

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



Studium vybraných organických sloučenin síry
rodu *Allium*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Ondřej Vrobel
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok:	2019

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych především poděkoval doc. RNDr. Petrovi Tarkowskému, Ph.D. za odborné rady, cenné připomínky a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Poděkování dále patří Mgr. Tiborovi Béresovi, Ph.D. a Ing. Sanje Čavar Zeljković, Ph.D. za odborné rady, cenné připomínky a poskytnutou pomoc, Ing. Heleně Stavělíkové, Ph.D. za poskytnutý biologický materiál a konzultaci nomenklatury rostlinných druhů rodu *Allium*, dále doc. Mgr. Marku Petřivalskému, Ph.D. za cenné rady a konzultace a také za poskytnutý prostor a prostředky k vykonání experimentů.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Ondřej Vrobel
Název práce	Studium vybraných organických sloučenin síry rodu <i>Allium</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin; Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; pracoviště Olomouc
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Česnek je významnou plodinou někdy označovanou také jako nutraceutikum, jež je charakteristické obsahem specifických sirných látek. Právě těm je věnována teoretická část práce. Jsou uvedeny informace o jejich vzniku, biosyntetické dráze i jejich biologických účincích. Společně s těmito informacemi jsou uvedeny metody stanovení skupin sirných látek. Experimentální část byla věnována modifikaci metody stanovení S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů (ACSO) pomocí kapilární elektroforézy. Pozornost byla věnována optimalizaci extrakce i separace pro zachování nízkých provozních nákladů. Touto metodou byly stanoveny obsahy ACSO ve vybraných odrůdách česneku a dalších plodinách rodu *Allium*. V souvislosti byla upravena i metoda stanovení enzymové aktivity alliinasy. Byly stanoveny hodnoty K_m pro dva substráty. Zvolené odrůdy česneku byly následně charakterizovány i z pohledu aktivity alliinasy. Vysoká aktivita enzymu byla zjištěna u odrůd, které zároveň obsahují vysoké hladiny ACSO.

Klíčová slova	<i>Allium</i> , sirné aminokyseliny, S-alk(en)ylcysteinsulfoxidy, alliinasa.
Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Ondřej Vrobel
Title	Study of selected organic sulphur compounds in <i>Allium</i> genus
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Olomouc
Supervisor	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

Garlic is an important crop even categorised as nutraceutical food which contains unique sulfur compounds that are characteristic for whole *Allium* genus. Theoretical part of this thesis is devoted to these compounds. It provides information about their productions, biosynthetic pathway and biological effects. Theoretical part also contains information about method for determination of several groups of sulfur compounds. In experimental part method and extraction procedure was optimised for quantification of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides (ACSO) using micellar electrokinetic chromatography. Selected garlic cultivars and some *Allium* crops were characterised based on content of ACSO. In extent method for determination of enzyme activity was adopted. K_m values of two substrates were obtained. Alliinase activity was measured in the same garlic cultivars. It was found that cultivars with high content of ACSO also had high activity of alliinase.

Keywords	<i>Allium</i> , sulfur amino acids, S-alk(en)ylcysteine sulfoxides, alliinase.
Number of pages	77
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Česnek kuchyňský	10
2.1.1 Chemie česneku	11
2.1.2 Sloučeniny síry	11
2.1.2.1 Sirné aminokyseliny	11
2.1.2.2 Deriváty cysteinu	12
2.1.2.3 Thiosulfináty a další těkavé látky	14
2.1.3 Produkce sirných sloučenin <i>in vivo</i>	17
2.1.3.1 Biosyntetická dráha	17
2.1.3.2 Profily sirných sloučenin během skladování	20
2.1.4 Alliinasa	21
2.1.5 Sirné látky vznikající zpracováním česneku	23
2.1.6 Další aktivní látky česneku	24
2.2 Farmakologické využití česneku	25
2.2.1 Farmakologické preparáty	25
2.2.2 Biologické účinky S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů	26
2.2.3 Biologické účinky thiosulfinátů - allicinu	26
2.2.4 Biologické účinky produktů rozpadu allicinu	29
2.2.5 Biologické účinky S-allylcysteinu	29
2.3 Kvantifikace sirných látek	30
2.3.1 Časté přístupy pro stanovení S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů	30
2.3.1.1 Kapilární elektroforéza ve stanovení S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů	31
2.3.2 Stanovení enzymové aktivity alliinasy	32
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1 Materiál a přístroje	34
3.1.1 Chemikálie	34
3.1.1.1 Biologický materiál	34
3.1.2 Instrumentace a pomůcky	35
3.1.3 Software	35
3.2 Metody	36
3.2.1 Extrakce a derivatizace pro stanovení S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů	36
3.2.1.1 Extrakce s využitím inhibitoru alliinasy	36
3.2.1.2 Extrakce s využitím kyseliny mravenčí	36
3.2.1.3 Extrakce čerstvé hmoty	37
3.2.1.4 Derivatizace činidlem FMOC	37
3.2.2 Analýza micelární elektrokinetickou chromatografií	37
3.2.3 Stanovení enzymatické aktivity alliinasy	38

3.2.3.1 Příprava hrubého extraktu alliinasy	38
3.2.3.2 Stanovení aktivity a měření kinetiky	38
3.2.3.3 Stanovení celkových proteinů	39
3.2.4 Identifikace produktu reakce	39
4 VÝSLEDKY	40
4.1 Úprava extrakce biologického materiálu	40
4.1.1 Stabilita analytů po derivatizaci	42
4.1.2 Zvolení reprezentativního vzorku česneku	44
4.2 Analýza micelární elektrokinetickou chromatografií	46
4.2.1 Kalibrace	48
4.2.2 Analýza ACSO v dalších maticích	50
4.2.3 Stabilita migračních časů	50
4.2.4 Limit detekce a kvantifikace	53
4.2.5 Profily ACSO ve vybraných odrůdách česneku	53
4.3 Stanovení enzymové aktivity	54
4.3.1 Adaptace měření v malých objemech	55
4.3.2 Měření kinetiky alliinu	55
4.3.3 Produkt reakce dimethylthiosulfinátu s 4-merkaptopyridinem	57
4.3.4 Měření kinetiky methiinu	59
4.3.5 Celkové proteiny	61
4.3.6 Stanovení aktivity alliinasy ve vybraných odrůdách	62
4.3.7 Aktivita alliinasy v dalších maticích	63
5 DISKUZE	64
6 ZÁVĚR	70
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	77

CÍLE PRÁCE

1. Vypracovat literární rešerši s klíčovými slovy: *Allium*, sirné aminokyseliny, S-alk(en)ylcysteinsulfoxidy, alliinasa.
2. Zavedení metody kvantitativní analýzy vybraných sirných sloučenin v česneku kuchyňském a příbuzných druzích.
3. Stanovení enzymové aktivity alliinasy ve vybraných biologických materiálech.

1 ÚVOD

Česnek je starobylou plodinu, která je někdy také označována jako nutraceutikum. Svým silným specifickým aroma si získala neotřesitelnou pozici v kulinářském světě i v povědomí široké veřejnosti. Za vším stojí široké spektrum specifických sírných látek, kterým je věnována teoretická část této práce. V neporušených pletivech jsou uloženy zásobní sírné látky. V případě uvolnění alliinasy, enzymu katalyzující jejich přeměnu, poškozením pletiv dochází k rychlé produkci těkavých látek. Tyto těkavé látky jsou nositeli aroma a biologických účinků. Spektrum účinků je velmi bohaté a již v dávné minulosti nezůstalo nepovšimnuto, jež je doloženo ve zmínkách v antické literatuře. V dnešní době se česnek stále těší velké oblibě a v celosvětovém měřítku lze pozorovat neustále zvyšující se produkci česneku.

Experimentální část práce je věnována stanovení S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů, již zmíněných zásobních látek. K tomuto účelu byla využita kapilární elektroforéza, konkrétně její modifikace, micelární elektrokinetická chromatografie. Jednou z výhod kapilární elektroforézy jsou nízké provozní náklady a nízká spotřeba chemikálií. Tento směr byl zohledněn a stal se z jedním cílů optimalizace.

Nedílnou součástí sírných látek je enzym s nimi spjatý. Druhým z cílů bylo stanovení aktivity alliinasy. V podobném trendu byl brán zřetel na minimalizaci měřítka experimentu. Část je věnována i průběhu reakce s dalšími substráty a část i charakterizaci odrůd česneku z pohledu aktivity alliinasy ve stroužcích.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Česnek kuchyňský

Česnek kuchyňský (*Allium sativum* L.) je nedřevnatá trvalá bylina rodu *Allium*, který čítá mezi 600 až 750 druhů, řadící se podle systému APG III k amarylkovitým (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009). Lidstvu je tato rostlina známa od nepaměti, kulturní významnost této plodiny dokazují časté zmínky v antické literatuře. Sloužil jako potravina, ale i jako medicínální přípravek. Byl aplikován preventivně i akutně při různých onemocněních. Látky přítomné v česneku mají rozmanité biologické účinky, kterých si byli i v dřívějších dobách vědomi. Přisuzována mu byla řada léčebných a prospěšných účinků, avšak některé jsou z dnešního pohledu smyšlené až bájně. Sloužil například při léčbě plicních onemocnění, a to bronchitidy či zápalu plic nebo žaludečních problémů. Věřilo se, ale i v jeho afrodisiakální účinky či schopnost prodlužovat délku života (Aviello *et al.*, 2009; Block, 2010). Po staletí lidé využívali antimikrobiálních účinků česneku, kterým ošetřovali rány, mezi které můžeme zahrnout tržné rány od zvířat či pokousání. Z těchto skutečností pravděpodobně vyvstala pověra, podle které česnek slouží k ochraně před bájnými upíry. Antimikrobiálních účinků si také všiml Louis Pasteur v 60. letech 19. století, což následně vedlo k využití česneku jako prevence gangrény v první a druhé světové válce (Rose *et al.*, 2005).

Rostlina obvykle dorůstá výšky až 90 cm a vytváří typickou podzemní členěnou cibuli obalenou několika suchými suknicemi bílé nebo fialové barvy. Členitost cibule se liší, *A. sativum* ssp. *sativum* vytváří cibuli s velkým počtem stroužků v několika vrstvách, které mohou připomínat soustředné spirály, kdežto *A. sativum* ssp. *ophioscorodon* vytváří jednu řadu velkých stroužků okolo zdřevnatělého stonku (Block, 2010). Listy jsou dlouhé kopinaté, většinou zelené barvy, mohou být modrozelené i lehce našedlé. Květenství se vytváří na konci stonku, které je navíc obaleno jako celek v listu. K nasazování květů dochází v červenci a končí v srpnu, nejčastěji je však množeno vegetativně sadbou stroužků (Aviello *et al.*, 2009).

Původem pravděpodobně pochází z centrální Asie a jihozápadní oblasti Sibiře, dnes je česnek pěstován převážně v Číně a Jihovýchodní Asii. V roce 2017 bylo vypěstováno celosvětově přes 28 mil. tun česneku, z čehož 78,8 % bylo vypěstováno v Číně a 6,0 % v Indii. Mezi významné evropské producenty se řadí Rusko (0,92 % světové produkce), Španělsko (0,98 %) a Ukrajina (0,66 %). V Česku bylo v roce 2017 vypěstováno

1340 tun česneku. Za poslední roky se produkce česneku v Česku i celosvětově neustále zvyšuje. K největšímu poklesu pěstování v Česku došlo po roce 2001, kdy se produkce snížila o 96,5 % (FAOSTAT, 2019).

2.1.1 Chemie česneku

Studium chemického složení česneku začalo velmi brzo už na začátku 20. století a dodnes česnek zůstává jednou z nejvíce studovaných plodin, převážně díky prokázaným zdraví prospěšným účinkům. Nejvýznamnější z těchto prospěšných chemických komponent lze rozdělit do dvou skupin. Na organické sloučeniny, které ve své struktuře obsahují síru a ty které ji neobsahují. Prospěšné účinky jsou především připisovány unikátním sirným sloučeninám, z nichž nejznámější a nejvíce studovanou je allicin (Aviello *et al.*, 2009). Ten však paradoxně není v neporušených pletivech přítomný a ani není rostlinami přímo produkován. Pochopení chemie česneku a cibule kuchyňské (*Allium cepa* L.) trvalo řadu let, avšak dnes je známo, že v neporušených pletivech se vyskytuje pár zásobních sloučenin. Z řádově jednotek zásobních sloučenin může vzniknout přibližně 50 těkavých sirných sloučenin zajišťující aroma nejen česneku, ale i příbuzných plodin. Tato chemická rozmanitost je jedním z důvodů velkého zájmu o studium česneku (Rose *et al.*, 2005).

2.1.2 Sloučeniny síry

2.1.2.1 Sirné aminokyseliny

Dvěma základními sirnými aminokyselinami v živých organismech jsou cystein a methionin. Obě jsou klíčové pro správnou funkci metabolismu, a to nejen pro syntézu proteinů. V proteinech cystein zastává několik funkcí, pomocí disulfidových vazeb pomáhá utvářet jejich terciární a kvarterní strukturu, má také katalytickou funkci a jako součást FeS klastrů je nezbytný pro elektronový přenos fotosyntézy a respirace. V metabolismu hraje významnou roli, jelikož je jediným donorem sulfidu pro výstavbu řady dalších látek obsahující síru v redukované formě. Reaktivita nukleofilního thiolu činí z těchto látek mnohostranné molekuly. Pro primární metabolismus to jsou koenzym A, glutathion, biotin, kyselina lipoová a thiamin (Hell *et al.*, 2002). Na druhou stranu vysoce reaktivní povaha cysteinu je příčinou toxických účinků, zvláště ve zvýšených koncentracích a jeho hladina je proto přísně regulována. Jednou z možností regulace je degradace. Při katabolismu cysteinu dochází k uvolnění síry,

kteřá je zabudována do zmíněných FeS klastrů nebo je uvolněna ve formě sulfanu, důležitá signální molekuly (Hildebrandt *et al.*, 2015).

Metabolismus methioninu je přímo svázaný s cysteinem, ze kterého získává atom síry. Při proteosyntéze slouží jako iniciátor translace mRNA a stejně jako cystein je prekurzorem pro řadu dalších látek jako například polyaminy, vitaminy, kofaktory, osmoprotektanty či ethylen. Nejprve je převeden v aktivovanou formu S-adenosylmethonin (SAM), koenzym methyltransferas. SAM může sloužit jako donor methylové skupiny (tvorba osmoprotektantů) či celého uhlíkového skeletu (produkce polyaminů) (Wirtz a Droux, 2005).

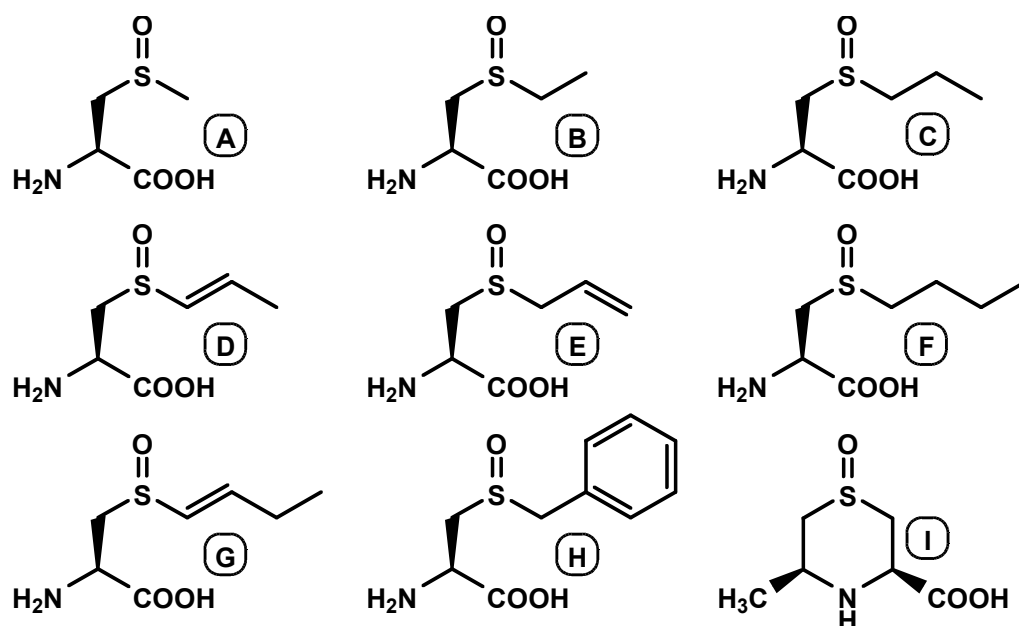
2.1.2.2 Deriváty cysteinu

Specifické sirmé sloučeniny jsou odvozeny od cysteinu. V pletivech jsou kumulovány ve dvou formách, první z těchto forem jsou biosyntetické meziprodukty dipeptidy γ -glutamyl-S-alk(en)ylcysteiny (γ GC) a druhou formou koncové produkty biosyntézy, S-alk(en)ylcysteinsulfoxidy (ACSO). Ačkoliv se jedná o sekundární metabolity, tak jsou tyto látky intenzivně produkovány a v zásobních orgánech jsou uchovávány ve vysokých koncentracích. V případě česneku veškeré sirmé látky zastávají hmotnostní podíl mezi 1 až 5 % sušiny. Z ACSO následně vzniká skupina atraktivních látek nazývané thiosulfináty (Jones *et al.*, 2004).

Známý jsou čtyři základní ACSO a další minoritní (viz obr. 1). Mezi majoritní zástupce řadíme alliin (S-allyl-L-cysteinsulfoxid), methiin (S-methyl-L-cysteinsulfoxid), isoalliin ((E)-S-(1-propenyl)-L-cysteinsulfoxid) a propiin (S-propyl-L-cysteinsulfoxid) (Rose *et al.*, 2005). Minoritními zástupci jsou nedávno objevené sloučeniny ethiin (S-ethyl-L-cysteinsulfoxid) a butiin (S-n-butyl-L-cysteinsulfoxid) identifikovaný v česneku sicilském (*Allium siculum* Ucria) (Kubec *et al.*, 2000; Kubec *et al.*, 2002). Více o ojedinělých zástupcích ACSO níže v textu.

