridman, E., Pichersky, E.: *Arch. Biochem. Biophys.* 2006, **448**(1–2):141–149.
- [38] Iijima, Y., Koeduka, T., Suzuki, H., Kubota, K.: *Plant Biotechnol.* 2014, **31**:525–534.

- [39] Sangwan, R. S., Singh-Sanghwan, N., Luthra, R.: *J. Plant Physiol.* 1993, **142**:129–134.
- [40] Hassan, M., Maarof, N. D., Ali, Z. M., Noor, N. M., Othman, R., Mori, N.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2012, **76**(8):1463–1470.
- [41] Inoue, H., Tsuji, H., Uritani, I.: *Agric. Biol. Chem.* 1984, **48**(3):733–738.
- [42] Sen, S. E., Garvin, G. M.: *J. Agric. Food Chem.* 1995, **43**:820–825.
- [43] Mayoral, J. G., Nouzova, M., Navare, A., Noriega, F. G.: *P. Nation. Acad. Sci. USA.* 2009, **106**(50):21091–21096.
- [44] Sperry, A. E., Sen, S. E.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2001, **31**(2):171–178.
- [45] Noge, K., Kato, M., Mori, N., Kataoka, M., Tanaka, Ch., Yamasue, Y., Nishida, R., Kuwahara, Y.: *FEBS J.* 2008, **275**(11):2807–2817.
- [46] Case, G. L., He, L., Mo, H., Elson, Ch E.: *Lipids.* 1995, **30**(4):357–359.
- [47] Morse, D., Meighen, E.: *J. Biol. Chem.* 1984, **259**(1):475–80.
- [48] Lüddecke, F., Wülfing, A., Timke, M., Germer, F., Weber, J., Dikfidan, A., Rahnfeld, T., Linder, D., Meyerdierks, A., Harder, J.: 2012. *Appl. Environ. Mikrobiol.* 2012, **78**(7):2128–2136.
- [49] Sato-Masumoto, N., Ito, M.: *Phytochemistry.* 2014, **104**:12–20.
- [50] Sekiwa-Iijima, Y., Aizawa, Y., Kubota, K.: *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**(12):5902–5906.
- [51] Corey, E. J., Gilman, N. W., Ganem, B. E.: *J. Am. Chem. Soc.* 1968, **90**(20):5617-5618.
- [52] Corey, E. J., Suggs, W. J.: *Tetrahedron Lett* 1975, **31**:2647–2650.
- [53] Stampfer, W., Kosjek, B., Faber, C., Kroutil, W.: *J. Org. Chem.* 2003, **68**(2):402-406.
- [54] Stampfer, W., Kosjek, B., Kroutil, W., Faber, K.: *Biotechnol. Bioengin.* 2003, **81**(7):865–869.
- [55] Fossati, E., Elena Fossati, Fausto Polentini, Giacomo Carrea, Sergio Riva.: *Biotechnol. Bioengin.* 2006, **93**(6):1216–1220.
- [56] Bhandari, J., Fitzpatrick, A.H., Crowell, D. N.: *Plant Physiol.* 2010, **154**(3):1116–1127.
- [57] Zeng, S., Kapur, A., Patankar, M. S., Xiong, M. P.: *Pharmaceut. R* 2015, **32**(8):2548–2558.