Profil ACSO je druhově specifický. Alliin může být považován za poměrně vzácný, existuje pouze malý počet druhů, jimiž je produkován ve vysokých množstvích. Jedná se především o česnek kuchyňský (*A. sativum* L.), česnek medvědí (*Allium ursinum* L.) a nebo třeba pažitku čínskou (*Allium tuberosum* Rotler ex Spreng). Methiin na druhou stranu je velmi rozšířený. Pro přehled lze uvést cibuli kuchyňskou (*Allium cepa* L.), pór zahradní (*Allium ampeloprasum* var. *porrum* L.), pažitku pravou¹ (*Allium*

1 Česká nomenklatura převzata dle Hýbl *et al.* 2016



Obr. 1: Známí zástupci S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů (ACSO). **(A)** methiin (S-methyl-L-cysteinsulfoxid), **(B)** ethiin (S-ethyl-L-cysteinsulfoxid), **(C)** propiin (S-propyl-L-cysteinsulfoxid), **(D)** isoalliin ((*E*)-S-1-propenyl-L-cysteinsulfoxid), **(E)** alliin (S-allyl-L-cysteinsulfoxid), **(F)** butiin (S-butyl-L-cysteinsulfoxid), **(G)** homoisoalliin (S-1-butenylcysteinsulfoxid), **(H)** petiveriin (S-benzylcysteinsulfoxid) a **(I)** cykloalliin ((**G**) a (**H**) adaptováno dle Kubec *et al.*, 2010; **(I)** adaptováno dle Ichikawa *et al.*, 2006; ostatní adaptováno dle Rose *et al.*, 2005).

schoenoprasum L.) či česnek medvědí, v česneku kuchyňském je zastoupen minoritně. Dokonce je produkován některými druhu čeledi *Brassicaceae* ku příkladu hlávkové zelí (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), brokolice (*Brassica oleracea* var. *asparogoides* DC.) či pekingské zelí (*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.). Propiin je produkován řadou druhů příbuzných cibuli, avšak v nízkých koncentracích. Ethiin byl prokázán u několika druhů ve velmi malých koncentracích. Isoalliin je typickým majoritním zástupcem cibule kuchyňské a příbuzných druhů (Krest *et al.*, 2000; Kubec *et al.*, 2000; Kubec a Dadáková, 2008).

Mezi ACSO lze zařadit příbuznou látku cykloalliin, která byla identifikována v plodinách *Allium*. Jedná se o heterocyklickou slouženinu odvozenou od thiomorfolinu, která vzniká cyklizací isoalliinu. Jeho funkce stále známá není, ale Ichikawa *et al.* (2006) na něj nahlíží jako na možný marker kvality skladování česneku. Během dormance stále dochází ke změnám obsahu ACSO u všech plodin. Cykloalliin je jedním z nich a při nežádoucích vyšších teplotách jeho koncentrace narůstá rychleji než při teplotách nižších, které jsou vhodné pro dlouhodobé skladování. Tento trend

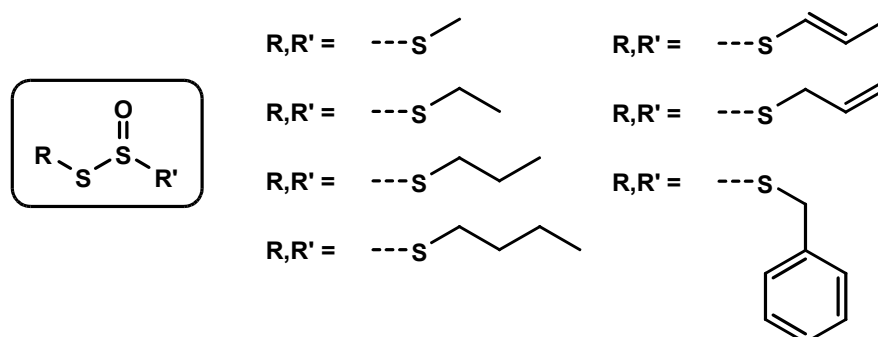
je však podobný nejen pro cykloalliin, ale i pro ostatní ACSO (Kamata *et al.*, 2016). Koncentrace isoalliinu se navíc napříč kultivary česneku velmi odlišuje (Ovesná *et al.*, 2007).

2.1.2.3 Thiosulfináty a další těkavé látky

K přeměně zásobních sloučenin je nutný enzym alliinasa (alliinlyasa EC 4.4.1.4), která je uchovávána ve vakuole. Její substráty jsou uloženy v cytoplasmatických vezikulách a pouze po dekompartmentaci dochází k rychlé přeměně. Příčinou může být spásání, napadení mikroorganismy či kulinářské využití člověkem. Alliinasa katalyzuje rozklad ACSO na příslušnou sulfenovou kyselinu, kyselinu pyrohroznovou a amoniak (Shimon *et al.*, 2007). Sulfenové kyseliny jsou vysoce reaktivní a vzájemnou kondenzací dochází k jejich částečné stabilizaci za vzniku thiosulfinátů, biologicky aktivních látek. Z alliinu vznikající diallylthiosulfinát se nazývá allicin, ten je typický výrazným aroma česneku a ostrou vůní. Aroma vznikajícího dimethylthiosulfinátu původem z methiinu je popisováno jako vůně čerstvé cibule či vůně zelí (Jones *et al.*, 2004).

Při vysoké koncentraci mají nepříjemné sensorické účinky. Allicin a diallyldisulfid (viz dále v textu) sdílí některé strukturní prvky s allylisothiokyanatanem. Jedná se o látky, které aktivují TRPA1 a TRPV1 receptory, jež se podílí na signalizaci bolesti u savců, a plní funkci repelentu zvířecích predátorů (Bautista *et al.*, 2005, Salazar *et al.*, 2008). Aktivovaný disulfid disponuje silnými antimikrobiálními účinky, další vlastností, kterou přilákaly pozornost člověka, je, že se jedná právě o látky zajišťující silné, specifické aroma a chuť typické pro celý rod *Allium* (Block, 2010).

Thiosulfináty (viz obr. 2) vznikají kondenzací dvou sulfenových kyselin, které nemusí být identické. Tato skutečnost je důvodem vysoké rozmanitosti vznikajících



Obr. 2 Obecná struktura thiosulfinátů. Alk(en)ylové skupiny korespondují s přirozenými ACSO, ze kterých pochází (Adaptováno z Rose *et al.*, 2005; a Kubec *et al.*, 2010).

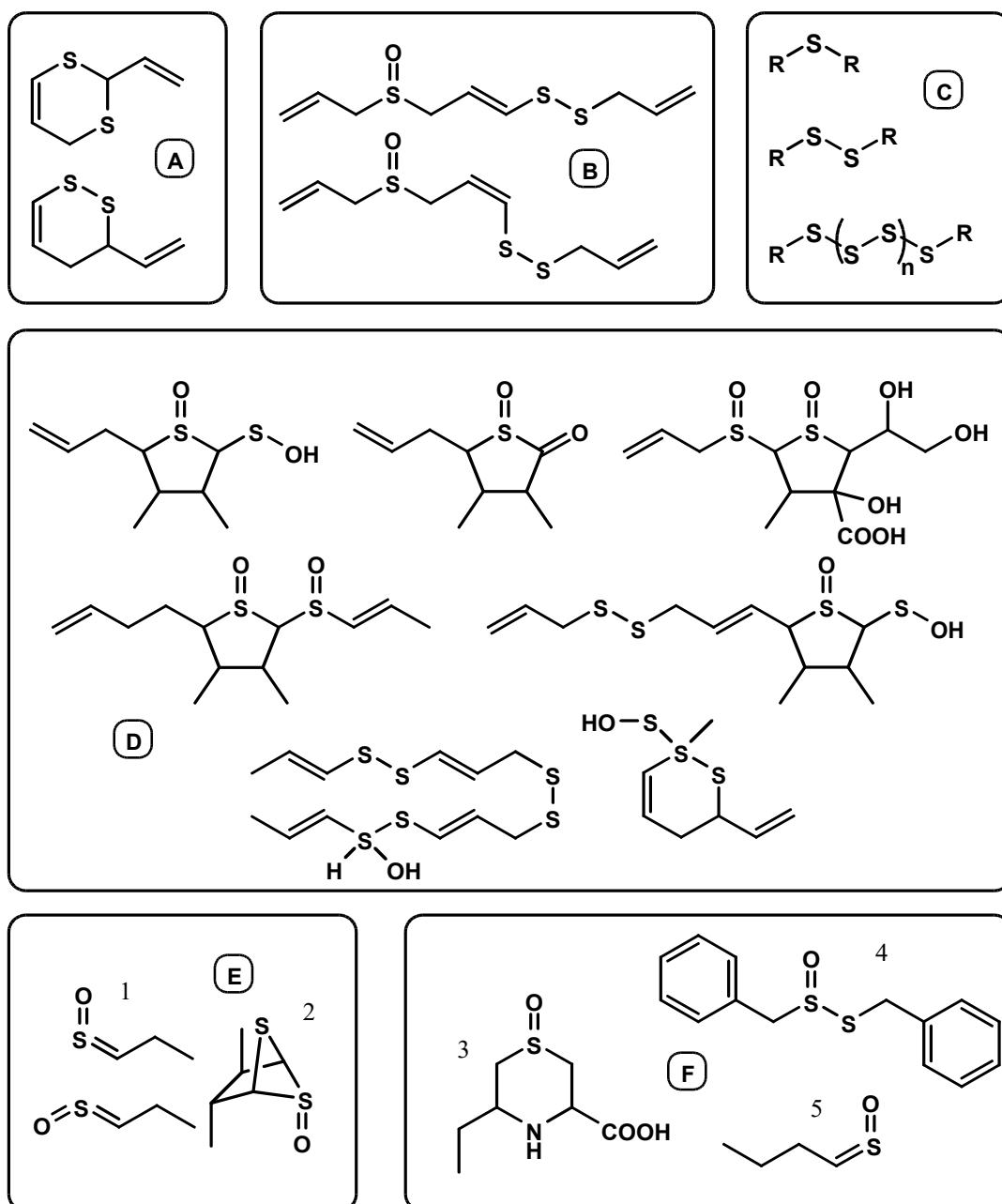
sirných sloučenin. Kombinací postranních skupin může vzniknout početná skupina unikátních sloučenin, avšak v biologických materiálech převažují pouze některé, například některé symetrické (allicin, dimethyl-) nebo asymetrické vznikající kombinací neidentických sulfenových kyselin (allyl- + methyl-, 1-propenyl- + methyl-). Profil thiosulfinátů je druhově specifický, jelikož je přímo provázaný s profilem ACSO (Rose *et al.*, 2005).

Thiosulfináty jsou stále nestabilní a podléhají dalším reakcím. Rychlost rozpadu těchto látek závisí na okolní teplotě a povaze rozpouštědla. Přeměnou či rozpadem thiosulfinátů vzniká široké spektrum nových látek, jež lze rozčlenit do třech skupin, a to acyklické sulfidy, cyklické sulfoxidy a dithiiny (viz obr. 3). Mezi acyklické sulfidy patří ajoeny a (poly)sulfidy. Skupina cyklických sulfoxidů byla objevena teprve nedávno. Tvoří ji velká skupina garlicinů, která má i zástupce acyklické i mezi dithiiny. Dithiiny jsou též heterocyklické látky vznikající z thioakroleinu. Jedna z možných reakcí allicinu je jeho rozpad za vzniku jedné molekuly původní sulfenové kyseliny a jedné molekuly thioakroleinu. Výchozími látkami pro tyto skupiny produktů jsou především alliin (česnek kuchyňský) nebo isoalliin (cibule kuchyňská). Nenasycené vazby ve struktuře vznikajících sulfenových kyselin a thiosulfinátů umožňují rozmanité strukturní změny. Podstatnou skutečností je to, že tyto látky si i nadále zachovávají biologickou aktivitu a klinickými studiemi byly prokázány zdraví prospěšné účinky (Nohara *et al.*, 2013; Nohara *et al.*, 2014; Nohara *et al.*, 2015). Zajímavou skupinou látek jsou zwibelany (viz obr. 3) typické pro cibuli kuchyňskou. Symetrický thiosulfinát vzniklý kondenzací dvou molekul kyseliny 1-propenylsulfenové podléhá rychlému vnitřnímu přesmyku a vzniká tak bicyklická molekula (Block, 1992).

Isoalliin je v cibuli (*A. cepa* L.) zpracováván celkem dvěma enzymy, nejprve alliinasou a v návaznosti 1-sulfinylpropanisomerasou² (EC 5.3.99.M1). Dochází ke katalýze přeměny 1-propenylsulfenové kyseliny za vzniku 1-sulfinylpropanu³ (1SP), též látky způsobující iritaci sliznic a stimulující slzení, které je s cibulí notoricky spjaté (Imai *et al.*, 2002). Tohoto poznatku využili Eady *et al.* (2008) a ve své práci modifikovali cibuli. Umlčením *lfs* genu, byla výrazně snížena aktivita 1SPisomerasy.

2 V anglické literatuře je uváděn název „lachrymatory factor synthase“ či „LFSynthase“. I přes zažitý název syntasy se jedná o isomerasu (intramolekulární oxidoreduktasu).

3 Obdobně jako enzym je tato látka známa v anglické literatuře jako „lachrymatory factor“.



Obr. 3 Vybrané těkavé sloučeniny síry. (A) je skupina dithiinů a (B) skupina ajoenů, obě skupiny vznikají z alllicinu. (C) zahrnuje skupinu (poly)sulfidů. (Adaptováno dle Rose *et al.*, 2005). (D) reprezentuje výběr z garlicinů, které zastupují jak acyklické sulfidy, dithiiny tak i cyklické sulfoxidy (Nohara *et al.*, 2012; Nohara *et al.*, 2013; Nohara *et al.*, 2015). (E) zahrnuje látky vznikající z isoalliinu, 1 = (*E*)-1SP a (*Z*)-1SP, 2 = bicyklický zwibelan. (F) je výběr látek potvrzených v Kubec *et al.*, (2010), 3 = cyklohomisoalliin, 4 = petivericin (dibenzylthiosulfínát), 5 = 1-sulfinylbutan.

Tím byla vyšlechtěna cibule, která po poškození pletiv neprodukuje velká množství iritujícího 1SP a zároveň tím dochází k výraznější produkci thiosulfínátů.

Kubec *et al.* (2010) potvrdili řadu nových látek opět v česneku sicilském a v *Allium tripedale* Trautv. a významně tak rozvíjí seznam známých sirných látek v rodu *Allium*. Vedle již známého butiinu je v těchto rostlinách přítomen i homoisoalliin (S-trans-1-butenyl-L-cysteinsulfoxid). Homoisoalliin podléhá stejné cyklizaci jako isoalliin a vzniká tak homocykloalliin. Analogicky je taktéž substrátem alliinasy i 1SPisomerasy. 1-butenylsulfenová kyselina tak může dát vzniku novým zwibelanům nebo 1-sulfinylbutanu či novým asymetrickým thiosulfinátům. V *Petiveria alliaceae* L. byla potvrzena přítomnost prvního aromatického ACSO S-benzylcysteinsulfoxidu (viz obr. 1), ze kterého vzniká činností alliinasy thiosulfinát petivericin (viz obr. 3).

2.1.3 Produkce sirných sloučenin *in vivo*

Vysoká produkce sirných sloučenin je mimořádně náročná na metabolismus síry. Rostliny přijímají síru ve formě síranů z půdy. Experimentálně byla prokázána pozitivní korelace mezi koncentrací síry v půdě a pletivech česneku a cibule. Hnojení s důrazem na vysoký obsah síry vede k intenzivnější produkci ACSO. Docíleno toho bylo jak minerálními, tak i organickými hnojivy (Arnault *et al.*, 2003; Lundegårdh *et al.*, 2008) Zvýšené koncentrace mohou být příznivé z nutričního hlediska, také umožňují delší dobu skladovatelnosti a plodiny s vyšším obsahem sirných látek jsou vhodnější ke zpracování pro farmaceutické účely (Bloem *et al.*, 2004; Bloem *et al.*, 2010).

Pro všechny organické sloučeniny rostliny využívají anorganického sulfátu. Po přijetí kořeny je aktivován ATP-sulfurylasou na 5'-adenylylsulfát (APS). Dochází k úplné redukci na sulfid a je zabudován do molekuly cysteinu cysteinsynthasou (O-acetylserin(thiol)lyasa, EC 2.5.1.47). Cystein je výchozím bodem pro všechny sirné látky biologického původu včetně ACSO a klíčovou aminokyselinou glutathionu, který je prekurzorem všech ACSO (Jones *et al.*, 2007).

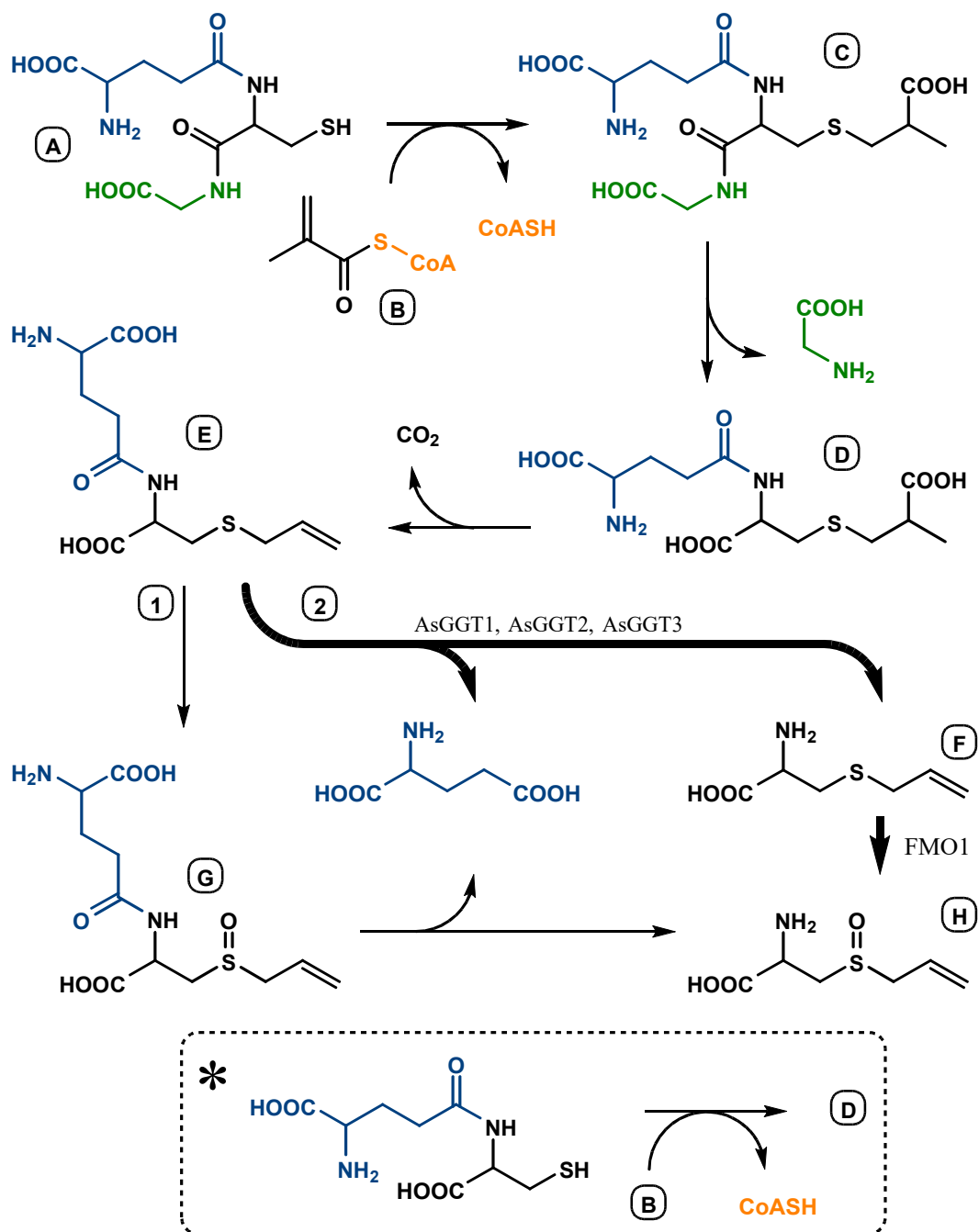
2.1.3.1 Biosyntetická dráha

Zájem o biologicky aktivní sirné látky vedl taktéž ke zkoumání vzniku jejich prekurzorů. Biosyntetická dráha ACSO je navržena podle dřívějších studií opírajících se o analýzy a sledování dávkovaných radioaktivně značených sloučenin, zejména izotopu síry ³⁵S a předpokládaných prekurzorů. Nicméně až v nedávné době bylo popsáno několik enzymů katalyzujících jednotlivé kroky, čímž byly zároveň objasněny některé nejasnosti v navržených drahách (Lancaster a Shaw, 1989; Yoshimoto a Saito, 2017).

Výchozí látkou biosyntetické dráhy je glutathion (viz obr. 4) a celou dráhu lze shrnout do čtyř základních reakcí. První reakcí je alkylace volné thiolové skupiny. Nedávné publikace uvádí, že zdroj methylové skupiny charakteristické pro methiin stále není dodnes znám (Yoshimoto a Saito, 2017). V případě alliinu, isoalliinu a propiinu, jakožto tříuhlíkatých derivátů, je zdrojem řetězce valin, což bylo potvrzeno dávkováním značeného valinu jak v česneku (Suzuki *et al.*, 1962), tak i v cibuli (Turnbull *et al.*, 1980). Přítomnost 2-karboxypropylglutathionu byla potvrzena a pravděpodobně vzniká konjugací glutathionu s kyselinou methylakrylovou. Methylakrylyl-CoA je toxický meziprodukt vznikající při katabolismu valinu, přítomnost i produkce byla prokázána prozatím u živočichů. U rostlin se předpokládá vznik methylakrylyl-CoA v mitochondriích a peroxisomech, nicméně enzymy nebyly charakterizovány pro všechny kroky degradace větvených aminokyselin. Katabolismus větvených alifatických aminokyselin je převážně společný. Pouze degradace valinu produkuje toxický meziprodukt (Hildebrandt *et al.*, 2015). Při poškození enzymatického aparátu, které vedlo k hromadění vysokých koncentrací aktivovaného methylakrylátu, byla zjištěna přítomnost atypických aminokyselin v lidské moči, a to 2-karboxypropylcysteinu a 2-karboxypropylcysteaminu (Truscott *et al.*, 1981). Toxicita tohoto meziproduktu je zapříčiněna vysokou reaktivitou vůči volným thiolovým skupinám (Hildebrandt *et al.*, 2015).

Navazujícím krokem je odštěpení glycinu z alkyl derivátu glutathionu. Avšak enzym pro tuto reakci nebyl identifikován. Předpokládána je podobnost s enzymem, který katalyzuje poslední biosyntetickou reakci tvorby glutathionu, karboxypeptidasou (Jones *et al.*, 2004).

Poslední dvě reakce zahrnují deglutamylaci a oxidaci meziproduktů. Na základě poznatků z dřívější publikace, která zahrnuje cibuli, česnek kuchyňský i sicilský, je biosyntetická dráha navržena tak, že oxidace předchází deglutamylaci (Lancaster a Shaw, 1989). V nedávných studiích (Yoshimoto *et al.*, 2015a; Yoshimoto *et al.*, 2015b) identifikovali a charakterizovali enzymy pro oba biosyntetické kroky prozatím pouze v česneku kuchyňském. Výsledky nově naznačují, že oxidace je finálním krokem biosyntézy. Vzhledem k tomu, že nové experimenty vychází pouze z česneku, se tyto výsledky vzájemně zcela nevylučují.



Obr. 4 Biosyntetická dráha ACSO zobrazená na biosyntéze alliinu (**H**). Výchozím bodem je glutathion (**A**), který reaguje s methakrylyl-CoA (**B**) za vzniku S-(2-karboxypropyl)glutathionu (**C**), z něhož je následně odštěpen glycin za vzniku γ -glutamyl-S-(2-karboxypropyl)cysteinu (**D**). Navazující dekarboxylací vzniká γ -glutamyl-S-allylcystein (**E**) (dekarboxylace neprobíhá během biosyntézy methiinu). Pokračování dráhy ve směru **(1)** předpokládá nejprve oxidaci za vzniku γ -glutamyl-S-allylcysteinsulfoxidu (**G**) a následnou deglutamylaci na (**H**). Dráha **(2)** zahrnuje doposud jediné popsané kroky (tučně), a to deglutamylaci na S-allylcystein (**F**) a oxidaci na finální produkt. *Předpokládaná reakce (**B**) s biosyntetickým předchůdcem glutathionu γ -glutamylcysteinu za vzniku (**D**) (Dráha adaptována dle Lancaster a Shaw, (1989) a upravena dle Yoshimoto a Saito, (2017)).

Yoshimoto *et al.* (2015a) identifikovali pomocí EST databáze česneku tři nové geny (*AsGGT1*, *AsGGT2* a *AsGGT3*) pro γ -glutamyltranspeptidasy (γ -glutamyltransferasy) katalyzující deglutamylaci biosyntetických meziproduktů. Rekombinantní proteiny *AsGGT1*, *AsGGT2* a *AsGGT3* exprimované v *Saccharomyces cerevisiae* vykazovaly výrazně vyšší afinitu vůči substrátu γ -glutamyl-S-allylcysteinu než vůči γ -glutamyl-S-allylcysteinsulfoxidu, což nasvědčuje tomu, že *in vivo* deglutamylace předchází oxidaci, jelikož deglutamylace oxidovaného substrátu téměř neprobíhala. Identifikované enzymy se vzájemně lišily i kinetickými konstantami. Odlišná byla také kompartmentace, *AsGGT1* a *AsGGT3* byly lokalizovány v cytosolu a *AsGGT2* ve vakuole. Rozdílné kinetické parametry a kompartmentace nasvědčují, že každý enzym hraje svoji roli v různých vegetačních obdobích. Vysoká afinita *AsGGT2*, lokalizace ve vakuole a exprese v listech nasvědčuje, že se tento enzym aktivně podílí na produkci ACSO během růstu a vývoje rostliny. *AsGGT1* a *AsGGT3* jsou exprimovány v zásobní cibuli a kořenech.

V navazující práci Yoshimoto *et al.* (2015b) identifikovali a charakterizovali jediný enzym podílející se na oxidační reakci. V EST databázi česneku byl identifikován gen *AsFMO1* kódující monooxygenasu obsahující flavinový kofaktor. Rekombinantní enzym *AsFMO1* exprimovaný v *S. cerevisiae* vykazoval vyšší afinitu vůči S-allylcysteinu oproti γ -glutamyl-S-allylcysteinu. Tento poznatek upevňuje hypotézu, že deglutamylace předchází oxidaci, která je tedy závěrečným krokem biosyntézy. Míra exprese *AsFMO1* napříč rostlinnými orgány je podobná.

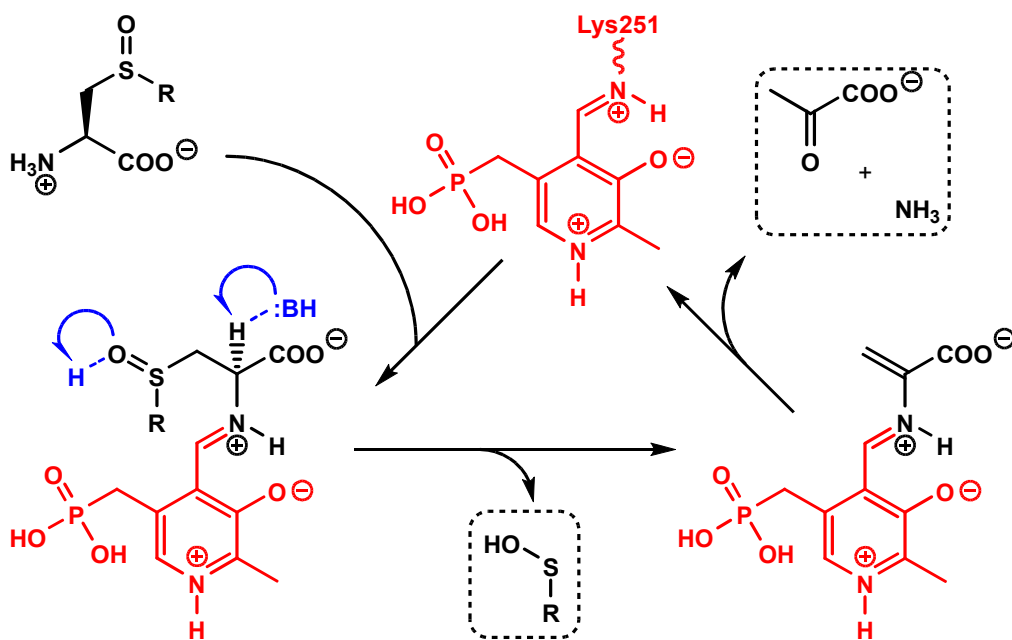
2.1.3.2 Profily sirných sloučenin během skladování

K produkci a změně profilů ACSO dochází i dlouho po sklizni plodin. Jak již bylo zmíněno výše, tak během skladování dochází k nárůstu obsahu cykloalliinu. Nejedná se o jedinou změnu, ke které dochází. γ GC jsou společně s ACSO během vývoje rostliny transportovány do zásobních pletiv. Transpeptidasová aktivita v zásobní cibuli během dormance je minimální a nedochází k výraznému poklesu hladin γ GC. Až v intervalech několika měsíců lze sledovat úbytek zásobních γ GC a nárůst koncentrace ACSO. Před únikem z dormance lze pozorovat nárůst transpeptidasové aktivity. Při vysokých skladovacích teplotách k této přeměně dochází vyšší rychlostí, stejně tak dochází i k dřívějšímu úniku z dormance (Kamata *et al.*, 2016).

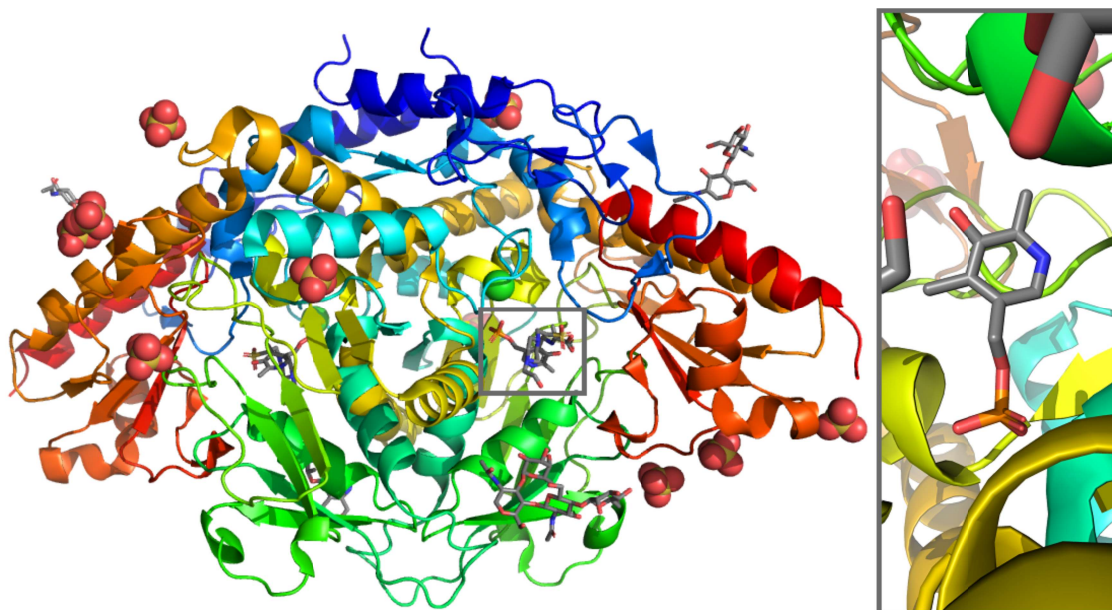
2.1.4 Alliinasa

Jak již bylo zmíněno výše, ACSO jsou substráty alliinasy. Jedná se o homodimerní, pyridoxal-5-fosfát (PLP) dependentní enzym (viz obr. 6), který katalyzuje α,β -eliminaci. Produkty reakce jsou aminoakrylát (konjugovaná báze kys. aminoakrylové) a alk(en)ylderivát sulfenové kyseliny (dle mateřského ACSO). Aminoakrylát se však po reakci okamžitě rozpadá za vzniku pyruvátu (konj. báze kys. pyrohroznové) a amoniaku. Uvolnění aminoakrylátu vede opět ke vzniku Schiffovy báze mezi PLP a aminoskupinou postranního řetězce lysinu 251, výchozímu stavu enzymu (viz obr. 5). Alliinasa byla charakterizována v několika druzích, cibuli kuchyňské, póru zahradním, česneku medvědí a pažitce čínské (Manabe *et al.*, 1998; Lancaster *et al.*, 2000). V česneku kuchyňském byla dokonce zjištěna její struktura RTG krystalografií. Podobnost sekvencí se pohybuje mezi 51-70 %. Monomer alliinasy česneku sestává ze 448 aminokyselin a celková molekulová hmotnost monomeru činí 51,5 kDa. Glykosylace je specifická vysokým obsahem mannosy, přičemž sacharidová složka tvoří odhadem 5,5-6 % hmotnosti proteinu (Shimon *et al.*, 2007). Ve stroužcích česneku byly nalezeny dva lektiny vázající mannany (ASAI a ASAII, ASA z angl. „*allium sativum* agglutinin“), z nichž ASAI tvoří komplex s alliinasou (Dam *et al.*, 1998).

Alliinasa je bohatě zastoupena a zvláště v česneku kuchyňském, u kterého tvoří 10 % hmotnosti všech rozpustných proteinů ve stroužcích. V česneku je lokalizována



Obr. 5: Schéma reakce katalyzované alliinasou. Červeně je vyznačena součást enzymu, černě substrát a vycházející produkty, modře princip katalýzy (Adaptováno dle Shimon *et al.*, 2007).



Obr. 6: Alliinasa s detailním pohledem na kofaktor (struktura dle Kuettner *et al.*, 2002). Snímek pořízen za pomoci softwaru PyMOL.

v blízkosti cévních svazků, což pravděpodobně odráží její funkci při ochraně zásobních cibulí před predací a hnitím (Ellmore a Feldberg, 1994). Na druhou stranu se jedná o citlivý termolabilní enzym, který snadno denaturuje v přítomnosti surfaktantů, a jeho skladovatelnost je omezená. Může být dodatečně stabilizován kompatibilními osmolyty jako například glycerol, sorbitol, sacharosa nebo trimethylaminoxid. Princip mechanismu, jak je enzym stabilizován, znám stále není. Předpokladem je omezení interakcí s molekulami vody, čímž je následně preferován složený stav nativního enzymu než rozvolněná struktura enzymu denaturovaného (Street *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2018).

Produkty reakce alliinasy i 1-sulfinylpropanisomerasy jsou dráždivé nejen pro predátory, ale i pro rostlinu samotnou. Inhibice alliinasy je nutná pro zamezení tvorby dodatečných thiosulfinátů či sulfinylderivátů, jako prevence vedlejších škod a efekt tak zůstal zacílen pouze v zasaženém místě. Nové experimenty na rostlině *P. alliaceae* prokázaly, že alliinasa je inhibována synergickým působením vlastních produktů, pyruvátu a thiosulfinátů, v případě *P. alliaceae* petivericinem. Alliinasa je inaktivována krátce po dekompartmentaci ještě před vyčerpáním dostupných ACSO (He *et al.*, 2018). Na druhou stranu Weiner *et al.* (2009) nepozorovali úplnou ztrátu aktivity alliinasy

z česneku po modifikaci navázáním biotinu na volné thioly cysteinů, které podléhají reakci s thiosulfináty.

2.1.5 Sirné látky vznikající zpracováním česneku

Ne všechny látky, jejichž prospěšné účinky jsou zkoumány, vznikají *in vivo*. A taktéž ne všechny, které vznikají během zpracování jsou žádoucí. Za žádoucí jsou považovány S-allyl-L-cystein (SAC) a S-allylmerkaptó-L-cystein (SAMC) (viz obr. 7). SAC je biosyntetickým meziproduktem alliinu, avšak nejsou hromaděny. Koncentrace nepřekračují hranici $30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty (Kodera *et al.*, 2002). Bohatším zdrojem SAC je právě česnek, který prochází úpravou a jednou z těchto forem je černý česnek. V posledních letech se černý česnek stává populárnější, především v oblasti Koreje (Choi *et al.*, 2014). Získáván je dlouhodobým vystavením česneku vysoké teplotě a vlhkosti. Maillardovou reakcí, karamelizací a oxidací fenolických látek je získávána černá barva, zároveň dochází k prudkému poklesu pH, přibližně pětinasobnému nárůstu koncentrace SAC a zvýšení antioxidační kapacity (Bae *et al.*, 2014).

Druhou formou bohatou na SAC a SAMC je vyzrálý česnek. Ten na rozdíl od čerstvého česneku není aromatický. Jeho příprava trvá až 20 měsíců. Česnek je homogenizován a naložen v nerezových tancích do 10-15% ethanolu, zrání probíhá při nízké teplotě. Následně je směs zfiltrována a zakonzentrována, taktéž za nízkých teplot. Během dlouhé doby zrání dochází k přeměně zásobních látek. Proteiny jsou degradovány za uvolnění volných aminokyselin, ACSO jsou převedeny na thiosulfináty, z nichž část reaguje s cysteinem či cystinem za vzniku SAMC a část je odpařena, stejně jako jejich produkty rozpadu, proto vyzrálý česnek nenesé žádné aroma. γ GC jsou transpeptidasami/hydrolasami převedeny na S-alk(en)yl-L-cysteiny, kam lze zařadit již zmíněný SAC, který se po zrání stává jednou z nejvíce zastoupených sirných látek (Colín-González *et al.*, 2012).

Mezi další nově vznikající látky patří i nežádoucí barviva. Pro jejich vznik je důležité alespoň minimální zastoupení isoalliinu. Podstatná je 1-propenylová skupina ve vznikajících asymetrických thiosulfinátech, které následně reagují s aminokyselinami. Vzniká tak složitá směs barviv, která mohou být v některých biologických materiálech maskována přítomným chlorofylem či anthokyany. V česneku jsou pozorována zelená a modrá barviva, v cibuli a póru pak pigmenty růžové barvy (Kubec *et al.*, 2004).

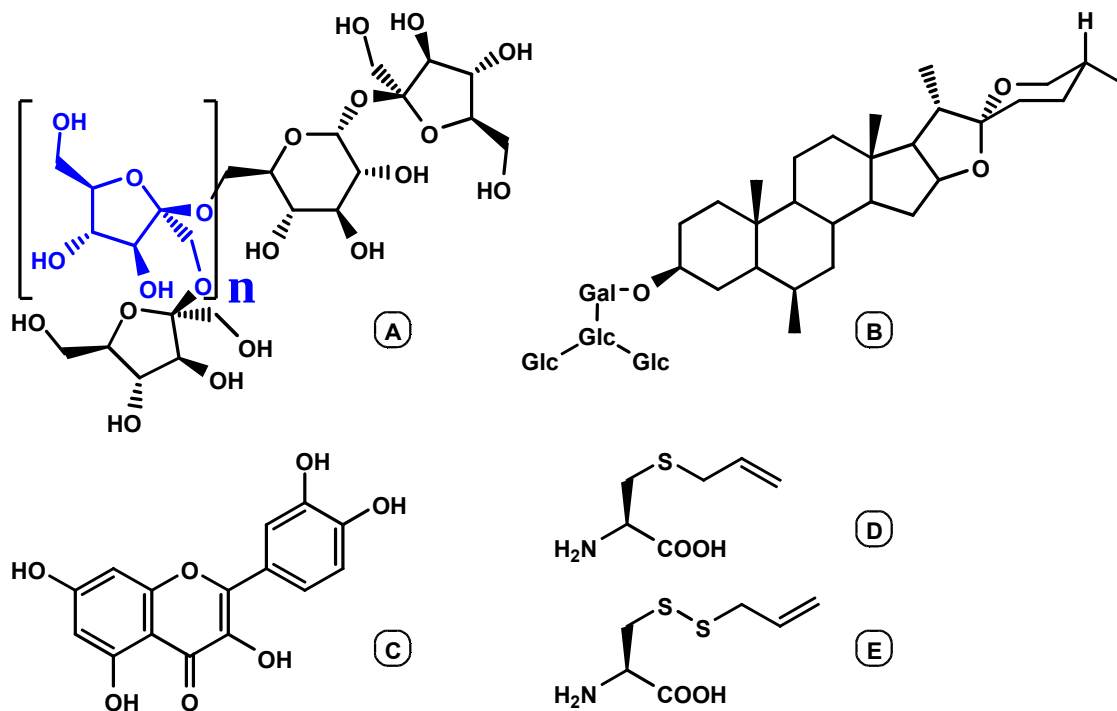
2.1.6 Další aktivní látky česneku

Většina publikací, která se věnuje chemii česneku je zaměřena především na sirné látky. Avšak v plodinách rodu *Allium* je přítomno mnoho dalších skupin atraktivních látek (viz obr. 7). Mimo široce známé vitaminy a jejich účinky, volné aminokyseliny či minerální látky se jedná například o skupinu steroidních saponinů. Na rozdíl od sirných látek jsou rozpustné ve vodě a odolávají tepelnému zpracování. V česneku jsou přítomny skupiny erubosidů (viz obr. 6) a sativosidů (Lanzotti *et al.*, 2014). Matsuura (2001) pozoroval na zvířecích modelech sníženou absorpci cholesterolu ve střevním lumenu účinkem saponinů obsažených v extraktu z vyzrálého česneku⁴. Vedle těchto účinků byly pozorovány i účinky cytotoxické a antifungální (Lanzotti *et al.*, 2014).

Vzrůstajícímu zájmu se těší i fruktany, zásobní polysacharidy rostlin. Od škrobu se odlišují tím, že vznikají polymerací fruktofuranosy nikoli glukopyranosy a jsou rozpustné ve vodě. Pro rod *Allium* jsou typické a bohatě zastoupeny (česnek 9-16 %, cibule 1,1-7,5 % celkové hmoty). Podle typu vazeb a polymeračního stupně jsou dále fruktany děleny na více typů, a to inuliny, levany či fruktany keostosového typu. V česneku jsou produkovány fruktany neokestosové. Fruktany mají prebiotické a antioxidační účinky. Vzhledem k tomu, že lidský organismus je není schopen fruktany strávit, se dostávají ke střevní mikroflóře v téměř nezměněném stavu, dochází pouze k minoritní hydrolyze v prostředí žaludku. Mikroflóra je schopna zužítkovat fruktany, a tím je stimulován růst prospěšných bakterií – bifidobakterií a laktobacilů. Mimo stimulační funkci mají i funkci ochrany, jelikož jsou schopny zhášet reaktivní formy kyslíku (ROS) (Baumgartner *et al.*, 2000; Peshev a Van den Ende, 2014).

Dalšími netěkavými látkami v přírodních materiálech jsou fenolické látky. Jejich obsahy v potravinách jsou považovány za důležité parametry, jelikož se významně podílí na antioxidační kapacitě a pro řadu látek byly pozorovány i specifické účinky. Jedněmi z těchto látek jsou rozmanité flavonoidy, které jsou v *Allium* plodinách významně zastoupeny v porovnání s běžně konzumovanými zeleninami. Pomyslný rekord prozatím přísluší cibuli jarní (*Allium fistulosum* L.) (2,7 g·kg⁻¹ celkových flavonoidů na čerstvou hmotu). V česneku je bohatě zastoupen myricetin a apigenin, v cibuli kvercetin (viz obr. 7), luteolin a kaempferol. Účinky flavonoidů jsou intenzivně

4 V anglické literatuře uváděno jako „aged garlic extract“, zkráceně „AGE“.



Obr. 7: Vybrané látky obsažené v česneku. První trojice je ze skupiny látek neobsahující síru. A = obecný vzorek fruktanů nekestosového typu (dle Nelson a Spollen, 1987), B = steroidní saponin erubosid b (dle Lanzotti *et al.*, 2014), C = kvercetin (dle Lanzotti, 2006). Následují sírné látky vznikající zpracováním česneku. D = S-allyl-L-cystein a E = S-allylmerkapto-L-cystein (dle Kodera *et al.*, 2002).

sledovány. Například kvercetin je studován v souvislostech snížení rizika srdečních onemocnění či rakoviny (Miean a Mohamed, 2001; Lanzotti, 2006).

2.2 Farmakologické využití česneku

2.2.1 Farmakologické preparáty

Dlouholeté povědomí o prospěšnosti konzumace plodin rodu *Allium* v široké veřejnosti a hledání látek zodpovědných za biologické účinky vedlo v nedávných letech k velké oblibě těchto plodin a rozšíření především česnekových preparátů. Česnekové doplňky stravy se velmi odlišují v přípravě, obsažených látkách i biologické dostupnosti (Amagase *et al.*, 2001; Lawson a Hunsaker, 2018).

Zakoncentrování účinných látek je provedeno extrakcí. V závislosti na způsobu extrakce se liší získané skupiny látek. Česneková silice je připravena hydrodestilací a v takto připraveném oleji jsou přítomny především (poly)sulfidy, allicin přítomen není. Komerčně je dodáván v tobolkách zředěný rostlinným olejem pro potlačení intenzivního aroma. Olejové maceráty jsou získány rozdrčením česneku v prostředí

oleje, který extrahuje pouze nepolární látky. Jedná se o produkty rozpadu allicinu – ajoeny, dithiiny a (poly)sulfidy a ostatní nepolární složky česneku a částečně i reliktní ACSO. Dehydratovaná forma česneku či sušený česnek je dobře znám. Předpokladem je zachování si všech původních složek jako u čerstvého česneku, nicméně průmyslové procesy vedou k významným ztrátám ACSO. Ve všech těchto přípravcích není allicin přítomen. Dalšími přípravky jsou extrakty. O extraktu z vyzrálého česneku bylo již pojednáno výše v kap. 2.1.5 (Amagase *et al.*, 2001).

Lawson a Hunsaker (2018) se věnovali studiu biologické dostupnosti sirných látek včetně allicinu z biologických materiálů a doplňků stravy. Zjištěním bylo, že doplňky obsahující alliin a aktivní alliinasu jsou schopny zajistit totožnou biologickou dostupnost složek jako čerstvý česnek. Řada výrobců produkuje potahované tablety, které mají zajistit ochranu alliinasy před kyselým prostředím žaludku, v němž ireverzibilně denaturuje. Překvapivým zjištěním bylo, že biologická dostupnost allicinu z nepotahovaných tablet je podobná jako při užívání potahovaných. Významným faktorem na druhou stranu je žaludeční obsah. Potraviny obsahující vysoké množství bílkovin opožďují žaludeční vyprazdňování a doplňky stravy jsou tak vystaveny tomuto prostředí po výrazně delší dobu (6 a více h). Dalším překvapivým zjištěním je, že i tepelně upravený česnek je stále významným zdrojem allicinu a nedochází k předpokládaným, téměř totálním, ztrátám.

2.2.2 Biologické účinky S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů

Bohaté zastoupení ACSO neodmyslitelně vedlo ke studiu jejich biologických účinků. V literatuře jsou především označovány pouze jako prekurzory chuťových a aktivních látek. Na rozdíl od thiosulfinátů jsou stabilní a dobře rozpustné ve vodě. U diabetických myši vedla administrace alliinu k hypoglykemickému a hypolipidemickému účinku, zvýšení citlivosti na insulin a změny složení mikroflóry (Zhai *et al.*, 2018).

2.2.3 Biologické účinky thiosulfinátů - allicinu

Účinky thiosulfinátů lze zobecnit na účincích allicinu, který je nejintenzivněji studován. Spektrum účinků je velmi široké. Jedná se například o účinky antibakteriální, antifungální, antiparazitické, antikancerogenní, protizánětlivé, antioxidační či antihyperlipidemické (Rose *et al.*, 2005; Aviello *et al.*, 2009).

Již v roce 1944 Cavallito a Bailey věděli o antibakteriálním působení extraktu z česneku. Biologicky aktivní složku izolovali a nazvali allicin. Účinnost byla srovnána

s penicilinem a jedním z důležitých zjištění bylo, že se allicin projevuje stejným inhibičním účinkem jak Gram pozitivních (G^+) tak i Gram negativních (G^-) bakterií. Cutler a Wilson (2004) se pokusili vyřešit problém se stabilitou allicinu, jehož nestabilita jej výrazně omezuje při praktických aplikacích. I přes jeho lipofilní povahu byl vytvořen jeho vodný roztok, který si zachoval antimikrobiální účinky, které byly ověřeny na methicillin-rezistentním *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Reiter *et al.* (2017) doplňují informace o antibakteriálních účincích allicinu. Mimo běžné přímé aplikace vystavili bakteriální patogeny výparům allicinu. Tělavost thiosulfínátů tak umožňuje výhodnou a jednoduchou aplikaci při terapii. Zvolenými patogeny byly právě ty, jež způsobují závažná onemocnění dýchacích cest. Jedná se o kmeny *Pseudomonas aeruginosa* s mnohočetnou lékovou rezistencí (dále jen MDR), *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (MDR), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae* a *Staph. aureus*. Ve srovnání s antibiotiky účinkuje allicin pouze ve vyšších koncentracích, účinné koncentrace antibiotik jsou až o tři řády nižší. Výhodou je aplikovatelnost i vůči rezistentním kmenům, vzhledem k nespecifickému účinku allicinu na živé buňky. Na druhou stranu se jedná o komplikaci od praktického zavedení, jelikož toxicita vysokých koncentrací snižuje terapeutický index. Možná kombinace antibiotik a thiosulfínátů prozatím prověřena nebyla.

Aplikace plynné formy obchází jeden z největších problémů allicinu, a tím je jeho biologická dostupnost. Při orálním podání biologického materiálu v žaludku dochází k inaktivaci alliinasy, tím je zastavena další produkce thiosulfínátů a taktéž dochází k hydrolýze allicinu a metabolismu na allylmethylsulfid, allylmethylsulfoxid a allylmethylsulfon, které jsou z těla vyloučeny močí a částečně dechem. Při intravenózní aplikaci opět dochází k rychlé hydrolýze (Scheffler *et al.*, 2016; Gruhlke *et al.*, 2019).

Pokud je problém biologické dostupnosti překonán a allicin se setkává s buňkami, tak snadno a šetrně prochází cytoplazmatickou membránou. Nedochozí k narušení její funkce ani vzniku pórů či shlukování vezikul. V intracelulárním prostoru však velmi rychle reaguje. Jedna molekula thiosulfínátu je schopna thioalk(en)ylovat dvě molekuly obsahující volný thiol (Miron *et al.*, 2000).

V závislosti na dávce allicin působí toxicky. Během oxidativního stresu slouží glutathion jako první linie obrany. Jeho oxidací vzniká dimerní forma (GSSG), která může být revertována glutathionreduktasou (EC 1.8.1.7) za spotřeby NADPH. Thioly proteinů při oxidativním stresu jsou chráněny glutathionylací, zpětné odstranění glutathionu zajišťují glutaredoxiny (Poole, 2015). V přítomnosti allicinu dochází k obsazení dostupných thiolů, dostupný GSH je vyčerpáván, jelikož během reakce s allicinem vzniká S-allylmerkaptoglutathion a volné thioly proteinů jsou S-thioallylovány. Nižší dávky allicinu jsou buňky schopny tolerovat, což je náznakem přítomnosti mechanismu, který se snaží s tímto stresem vyrovnat. Experimentálně bylo prokázána schopnost glutathionreduktasy ze *S. cerevisiae* redukovat GSSA na GSH. Zda je GSSA substrátem i lidské glutathionreduktasy prozatím ověřeno nebylo (Horn *et al.*, 2018).

Mimo narušení redoxního potenciálu buňky dochází k ovlivnění funkce proteinů. Gruhlke *et al.* (2019) vystavili imortalizované T lymfocyty dávkám allicinu. Postiženy byly především proteiny cytoskeletu, buněčného cyklu, chaperony i enzymy metabolismu, především glykolýzy, obecně vysoce zastoupené proteiny a enzymy. Interference s aktinovým cytoskeletem a mikrotubuly se projevila změnou morfologie buněk. Pozoruhodná je inhibice kaskády glykolýzy, osm z celkových deseti enzymů a laktátdehydrogenasa (EC 1.1.1.27, LDH) jsou inhibovány S-thioallylací. V současné době je jedním z molekulárních cílů léčby rakoviny enzym enolasa (EC 4.2.1.11), katalyzující dehydrataci 2-bisfosfoglycerátu. S-thioallylací cysteinu v aktivním místě enolasy dochází k její deaktivaci. Pro rakovinné buňky je specifický Warburgův efekt, který se projevuje tím, že buňky preferují zisk energie prostřednictvím glykolýzy a nikoli respiračním řetězcem. Inhibice enolasy se proto jeví v léčbě rakovinných onemocnění velmi prominentně. S-thioallylace pravděpodobně ovlivňuje už i samotnou proteosyntézu či posléze indukuje nesprávné skládání proteinů (Borlinghaus *et al.*, 2014). Allicin a antikancerogenní účinky jsou společně skloňovány velmi frekventovaně. Při dostatečných koncentracích je schopen zabrzdit rychlou proliferaci rakovinných buněk či u nich indukovat apoptózu (Shao *et al.*, 2012).

Přestože allicin působí jako prooxidant, tak v nižších fyziologických koncentracích vykazuje antioxidační účinky, jelikož indukuje produkci enzymů druhé fáze detoxikace aniž by zároveň došlo k výraznému poškození buněk. Allicin indukuje systém

Nrf2/Keap1, který je transkripčním faktorem pro skupiny enzymů zajišťujících ochranu proti působení oxidativního stresu a produkci glutathionu. Tím je chráněn lipoprotein nízké hustoty (LDL), jehož výrazná oxidace je spojena se vznikem atherosklerózy, která je jednou z hlavních příčin kardiovaskulárních onemocnění. Dalším principem prevence kardiovaskulárních onemocnění, kterým allicin přispívá, je silná inhibice hemokoagulace. Allicin vykazuje výrazně silnější účinky než kys. acetylsalicylová. Tento efekt společně s produkcí H₂S, který navozuje relaxaci hladkého svalstva a vzniká degradací allicinu či jeho produktů, vede k prevenci ischemických onemocnění (Borlinghaus *et al.*, 2014, Shouk *et al.*, 2014).

2.2.4 Biologické účinky produktů rozpadu allicinu

Do této problematiky lze především zařadit účinky diallyl(poly)sulfidů a ajoenu. Diallyl(poly)sulfidy jsou vysoce podobné allicinu, avšak co se týče antimikrobiálních účinků, tak jsou vyžadovány výrazně vyšší koncentrace pro dosažení stejného účinku jako allicinu (Borlinghaus *et al.*, 2014). Podobnost mechanismů účinků sulfidů s allicinem vyúsťují v podobné odezvy v živých systémech, kdy byla taktéž pozorována indukce produkce enzymů druhé fáze detoxikace a inhibice proliferace rakovinných buněk (Ariga a Seki, 2006).

Ajoeny jsou převážně spojovány s antikoagulačními účinky a jejich potenciál je srovnatelný s kys. acetylsalicylovou (Khanum *et al.*, 2004). Spojení účinků ajoenu s některými chemoterapeutiky vedly k synergickým účinkům v indukci apoptózy. Efekty, které přináší dithiiny, nejsou tak bohatě popsány. Jejich farmakokinetika je zjednodušená, jako polární látky jsou snadno absorbovány a distribuovány, nicméně nedochází k žádnému metabolismu (Gao *et al.*, 2013).

2.2.5 Biologické účinky S-allylcysteinu

Rozsah studií těkavých siřných látek zanechal studium účinků SAC upozaděno. Dnes je SAC věnováno více pozornosti. Jedná se o stabilní látku, jejíž farmakokinetika má jednoduchý průběh, rychle je vstřebána a taktéž rychle distribuována, na druhou stranu eliminace probíhá velmi pomalu (10-30 h). Dlouhá exkrece je způsobena protichůdným metabolismem, v játrech dochází k N-acetylaci a v ledvinách zpětně k deacylaci. Toxicita této látky je srovnatelná s toxicitou esenciálních aminokyselin. Letální dávka SAC v porovnání s allicinem či diallylsulfidem je výrazně vyšší. Při dlouhodobém vystavení toxických koncentrací dochází k úbytku tělesné hmotnosti,

narušení funkce jater a ledvin a pravděpodobně k atrofii pankreatu, čímž dochází ke snížení sekrece inzulinu (Kodera *et al.*, 2002, Colín-González *et al.*, 2012).

Mezi prospěšné účinky, které byly pozorovány, lze zařadit antioxidační účinky a neuroprotektivní účinky (Colín-González *et al.*, 2012). Saravan *et al.* (2010) kupříkladu pozorovali u myší s vyvolaným diabetem snížené koncentrace glukosy a glykoproteinů v krvi játrech a ledvinách. Běžně užívané antidiabetikum je gliclazid, SAC disponoval srovnatelnými účinky ve 30 krát vyšších koncentracích (150 mg/kg).

2.3 Kvantifikace sirných látek

Rozmanitost sirných látek se patřičně odráží na rozmanitosti způsobů jejich stanovení. Sirné sloučeniny i ve své nejstabilnější formě (ACSO) jsou termolabilní, což limituje použití některých metod. Thiosulfináty svoji labilitou a těkavostí vyžadují speciální opatření, avšak i za laboratorní teploty dochází k výrazným ztrátám. Prchavost plyných sirných látek a četné nescifické reakce výrazně omezují jejich stanovení či už samotné zkoumání, které může zahrnovat identifikaci nových látek, podstaty reakčních mechanismů či pochopení biologických účinků. Poodhalování chemie česneku začalo velmi brzo, ale až s nástupem moderních technologií se podařilo objasnit některá základní fakta jako je například detekce volných sulfenových kyselin (Ramirez *et al.*, 2017, He *et al.*, 2018, Gruhlke *et al.*, 2019).

2.3.1 Časté přístupy pro stanovení S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů

Dominantním přístupem pro stanovení obsahu ACSO zůstává vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), avšak lze se setkat s přístupy využívající plynovou chromatografii (GC) či kapilární elektroforézu. Použití GC je však diskutabilní s ohledem na labilitu analytu, proto každé nasazení GC bylo doprovázeno nutnou derivatizací vzorku. Vysoké teploty ohrožují sulfoxidovou a karboxylovou skupinu molekuly a vyžadují redukci (Kubec *et al.*, 2000, Ramirez *et al.*, 2017).

Od zvoleného způsobu detekce při použití HPLC se odvíjí nutná opatření. Pro UV detekci je téměř vždy volena derivatizace vzorků, jelikož ACSO neobsahují chromofor. Běžně jsou užívána derivatizační činidla aminokyselin. Nejčastěji se jedná o kombinaci o-ftaldialdehydu (OPA) s tert-butylthiolem. OPA je cenově dostupný, ale deriváty jsou nestabilní a méně vhodné pro dlouhé série analýz. Dalšími využívanými jsou fluorenylmethylchlorformiát (FMOC) a dansylchlorid (Dns-Cl) (Ramirez *et al.*, 2017).

Dns-Cl disponuje nejvyšší stabilitou derivátů a Fmoc deriváty jsou dostatečně stabilní i pro případné dlouhé sekvence analýz (Kubec a Dadáková, 2009).

Ne všechny aplikace pro HPLC vyžadují derivatizaci, byly vyvinuty i metody, které umožňují stanovit ACSO bez derivatizace výměnou za sníženou citlivost (Arnault *et al.*, 2003). Hmotnostní spektrometrie se nepotýká s těmito problémy, a proto nasazení LC-MS metod v nedávných publikacích poskytlo lepší výkon a propustnost oproti předchozím metodám (Lundegårdh *et al.*, 2008, Kamata *et al.*, 2016).

2.3.1.1 Kapilární elektroforéza ve stanovení S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů

V porovnání s chromatografickými metodami je využití kapilární elektroforézy (CE) ke stanovení ACSO vzácné (Ramirez *et al.*, 2017). Elektroforéza využívá faktu, že látky mohou být separovány v elektrickém poli v závislosti na poměru náboje a molekulové hmotnosti. Desková gelová elektroforéza je nejčastěji využívána pro separaci hmotných biomakromolekul v gelu. CE na druhou stranu je využívána pro separaci menších látek, avšak separace biomakromolekul je stále možná. Křemenná kapilára je naplňována základním elektrolytem, nejčastěji vodným roztokem, ale může se jednat i o pevně vázaný či dynamický gel. Vnesení soustavy do úzké kapiláry nese řadu výhod, z nichž lze zmínit nejpodstatnější, jako je výrazné omezení difuze a snadný odvod vznikajícího Joulova tepla. Lepší odvod tepla umožňuje zvýšení vloženého napětí, čímž je zkrácena doba analýzy a zvýšena účinnost separace. Účinnost separace je vyjádřena počtem teoretických pater, pro CE se počet pohybuje okolo $4 \cdot 10^6$ pater/m, pro HPLC $1 \cdot 10^5$ a GC $3 \cdot 10^3$ pater/m. Objemy nanášených vzorků se pohybují řádově v nanolitrech, což je výhodné pro měření vzorků, které nelze získat ve velkých objemech, nevýhodou na druhé straně je nižší citlivost (Frazier *et al.*, 2007).

Kapilární zónová elektroforéza je jedním z módů CE. V jednoduchém uspořádání systému, jež zahrnuje stejný elektrolyt na obou elektrodách, jsou separovány pouze nabitě molekuly. Elektroosmotický tok vzniklý vložením napětí unáší všechny látky směrem ke katodě. Kationty migrují v kapiláře nejrychleji, jelikož se pohybují ke katodě a jsou zároveň unášeny el. tokem, neutrální látky samy nemigrují a jsou unášeny pouze el. tokem, anionty migrují proti směru toku, nicméně jsou většinou el. tokem strženy a putují ke katodě (Frazier *et al.*, 2007).

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je dalším módem CE, který byl vyvinut Terabe *et al.* (1984). Do základního elektrolytu je přidána povrchově aktivní látka ve větší koncentraci než je kritická micelární koncentrace. Při koncentracích vyšších, než je kritická micelární koncentrace, dochází ke vzniku micel v roztoku, které jsou taktéž pohyblivé v elektrickém poli. Micely tvoří pseudofázi, se kterou neutrální látky interagují. Silnější interakce analytu s micelami zapříčiní pomalejší migraci, u slabších interakcí nedochází k tak výraznému zpomalení. MEKC tedy poprvé umožňuje separaci neutrálních látek v CE.

Pro stanovení alliinu a methiinu byla vyvinuta metoda s nepřímou detekcí, která nevyžaduje derivatizační krok. Nese s sebou mnohá omezení, jimiž jsou dlouhá doba analýzy a nedostatečná separace, aplikace na další ACSO taktéž nebyla ověřena (Horie a Yamashita, 2006). Druhou možností je využití MEKC s detektorem s diodovým polem. MEKC je zvolena, protože vzorky jsou derivatizovány fluorenylmethylchlorformiátem (FMOC), čímž je vnesen objemný neutrální a nepolární chromofor. Doba analýzy je výrazně kratší a separováno je více analytů, nicméně absorpční spektrum analytů je po derivatizaci totožné (Kubec a Dadáková, 2008).

2.3.2 Stanovení enzymové aktivity alliinasy

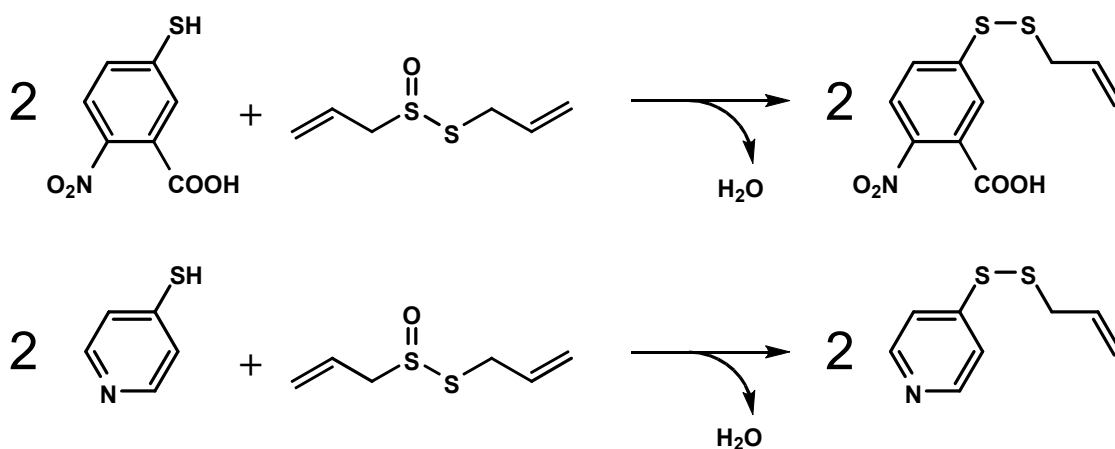
Enzymová aktivita je jeden ze stěžejních parametrů, kterým lze enzym alliinasy popsat. Dále to mohou být informace například o tom, které rostlinné druhy alliinasy produkují, jaká je její struktura a jak se napříč rostlinnými druhy liší. Informace o zastoupení enzymu v daném biologickém materiálu může být zprostředkována jeho množstvím, které může být stanoveno například Bradfordovou metodou (1976), či to může být již zmíněná aktivita enzymu. Aktivita je běžně vyjadřována dvěma jednotkami, a to jednotkou katal (kat) a mezinárodní jednotkou (IU, z angl. „international unit“), která však nevychází ze soustavy SI. Enzymová aktivita 1 kat je definována jako množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 mol substrátu za 1 s, 1 IU odpovídá množství enzymu, jež katalyzuje přeměnu 1 μ mol substrátu za 1 min. Aktivita enzymu může být sledována nárůstem koncentrace produktu či úbytkem substrátu (National Committee of the International Union of Biochemistry, 1978).

Jsou vyvinuty HPLC metody, kterými lze stanovit obsah alliinu i allicinu, substrátu i produktu, jednou analýzou (Arnault *et al.*, 2003). Propustnost a nižší nákladnost

spektrofotometrických metod zajistily, že jsou převážně zvoleny pro stanovení aktivity alliinasy (Schwimmer a Mazelis, 1962; Miron *et al.*, 2002).

Spektrofotometrické metody vycházejí z Lambert-Beerova zákona. Jedním z přístupů stanovení aktivity alliinasy je enzymatická esej, ve které je reakce alliinasy spřažena s reakcí LDH. Jeden z produktů alliinasy je pyruvát, který je substrátem LDH a je redukován na laktát (konj. báze kys. mléčné) za současné přeměny NADH, pozorován je úbytek absorbance při 340 nm (Schwimmer a Mazelis, 1962).

Stanovení aktivity spřažením s LDH nese řadu komplikací. Nejedná se o přímé stanovení, je vyžadován nákup enzymu a dalších chemikálií. Proto byla vyvinuta metoda, která umožňuje stanovit produkci thiosulfínátů přímo. K tomu je nutné činidlo, které je zároveň chromoforem obsahující volný thiol a při reakci dochází ke změně jeho absorpčního spektra. V praxi jsou nejvíce využívána dvě, prvním z nich je 2-nitro-5-thiobenzoová kyselina (NTB), která je však komerčně nedostupná (Miron *et al.* 1998). Druhým využívaným činidlem je 4-merkaptopyridin (4-MP), které je komerčně dostupné (Miron *et al.* 2002) a bylo zvoleno i pro tuto práci (schémata reakcí uvedeny na obr. 8).



Obr. 8: Schéma reakcí thiosulfínátů při stanovení enzymové aktivity alliinasy. První zahrnuje reakci allicinu s 2-nitro-5-thiobenzoovou kyselinou dle Miron *et al.* 1998. Druhá zahrnuje reakci allicinu 4-merkaptopyridinem dle Miron *et al.* 2002.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

(+)-Alliin; (+)-S-Allyl-L-cysteinsulfoxid (Sigma-Aldrich, Německo)

(±)-Alliin; (±)-S-Allyl-L-cysteinsulfoxid (Sigma-Aldrich, Německo)

(+)-Methiin; (+)-S-Methyl-L-cysteinsulfoxid (Abcam, Spojené království)

(±)-Propiin; (±)-S-Propyl-L-cysteinsulfoxid (Abcam, Spojené království)

Proteogenní L-aminokyseliny (glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, threonin, cystein, methionin, kys. glutamová, glutamin, kys. asparagová, asparagin, arginin, lysin, histidin, prolin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan) (Fluka, Německo)

Tetraborian sodný dekahydrát p.a. (Lach:Ner, Česko)

Dodecylsíran sodný (Sigma-Aldrich, Německo)

O-(karboxymethy)hydroxylamin-hemihydrochlorid (Sigma-Aldrich, Německo)

4-merkaptopyridin (Sigma-Aldrich, Německo)

Pyridoxal-5-fosfát n-hydrát (Sigma-Aldrich, Německo)

Dihydrogenfosforečnan sodný p.a. (Lach:Ner, Česko)

Hydroxid sodný p.a. (Penta Chemicals, Česko)

Disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny p.a. (Lach:Ner, Česko)

Fenylmethansulfonylchlorid (Roche, Německo)

Voda vysoké čistoty (deionizovaná, Milli-Q)

Methanol (Honeywell, USA)

Acetonitril (Honeywell, USA)

Kyselina mravenčí (Honeywell, USA)

Ethanol (Penta Chemicals, Česko)

3.1.1.1 Biologický materiál

Biologický materiál byl z části poskytnut z genového fondu VÚRV v.v.i. Ing. Helenou Stavělíkovou, Ph.D. a z části zakoupen v komerčních řetězcích. Z genového fondu byly získány následující odrůdy česneku (*A. sativum* L.): Anin, Dukát, Havran, Lukan a Mojmír.

Následující biologický materiál byl zakoupen v komerčních řetězcích: česnek kuchyňský (*A. sativum* L.): označení etikety - český česnek (Tesco Stores ČR a.s.; AHOLD Czech Republic a.s.); cibule kuchyňská (*A. cepa* L.): označení etikety - cibule

žlutá a cibule červená (Tesco Stores ČR a.s.); cibule zimní (*A. fistulosum* L.): označení etikety - jarní cibule (Tesco Stores ČR a.s.); pažitka pravá (*A. schoenoprasum* L.) (Tesco Stores ČR a.s.); cibule šalotka (*A. cepa* var. *aggregatum* L.) (Tesco Stores ČR a.s.); pór zahradní (*A. ampeloprasum* var. *porrum* L.) (Tesco Stores ČR a.s.).

3.1.2 Instrumentace a pomůcky

Sestava kapilární elektroforézy G1600 AX (Agilent Technologies, USA)

Systém pro přípravu vody vysoké čistoty MilliQ (Millipore, Německo)

Spektrofotometrický reader SynergyHT (BioTek, USA)

Automatické pipety o objemech 1-10 µl; 10-100 µl, 0,1-1 ml, 1-5ml (Eppendorf, Německo; Labnet International, USA)

Laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, aj.; Simax, Česko)

Lyofilizátor (Martin Christ, Německo)

Oscilační kulový mlýn; Mixer Mill MM 400 (Retsch, Německo)

Analytické váhy AEJ (Kern, Německo)

Plastové mikrokumavky (Eppendorf, Německo)

Mikrocentrifuga Labnet PRISM (Labnet International, Edison, USA)

Stolní centrifuga, Centrifuge 5804R (Eppendorf, Německo)

Ultrazvuková lázeň, Bandelin Sonorex Digitec DT 102 HR-C (Bandelin Electronic, Německo)

pH metr, Multifunction meter CX-505 (Elmetron, Polsko)

Třepačka vortex, CLASSIC vortex mixer (VELP Scientifica, Itálie)

Polypropylenové vialky (Macherey-Nagel, Německo)

Skleněné vialky (Macherey-Nagel, Německo)

Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (Dionex UltiMate 3000 + TSQ Quantum Access Max, Thermo Fisher Scientific, USA; Acquity UPLC Plus + Synapt G2-Si, Waters, USA)

Dialyzační membrána Cut-off molekulové hmotnosti 14 kDa (Carl Roth, Německo)

Chromatografická kolona Acquity BEH C18 (Waters, USA)

3.1.3 Software

Pro vypracování této diplomové práce byl použit freeware balíček LibreOffice v.6.2 a Microsoft Excel 365. Pro případnou úpravu obrázků freeware GIMP v.2.8. Nástroje pro kresbu chemických vzorků ChemBioDraw a ChemSketch. Pro vygenerování

isotopového zastoupení v hmotnostních spektrech byl využit online nástroj (dostupné z: <https://www.envipat.eawag.ch>; 15.4.2019). Obrázek obsahující strukturu alliinasy (obr. 6) byl vytvořen pomocí programu PyMOL.

3.2 Metody

3.2.1 Extrakce a derivatizace pro stanovení S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů

Před zahájením extrakce byly veškeré biologické vzorky lyofilizovány. Pokud byly před lyofilizací vzorky děleny, tak bylo nejprve nutné zamrazení při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ den předem, pro co největší omezení ztrát ACSO při poškození pletiv. V případě česneku se jednalo o běžný postup, jelikož celé stroužky vykazují vysokou odolnost proti vysychání a nebyly zcela vymrazeny ani po dvou lyofilizačních cyklech. Samotná lyofilizace probíhala 72 h ve dvou fázích, při první fázi byly vzorky vymrazovány 36 h při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (teplota kondenzorů) a tlaku 0,31 mbar, během následujících 36 h byl dodatečně snížen tlak na 0,01 mbar. Lyofilizovaný materiál byl homogenizován prostřednictvím oscilačního mlýnu v patronách z nerezové oceli o objemu 25 ml (kuličky z nerezové oceli, $d = 7\text{ mm}$). Úplná homogenizace byla docílena při frekvenci 27 Hz po dobu 5 min, výrobce uvádí výslednou velikost částic $\sim 5\text{ }\mu\text{m}$.

3.2.1.1 Extrakce s využitím inhibitoru alliinasy

Jedním ze dvou zvolených způsobů inhibice alliinasy je aplikace O-(karboxymethy)hydroxylamin-hemihydrochloridu (OCMHA). V případě česneku, cibulí a pažitky bylo naváženo 25 mg (s přesností 0,5 mg) homogenizovaného materiálu, navážka póru činidla 50 mg (s přesností 1,0 mg). Materiál byl extrahován směsí 900 μl MeOH obsahující OCMHA ($1,1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 100 μl deionizované vody (dH_2O) obsahující interní standard (IS) norleucin ($5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). K urychlení extrakce byly vzorky sonifikovány po dobu 15 min s výchozí teplotou lázně $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při dlouhodobých sonikacích nebylo možné zajistit stálou teplotu vody, tudíž byl pro každou sadu vzorků vyměněn celý objem lázně.

3.2.1.2 Extrakce s využitím kyseliny mravenčí

Druhým aplikovaným způsobem inhibice bylo snížení zdánlivého pH během extrakce kyselinou mravenčí. Následně byly oba způsoby srovnány a vyhodnoceny. Navážky vzorků byly totožné, jak bylo popsáno výše v textu. Vzorky byly následně extrahovány

směsí 900 μl MeOH s 0,05 % kys. mravenčí (v/v) a 100 μl dH_2O s IS norleucinem (5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Následná extrakce sonikací probíhala za stejných podmínek.

3.2.1.3 Extrakce čerstvé hmoty

Pro extrakci čerstvé hmoty bylo nutné odvození nového poměru navážky a extrakčního činidla. Zachován byl poměr extrakčního činidla vůči sušině. Lyofilizát je extrahován v poměru 1:40 (25 mg : 1 ml) (w/v). Pro extrakci čerstvé hmoty byl odhadnut podíl sušiny, který se ve většině případů pohybuje okolo 35 %. Nově odvozený poměr pro čerstvou hmotu byl 1:14 (w/v). Extrakční činidlo obsahovalo jako inhibitor kyseliny mravenčí, OCMHA nebylo možné využít vzhledem k vysokým navážkám.

Několik stroužků česneku (přibližně 15 g) bylo rozmixováno tyčovým mixerem přibližně v 80 % celkového objemu extrakčního činidla (90 % MeOH + kys. mravenčí, 10 % dH_2O + IS). Po homogenizaci byla směs kvantitativně převedena do odměrného válce a doplněna na finální objem a intenzivně protřepána.

3.2.1.4 Derivatizace činidlem FMOc

Odběru vzorku pro derivatizaci předcházela centrifugace při 7600 g po dobu 15 min. Pro derivatizaci bylo odebráno 100 μl supernatantu a v případě vzorků česneku pouze 50 μl (doplněno 50 μl MeOH) kvůli vysokému obsahu ACSO. Supernatant byl smíchán s 650 μl borátového pufru (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; pH 9,2), závěrem bylo přidáno 150 μl derivatizačního činidla (10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fluorenylmethylchlorformiát (FMOc) v acetonitrilu). Vždy došlo k vytvoření zákalu. Po jeho rozptýlení které nastalo přibližně po 5 min, byly nezreagované zbytky derivatizačního činidla vytřepány do 1 ml hexanu. Takto připravené vzorky byly následně analyzovány.

3.2.2 Analýza micelární elektrokinetickou chromatografií

První experimenty zahrnovaly obměny podmínek elektrokinetické separace. Zvolené finální parametry byly následující: délka křemenné kapiláry činila 80,5 cm , z toho efektivní délka 72 cm . Obě elektrody byly během separace ponořeny ve stejném základním elektrolytu, který vycházel z borátového pufru (20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS; pH 9,2; 10 % MeOH (v/v)). Nově zavedená kapilára byla promývána 10 min 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH, následně 10 min dH_2O a poté 15 min zákl. elektrolytem. Před jednotlivými analýzami byla kapilára promývána obdobně, 30 s 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH, 30 s dH_2O a 2 min zákl. elektrolytem. Dávkování vzorku bylo provedeno aplikací tlaku

50 mbar po dobu 1 s. Analýza probíhala za vloženého napětí +30 kV s počáteční rampou +1 kV/s. Pro dlouhé sekvence analýz byl zaveden doplňující systém, který každou třetí analýzu vyměnil zákl. elektrolyt v polypropylenových vialkách, jelikož během elektroforézy docházelo k jeho změnám. Do katodového prostoru jsou navíc vyplavovány analyty.

1 l základního elektrolytu byl připraven rozpuštěním 7,63 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 5,77 g SDS v dostatečném množství dH_2O , pH následně upraveno pomocí NaOH. Roztok byl doplněn do 900 ml dH_2O a následně ve válci do 1 l MeOH. Odlišný způsob přípravy vedl k odlišné separaci.

3.2.3 Stanovení enzymatické aktivity alliinasy

3.2.3.1 Příprava hrubého extraktu alliinasy

Příprava hrubého extraktu probíhala za neustálého chlazení na 0 °C. Čerstvý materiál byl společně s extrakčním fosfátovým pufrém ($50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ EDTA}$, pH 6,5) vychlazen na ledu, před samotnou homogenizací byl přidán inhibitor serinových proteas fenylmethansulfonylfluorid (PMSF) ve výsledné koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Směs byla homogenizována tyčovým mixerem. Hrubá směs byla zfiltrována přes čtyři vrstvy nesterilní gázy. Filtrát byl dodatečně centrifugován při 4 °C při 17949 g, 15 min. Závěrem byl supernatant filtrován přes nylonový mikrofiltr 0,45 μm . Podle aktuální potřeby byl využit pro stanovení enzymatické aktivity či zamrazen.

3.2.3.2 Stanovení aktivity a měření kinetiky

Před zahájením reakce bylo nutné hrubé enzymové extrakty ošetřit $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztokem 4-merkaptopyridinu (4-MP), roztoky byly míseny v poměru 1:4 (hrubý extrakt : ošetřující roztok). V hrubém extraktu jsou stále přítomny endogenní thiosulfináty, které jsou ošetřujícím roztokem odstraněny.

Stanovení aktivity byla uskutečněno v celkovém objemu 100 μl . Reakce byla zahájena přidáním ošetřeného hrubého extraktu do reakční směsi v poměru 1:4. Složení reakční směsi se lišilo pouze v koncentraci substrátu při měření kinetiky. Společná část zahrnovala $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ EDTA}$, $0,2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ 4-MP}$, $0,02 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ pyridoxal-5-fosfát}$, pH 7,2. Zvolenými koncentracemi alliinu pro měření kinetiky byly 2; 1; 0,5; $0,3$ a $0,25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Koncentrace methiinu pro měření kinetiky

byly následující: 8; 2,789; 1,686; 1,208; 0,941; 0,771; 0,650; 0,569 a 0,5 mmol·l⁻¹.
Koncentrace methiinu pro stanovení specifické aktivity byla 20 mmol·l⁻¹.

3.2.3.3 Stanovení celkových proteinů

Pro stanovení celkových proteinů v hrubých extraktech byla využita Bradfordova metoda (1976). Pro sestavení kalibrační řady byly vytvořeny roztoky hovězího sérového albuminu o koncentracích 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 a 0,2 mg·ml⁻¹.

Zásobní roztok Bradfordova činidla Coomassie Brilliant Blue G250 byl naředěn v poměru 1:4 dH₂O. 5 μl blanku (dH₂O), kalibračního roztoku či vhodně naředěného vzorku bylo smícháno s 45 μl dH₂O a následně s 200 μl naředěného činidla. Po 10min inkubaci ve tmě byla změřena absorbance při 595 nm.

3.2.4 Identifikace produktu reakce

Produkt reakce dimethylthiosulfinátu s 4-MP byl identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Nejprve byl připraven hrubý extrakt alliinasy z česneku, který byl dialyzován při 5 °C (Cut-off hodnota molekulové hmotnosti 14 kDa). Výměna pufru (10 mmol·l⁻¹ NaH₂PO₄, 1 mmol·l⁻¹ EDTA, pH 6,5) probíhala každé 4 hodiny (popř. přes noc) v objemu 1 l. Následně ke 150 μl reakční směsi (methiin 9 mmol·l⁻¹, 4-MP 10 mmol·l⁻¹, PLP 1 mmol·l⁻¹, rozpouštěno ve fosfátovém pufru 20 mmol·l⁻¹ NaH₂PO₄, 2 mmol·l⁻¹ EDTA pH 7,2) byla přidáno 50 μl částečně purifikované alliinasy. Po 10 min byla reakce ukončena přidávkem 200 μl MeOH. Denaturovaný enzym byl odstraněn filtrací směsi přes filtr 0,22 μm.

Chromatografická separace probíhala na koloně Acquity BEH 100x2,1 mm (1,7 μm), při teplotě 25 °C. Průběh binárního gradientu (A = dH₂O + 1% kys. mravenčí; B = acetonitril + 1 % kys. mravenčí) byl následující: 0-3 min 20 % B, 3-5 min 50 % B, 3,5-4 min 50 % B, 4-4,1 min 20 % B, 4,1 – 6 min 20 % B.

Pro identifikaci molekulového iontu měření probíhalo v módu Q1 Full Scan s pozitivní polaritou v rozsahu *m/z* 50 až 200 se skenovacím časem 1 s. Napětí na kapiláře bylo nastaveno na 3 kV, teplota vaporizéru byla nastavena na 350 °C a iontové trubice 320 °C. Pro fragmentaci měření probíhalo v módu Product ion scan za identických podmínek, měření ve stejném rozsahu *m/z*, kolizní energie 30 eV, *m/z* mateřského iontu bylo nastaveno na 158.

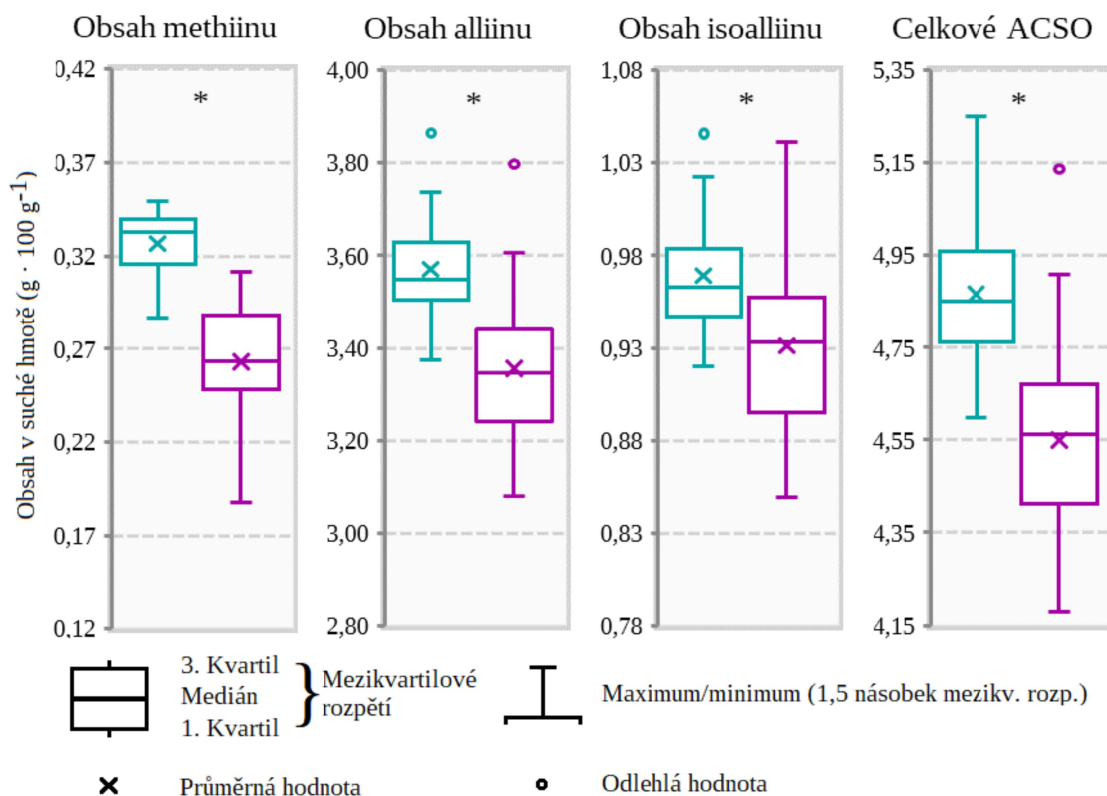
4 VÝSLEDKY

4.1 Úprava extrakce biologického materiálu

Prvním sledovaným parametrem byla stabilita derivatizačního činidla FMOC v acetonitrilu. Na základě analýzy několika orientačních vzorků bylo zjištěno, že dochází k více jak 10% ztrátám činidla za 1 d i po zmrazení na -20 °C. Není tedy možné připravit jeho zásobní roztok, a proto bylo nutností připravit každý den čerstvý roztok.

Ve snaze zachovat jednoduchost přípravy vzorků byly vytvořeny orientační vzorky, které hexanem extrahovány nebyly. Vynechání tohoto kroku však vedlo k výraznému zvýšení pozadí a mnohonásobnému nárůstu plochy píku slepého vzorku. Postup zahrnující extrakci 1 ml hexanu dostatečně snížil pozadí a výrazně redukoval pík slepého vzorku. Pro orientaci bylo provedeno i vytřeptání do 2 ml hexanu (v dávkách 1+1 ml). Toto opatření nevedlo k dodatečnému snížení pozadí a pík slepého vzorku byl již dostatečně redukován při extrakci do 1 ml. Naopak byl pozorován negativní efekt. Derivatizované látky částečně přechází do nepolárního hexanu a s jeho další dávkou dochází i ke snížení plochy píků analytů, čímž je i zároveň snižována citlivost metody.

Účinnost inhibitorů alliinasy, kys. mravenčí a OCMHA, během extrakce byla srovnána. Za totožných podmínek byly oba přístupy ověřeny. Experiment byl proveden ve dvaceti replikátech jednoho vzorku komerčně dostupného česneku (AHOLD Czech Republic a. s., země původu Španělsko). Vzorky byly analyzovány a kvantifikovány. Výsledné obsahy v suché hmotě analytů následně porovnány v krabicovém grafu (viz obr. 9). Soubory obsahů byly srovnány oboustranným nepárovým t-testem. Extrakce vzorků s kys. mravenčí vedla u všech analytů k získání statisticky signifikantně vyšších hodnot obsahů než v případě OCMHA. Extrakcí s kys. mravenčí byly získány průměrné hodnoty obsahů alliinu 3,57 %, methiinu 0,33 % a isoalliinu 0,97 %, s inhibitorem OCMHA byly získány průměrné hodnoty alliinu 3,36 %, methiinu 0,26 % a isoalliinu 0,93 %. Extrakce s přídavkem kys. mravenčí se ukázala o to vhodnější pro nadcházející aplikace v porovnání s OCMHA, jelikož OCMHA ve své struktuře obsahuje primární amin, který v tomto uspořádání taktéž podléhá derivatizaci a produkuje další pík v chromatogramu. Pík inhibitoru migruje v blízkosti píku alliinu, v případě zhoršení separačních podmínek, které mohou být například způsobeny stavem a opotřebením křemenné kapiláry, může hrozit riziko nedostatečné separace těchto dvou látek.



Obr. 9: Krabicový graf hmotnostních podílů analytů ve vzorku česneku (komerčně dostupný). ZELENĚ jsou znázorněny hodnoty získané po extrakci s kys. mravenčí, FIALOVĚ extrakce s OCMHA. Ve všech případech je rozdíl statisticky významný na základě srovnání prostřednictvím nepárového oboustranného t-testu ($p < 0,05$) ($n = 20$).

Po zvolení vhodného inhibitoru byla stanovena účinnost extrakce. Navážka vzorku česneku (odrůda Havran) byla extrahována dvakrát totožnou extrakční směsí (90 % MeOH + kys. mravenčí, 10 % dH₂O + IS). V druhém extraktu se signál methiinu propadl pod limit kvantifikace a signál isoalliinu pod limit detekce (viz Tab. 1). Z výsledků je patrné, že první extrakcí je extrahováno více než 90 % všech ACSO, v případě alliinů necelých 88 %. Nicméně je pravděpodobné, že tyto hodnoty jsou ve skutečnosti o něco vyšší. Při přípravě druhého extraktu nebylo možné v mikrozkuhavce zcela oddělit zbytky předchozího extrakčního činidla od navážky česneku. ACSO z tohoto reliktu nadhodnotily výsledné koncentrace v druhém extraktu. Výsledek může být taktéž zkreslen nízkým lineárním dynamickým rozsahem metody (viz níže kapitola 4.2.1). Získané odezvy signálu alliinů se pohybovaly na spodní hranici kalibrační přímky, kde byl předpokládán větší vliv pozadí, chyba integrace a kvantifikace.

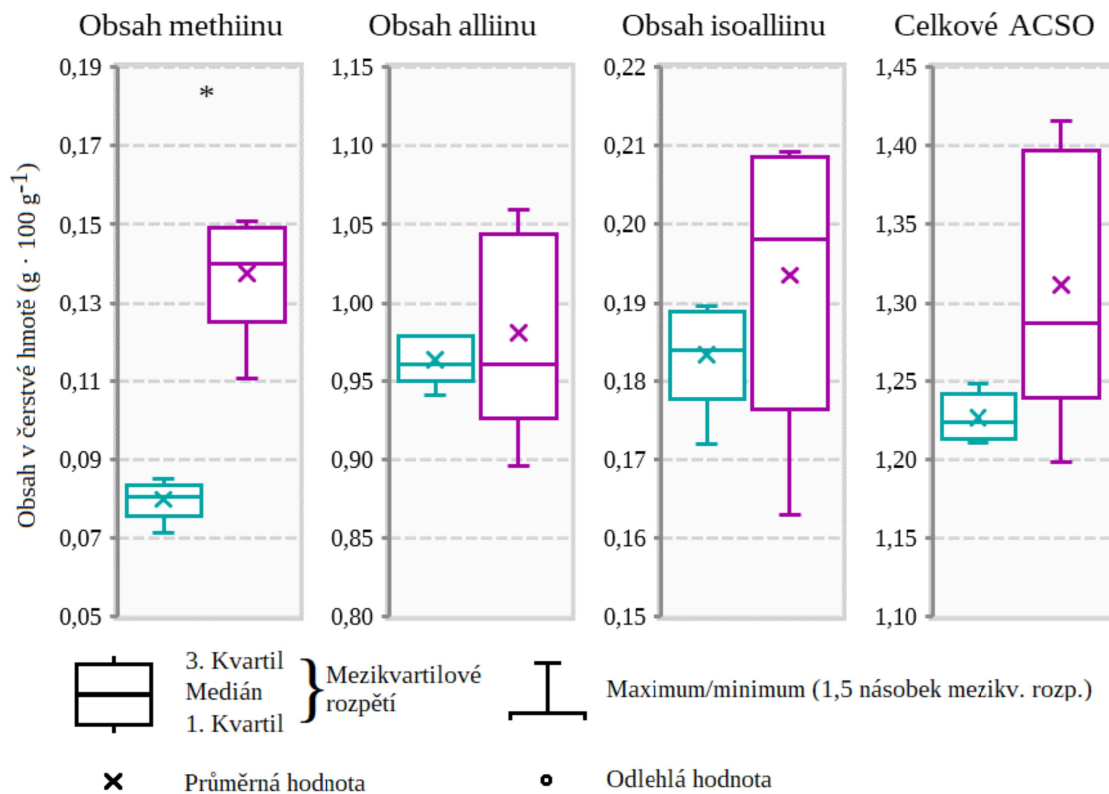
Tab. 1: Účinnost extrakce. Analyty v extraktech byly kvantifikovány, následně bylo vypočteno jejich procentuální zastoupení v prvním a druhém extraktu. *V druhém extraktu se na celkových ACSO podílí pouze alliin, jelikož methiin byl mimo rozmezí kvantifikace a isoalliin nebyl detekován (n = 6).

Parametr	1. extrakt	2. extrakt
Obsah alliinu ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$2,91 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,03$
Celkové ACSO ($\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	$4,18 \pm 0,11$	$0,40 \pm 0,03$ *
Obsah alliinu v extraktu	$87,83 \pm 0,88 \%$	$12,17 \pm 0,88 \%$
Obsah celkových ACSO v extraktu	$91,2 \pm 0,65 \%$	$8,80 \pm 0,65 \%$ *

Cennou informací bylo porovnání extrakcí čerstvé hmoty a lyofilizovaného materiálu. Srovnání bylo provedeno v technickém hexaplikátu česneku (AHOLD Czech Rep. a.s., země původu Španělsko). Realizace ve větším počtu replikátů nebyla možná vzhledem k nadměrným spotřebám rozpouštědel a chemikálií (zejména IS). Od použití OCMHA při extrakci čerstvé hmoty bylo upuštěno vzhledem k velkým množstvím nutných na provedení experimentu. Ve výsledku bylo zjištěno, že oba způsoby extrakce poskytují podobné výsledné obsahy ACSO. Extrakce lyofilizovaného materiálu poskytuje informaci o obsahu ACSO v suché hmotě. Proto byly tyto hodnoty matematicky převedeny na obsah v čerstvé hmotě prostřednictvím obsahu sušiny (32,32%). Soubory obsahů analytů a celkových ACSO byly porovnány oboustranným nepárovým t-testem. Stanovené obsahy alliinu vykazovaly největší shodu (viz obr. 10), následovaly isoalliin a celkové ACSO ($p = 0,59$, $p = 0,31$, $p = 0,09$ respektive), mezi obsahy methiinu byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

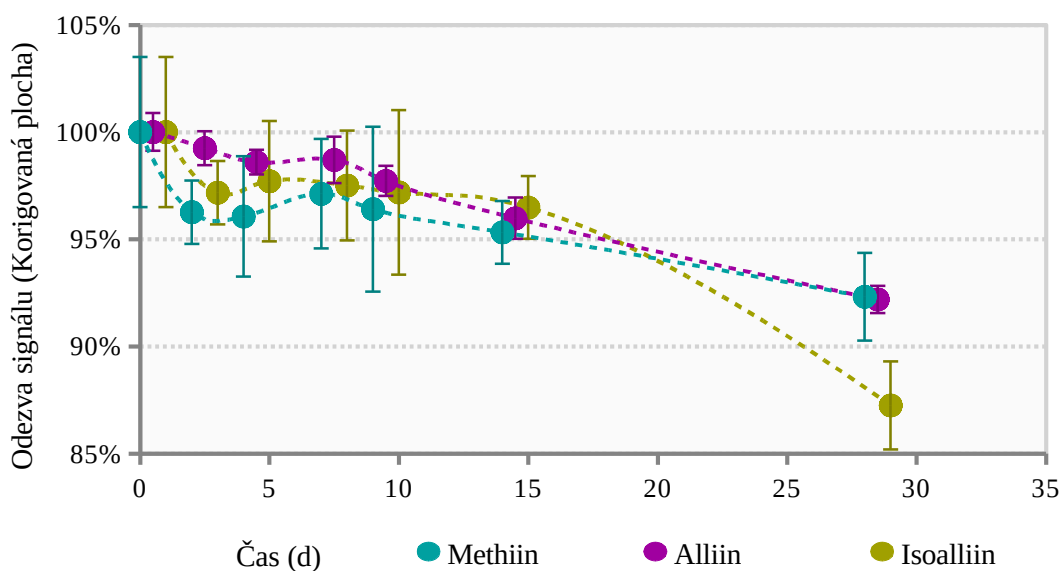
4.1.1 Stabilita analytů po derivatizaci

Další navazující podstatnou informací, která byla získána, je stabilita derivátů ACSO s FMOC. Tyto látky samy o sobě nejsou dlouhodobě stabilní ve vodných roztocích, proto byla utvořena trojice vzorků vycházející z reálného vzorku česneku (AHOLD Czech Rep. a.s., země původu Španělsko), nikoli z čistých standardů. Vzorky byly inkubovány v chladničce a v průběhu dvou měsíců analyzovány a sledovány odezvy signálů analytů. Každý ze vzorků byl v daný termín analyzován třikrát. Na obr. 11 je vyobrazen průběh odezvy signálu v čase. Měření ve dnech 17 a 21 v grafu bylo vynecháno kvůli technickým komplikacím. Z grafu je zřejmé, že z dlouhodobého pohledu nedochází k výrazným ztrátám. Pokud dochází k významné degradaci, tak dochází taktéž k degradaci derivátu IS, což kompenzuje chybu při kvantifikaci. Úbytek analytu může být orientačně sledován plochou píků, nicméně není vhodné sledovat



Obr. 10: Krabicový graf zobrazující stanovené obsahy stejného vzorku česneku. ZELENĚ jsou znázorněny obsahy získané po extrakci lyofilizovaného materiálu. FIALOVÁ reprezentuje obsahy stanovené po extrakci čerstvé hmoty. Statisticky významný rozdíl je pouze v případě methiinu, využit byl oboustranný nepárový t-test ($n = 6$).

Stabilita FMOC derivátů

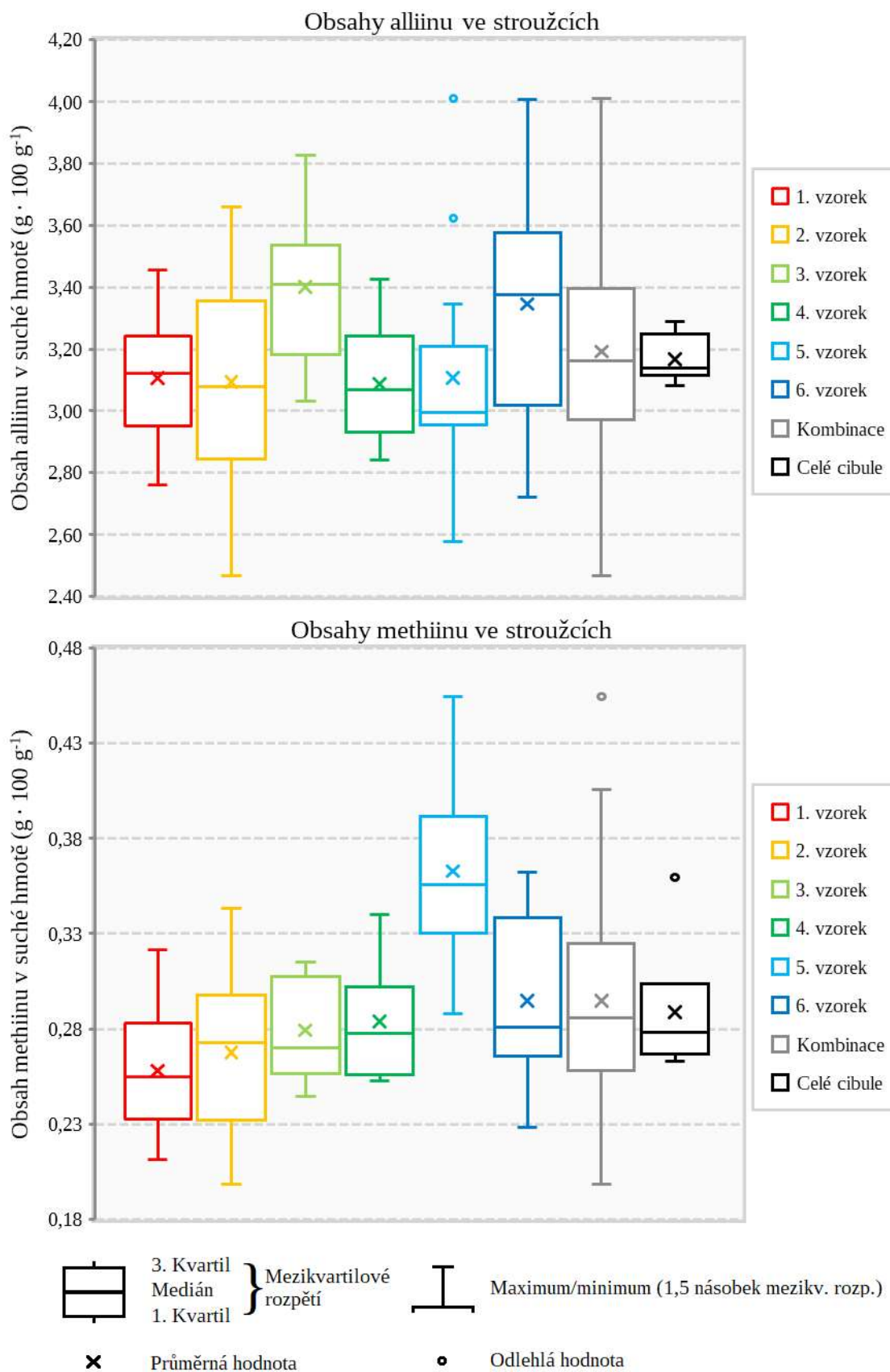


Obr. 11: Graf stability FMOC derivátů ACSO. V průběhu času byla sledována odezva signálu. Vzorky byly uchovávány v chladničce ($n = 3$; Průměr \pm SD).

pouze tento parametr, který je u kapilární elektroforézy závislý na migračním čase. Z praktického hlediska tento výsledek vypovídá o tom, že vzorky mohou být připraveny s dlouhodobým předstihem a uschovány v chladničce. I po dvou týdnech byla naměřena odezva signálu vyšší než 95 %.

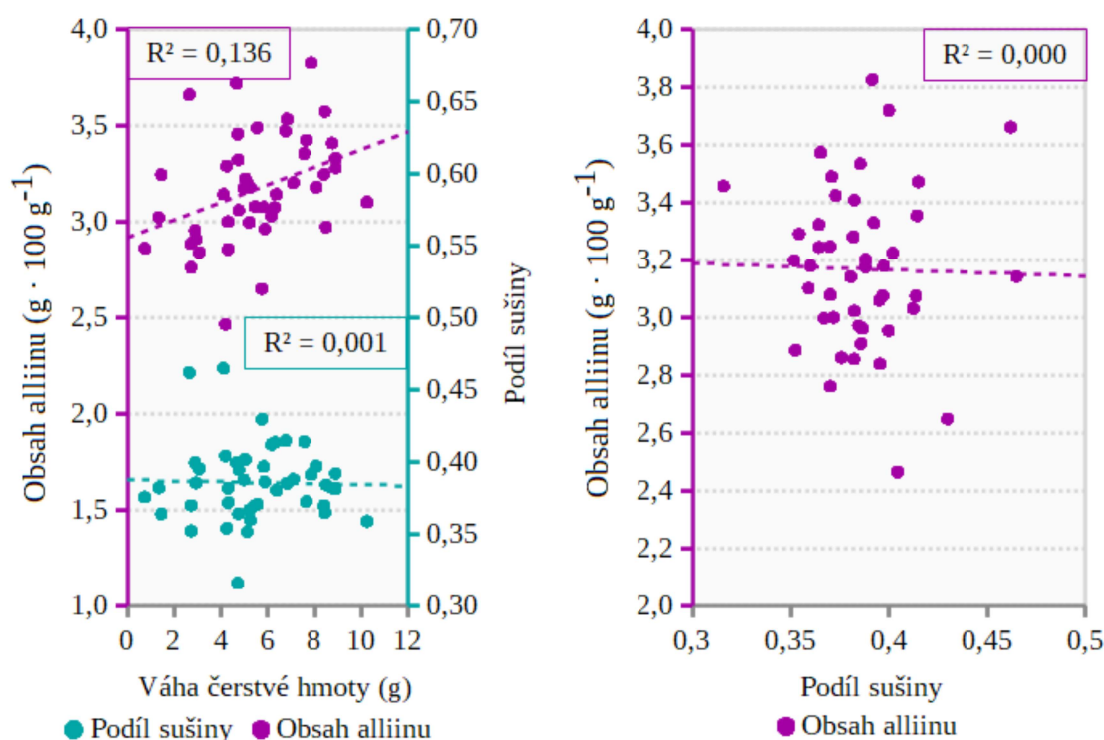
4.1.2 Zvolení reprezentativního vzorku česneku

Posledním řešeným problémem spjatým s extrakcí bylo zvolení vhodného reprezentativního vzorku česneku. Na rozdíl od cibule kuchyňské či póru zahradního jej nelze rovnoměrně dělit. Stroužky vznikající během zrání zásobní cibule česneku narušují její symetrii. Pro experiment bylo vybráno celkem šest velmi podobných a přibližně stejně hmotných zás. cibulí česneku (Tesco Stores a. s., země původu Česko). Každý stroužek byl analyzován zvlášť, zjištěny byly obsahy ACSO, obsah sušiny a pozice stroužku. Matematicky byly odvozeny průměrné obsahy ACSO v celých zás. cibulích a porovnány. Pro zhodnocení byly sledovány pouze obsahy alliinu a methiinu. Obsah isoalliinu byl chybně stanoven u stroužků z prvního a druhého vzorku, což následně vedlo i k chybnému výpočtu celkových ACSO a experiment nemohl být opakován. V krabicových grafech (Obr. 12) jsou vyobrazeny obsahy analytů ve stroužcích příslušných cibulí (1.-6. vzorek), následně společně všechny stroužky a pro srovnání obsahy v celých cibulích. V případech obou analytů bylo patrné, že rozptyl jejich obsahů byl výrazně nižší v případě celých cibulí než rozptyl obsahů ve stroužcích jednoho vzorku. Na základě obou grafů se jeví vhodnější pro přesné stanovení ACSO analyzovat celou zás. cibuli namísto stroužků. Další z možností je cibuli vhodně rozdělit. Již před samotnou analýzou byly pozorovány významné rozdíly mezi stroužky. Jedná se především o rozdíl hmotnosti stroužků, ale i o rozdíl v podílu sušiny, který se pohyboval v rozmezí 31,6-46,5 %. Rozdělení zásobní cibule česneku na stroužky a jejich vhodný výběr umožňuje zpracování výrazně menšího množství biologického materiálu. Proto byla vyhodnocena korelace mezi parametry stroužků, které lze získat ještě na počátku přípravy vzorků, a to hmotnost stroužků, a po lyofilizaci podíl sušiny. Na obr. 13 jsou znázorněny závislosti mezi obsahem alliinu (v suché hmotě) a podílu sušiny na hmotnosti stroužků a závislost obsahu alliinu. Velmi slabá korelace byla přítomna mezi obsahem alliinu a hmotností stroužků ($R = 0,369$; $R^2 = 0,136$). U zbylých dvou vynesení korelace není.



Obr. 12 Krabicové grafy obsahů alliinu a methiinu ve stroužcích česneku. BAREVNĚ jsou zobrazuje obsahy ve stroužcích příslušných cibulí, sedmý zahrnuje všechny stroužky. Poslední jsou odvozené obsahy v celých cibulích s výrazně nižším rozptylem hodnot.

Závislost podílu sušiny a obsahu alliinu na hmotnosti stroužků a obsahu alliinu na podílu sušiny



Obr. 13: Grafy korelace. První graf znázorňuje závislost mezi podílem sušiny a obsahem alliinu na váze čerstvé hmoty stroužku. Druhý uvádí závislost obsahu alliinu na podílu sušiny ve stroužcích.

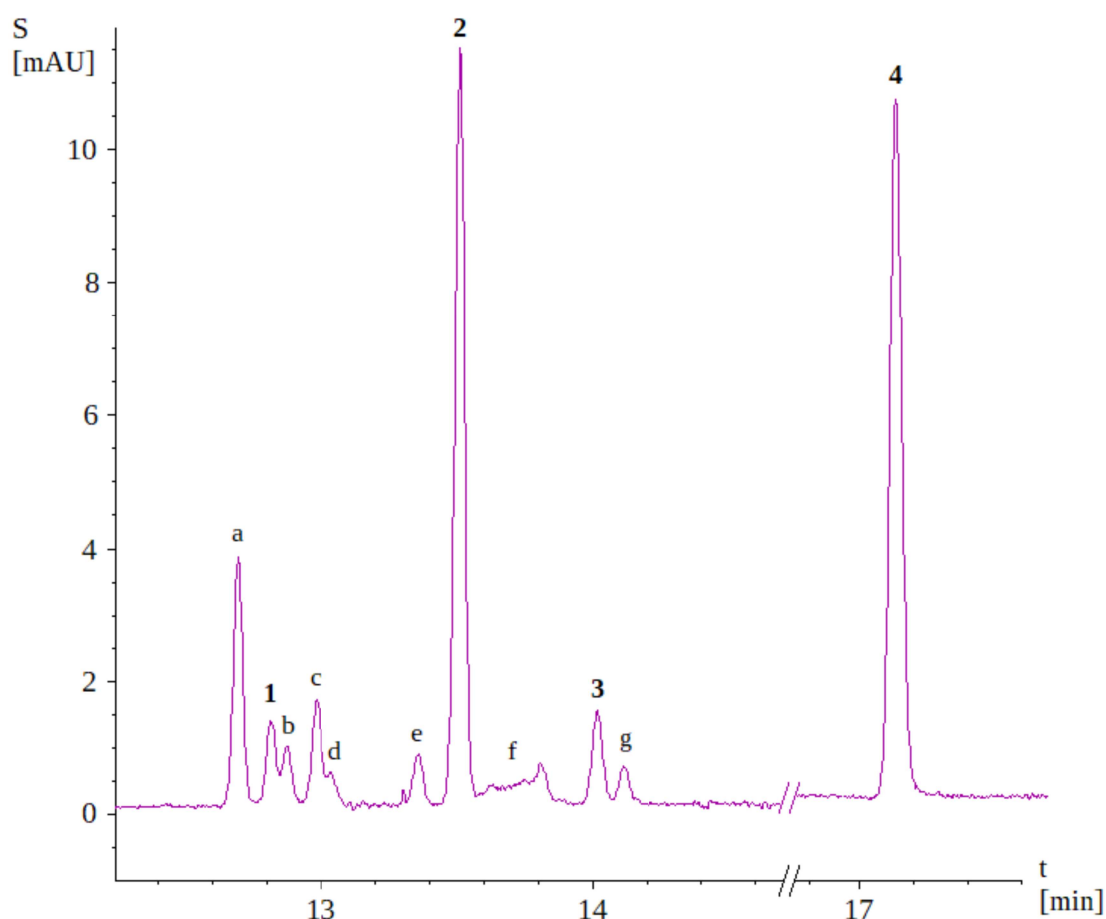
Menší stroužky jsou zpravidla lokalizovány blíže středu cibule a vznikají oddělením od větších stroužků. Nicméně korelace je velmi slabá a zvolení malého počtu stroužků ze zás. cibule může vést ke stanovení odlišného obsahu ACSO, než při zpracování celé zás. cibule.

4.2 Analýza micelární elektrokinetickou chromatografií

Z výchozí práce Kubec a Dadáková (2008) byl výrazně upraven extrakční postup, ale i podmínky separace musely být pozměněny. Prvním z odlišných parametrů byla délka křemenné kapiláry. Ta je přednastavena výrobcem sestavy kapilární elektroforézy. Analýzy byly provedeny celkem na třech odlišných délkách, jednalo se o 48; 80,5 a 112,5 cm (efektivní délka 40,5; 72 a 104 cm respektive, v autorské práci 67 cm). Složení ZE zůstalo nezměněno, při vloženém napětí 30 kV nejvíce vyhovovala efektivní délka 72 cm. Při zvolení kratší kapiláry nebyly analyty dostatečně separovány. Zejména pík methiinu, který migruje v blízkosti dalších třech látek. Analýza na delší kapiláře trvala dvojnásobnou dobu a nezajistila lepší separaci. Výsledný elektroferogram

je zobrazen na obr. 14. Taktéž bylo oproti autorské práci zvýšeno napětí, čímž byla výrazně zkrácena doba analýzy. Přestože nemohly být zachovány totožné podmínky, bylo dosaženo podobné separace v kratším čase na delší kapiláře.

Identifikace látek byla provedena porovnáním migračních časů s časy čistých standardů a přidáním standardu k reálnému vzorku. Methiin a alliin jsou komerčně dostupné látky, isoalliin nikoliv. Jeho identifikace proběhla odlišným postupem. Z literatury (Rose *et al.*, 2005) je známo, že isoalliin je majoritním zástupcem ACSO cibule a příbuzných druhů (např. cibule šalotka (*Allium cepa* var. *aggregatum* L.)). Proto byl připraven extrakt ze žluté cibule (Tesco stores a. s.). Nejvyšší pík byl přiřazen isoalliinu, následně byl extrakt přidán k vzorku česneku pro identifikaci píku v elektroferogramu česneku. Vzhledem k nedostupnosti čistého standardu byla kvantifikace vztažena na kalibraci alliinu.



Obr. 14: Elektroferogram reálného vzorku česneku. Identifikované látky: 1 = methiin, 2 = alliin, 3 = isoalliin, 4 = IS; a = glutamin, b = asparagin, c = serin, d = threonin, e = alanin, f = směs několika látek (identifikovány glycin, prolin), g = valin.

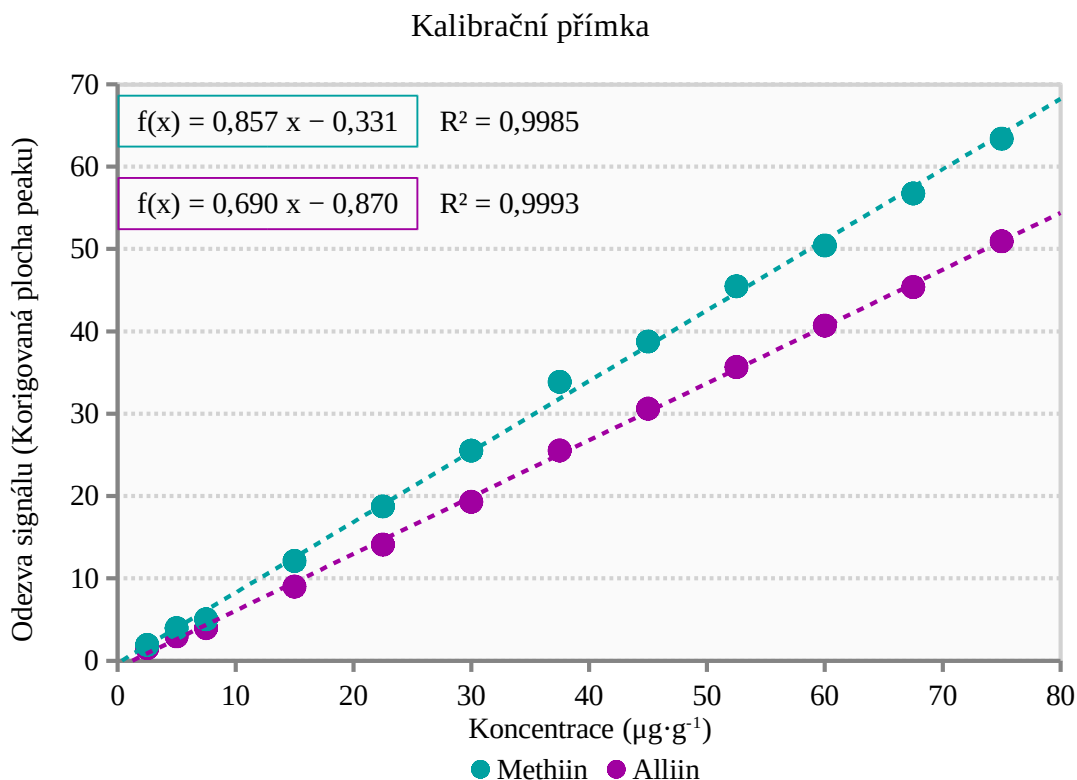
Ostatní látky v elektroferogramu byly identifikovány na základě porovnání migračních časů čistých standardů a následně přidavkem standardu k reálnému vzorku. Nejpodobnějšími látkami ACSO, které podléhají derivatizaci FMOC, jsou volné L-aminokyseliny. V těsné blízkosti před píkem methiinu migruje pík glutaminu. Methiin částečně komigruje s asparaginem. Míra jejich separace je velmi závislá na aktuálním stavu kapiláry a zákl. elektrolytu. Při opotřebenosti kapiláry dochází ke zhoršení separace. Špatný stav zákl. elektrolytu vede k vyššímu projevu pozadí. Kvantifikace nízkých koncentrací methiinu je o to více zatížena chybou. Při výborném stavu kapiláry i zákl. elektrolytu je tento kritický pár téměř separován na základní linii. Za asparaginem migruje pík serinu, threoninu a alaninu. Po alliinu migruje směs látek, v nichž byl identifikován glycin a prolin. Následuje migrace isoalliinu a valinu. Za migrací valinu následuje cystein a methionin, nicméně v plodinách rodu *Allium* se nevyskytují v koncentracích vyšších než je limit detekce této metody.

4.2.1 Kalibrace

Horní hranice kalibračního rozsahu je omezena derivatizací vzorků. V současném postupu je látkové množství přidávaného derivatizačního činidla 1,5 μmol . Toto množství již nelze zvýšit, jelikož následně nedochází ke ztrátě zákalu a časem dochází ke vzniku nerozpustné bílé sraženiny. Tato skutečnost byla experimentálně ověřena na čistém standardu methiinu. Spodní hranice kalibrace je omezena citlivostí metody.

Kalibrační přímka byla vytvořena z dvanácti bodů v následujících koncentracích: 75; 67,5; 60; 52,5; 45; 37,5; 30; 22,5; 15; 7,5; 5 a 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (viz obr. 15). Nejnižší bod kalibrace se pohybuje na limitu kvantifikace. Sledovanými parametry byly plochy píků a migrační čas analytů a IS. Migrační čas byl zaznamenáván, jelikož neslouží pouze k identifikaci, ale i ke kvantifikaci. Na rozdíl od kapalinové chromatografie se s migračním časem nemění pouze geometrie píku, ale i jeho plocha. Tento jev je způsoben tím, že analyty prochází detektorem odlišnou rychlostí. Rychle migrující látky setrvávají v oblasti detektoru kratší dobu a poskytují signál po kratší dobu než látky migrující nižší rychlostí (Baker, 1995). Odezva signálu (korigovaná plocha píku vztahovaná korigovanou plochu IS) byla vypočtena následujícím způsobem:

$$X = \left(\frac{S^a}{R_t^a} \right) \cdot \left(\frac{S^{IS}}{R_t^{IS}} \right)^{-1} \cdot c; \quad \begin{array}{l} a = \text{analyt}; \quad IS = \text{interní standard} \\ S = \text{plocha peaku}; \quad R_t = \text{migrační čas} \\ c = 25 \text{ (koncentrace IS)} \end{array}$$



Obr. 15: Kalibrační přímka methiinu a alliinu.

Při výpočtu byla zpočátku zahrnuta koncentrace interního standardu ($25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), nicméně ve finálním provedení extrakce i derivatizace může tento parametr být vynechán. Jeho koncentrace zůstala nezměněná jak při sestrojování kalibrace tak i analýzy vzorků (lyofilizovaných i čerstvých). Zahrnutí tohoto parametru bylo podstatné při prvotních experimentech, např. pilotní experimenty extrakce čerstvé hmoty (data neuvedena). Tato hodnota zůstala ve výpočtech zachována pro přehlednější orientaci a snadnější práci s číselnými hodnotami.

Kalibrace byla sestrojena i pro (\pm)-propiin, avšak uvedena není, jelikož v žádném reálném vzorku nebyl detekován. (\pm)-propiin poskytuje v chromatogramu dva píky, ačkoliv racemáty nemohly být identifikovány na základě porovnání s čistým standardem. Podle Kubec a Dadáková (2008) bylo předpokládáno, že k eluci (+)-ACSO dochází dříve než k (-)-ACSO. Podobná situace nastala v případě D,L-norleucinu, který taktéž poskytuje dva píky vždy o stejném poměru ploch. Veškeré výpočty byly vztaženy na první pík. Výpočet mohl být vztažen na součet obou ploch, avšak migrační čas druhého píku prodlužoval celkovou dobu analýzy.

4.2.2 Analýza ACSO v dalších matricích

Aplikovatelnost této metody na další plodiny jako je cibule (kuchyňská, zimní, šalotka), pažitka pravá či pór zahradní byla ověřena. Volbě reprezentativního vzorku nebyla věnována taková pozornost jako v případě česneku vzhledem k symetrii biologických vzorků. Vzorky byly kvartovány. Oproti česneku jsou ACSO v těchto plodinách zastoupeny ve výrazně nižších koncentracích. Zjištěny byly i odlišné podíly sušiny, orientačně se jedná o hodnoty 11-13 % v cibuli kuchyňské, 17 % v cibuli šalotce, 8 % v cibuli zimní, 13 % v póru a 9 % v pažitce.

Nižší zastoupení ACSO bylo kompenzováno vyššími navážkami a většími objemy extraktu přidávaného k derivatizační směsi. Menší zastoupení ACSO vede k významné komplikaci, vyššímu poměru volných aminokyselin vůči ACSO. Methiin je majoritním zástupcem póru, avšak jeho přesná kvantifikace je znemožněna komigrací s rozsáhlými píky glutaminu a asparaginu.

Stanovené obsahy ACSO v plodinách jsou uvedeny v tab. 2 společně s daty uváděné v literatuře. Podíly jednotlivých ACSO se výrazně odlišují. Na celkových ACSO v česneku se methiin podílí 6,0-6,8 %, alliin 79,2-79,6 % a isoalliin 14-14,4 %. Obsah obou vzorků se pohyboval v rozmezí 12522 až 13801 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ čerstvé hmoty. V póru methiin tvoří podíl 15,7 %, isoalliin 84,3 %, celkový obsah činil 670 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ č. hm. V pažitce se methiin podílí 13,4 %, alliin 6,1 % a isoalliin 80,5 %, celkový obsah ACSO 1387 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ č. hm. V různých druzích cibule jsou podíly podobné. V cibuli zimní methiin tvoří 9,9 % a isoalliin 91,1 % s celkovým obsahem 776 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ č. hm., v cibuli šalotce tvoří podíly 12,3 % a 87,7 % methiin a isoalliin respektive s celkovým obsahem 1044 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ č. hm., v cibuli kuchyňské pak 12,8-13,0 % a 87,0-87,2 % s celkovým obsahem 866-1150 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ č. hm.

4.2.3 Stabilita migračních časů

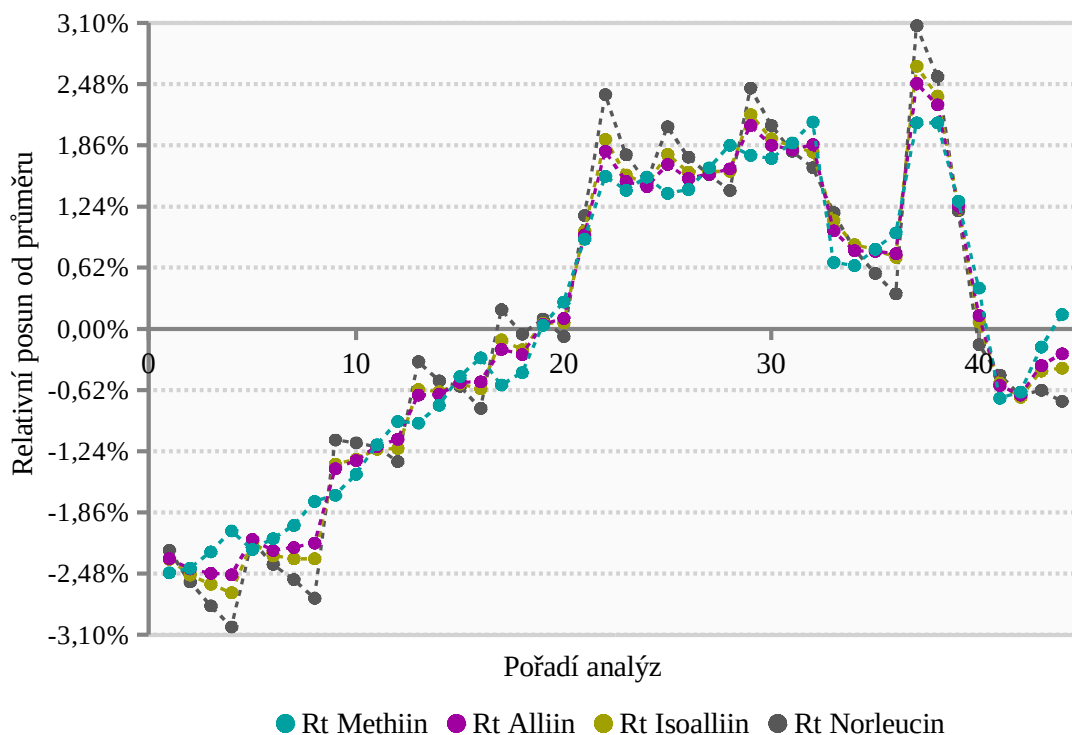
Během celé práce se MEKC analýzy potýkaly s problémem stability migračních časů (RSD = 1,7 %). Posun migračních časů nevyvolával problém identifikace analytů, pořadí píků zůstalo nezměněno, vždy došlo k posunu celého elektroferogramu. Problematický je nárůst ploch píků při opoždění. Kvantifikace je vždy vztažena na korigovanou plochu interního standardu. V případě, že dochází ke stejnému relativnímu nárůstu migračních časů a ploch všech analytů včetně standardu, dochází k matematické korekci při výpočtu odezvy signálu. Byla vytvořena dlouhá sekvence

Tab. 2: Obsahy stanovených ACSO v této práci a dalších publikacích. Šedě podbarvené jsou hodnoty získané v této diplomové práci. (-) = bez detekce, (x) = nesledováno, a – Kubec *et al.*, 2000; b – Ovesná *et al.*, 2011; c – Kubec a Dadáková, 2008; d – Krest *et al.*, 2000; † v publikaci uvedeno jako *Allium longicuspis* Rgl., ‡ v publikaci je sledovaným parametrem, ale hodnoty neuvedeny. V případě analýz více vzorků jednoho druhu v publikaci je uvedeno vzorek 1 a 2. Pro tuto diplomovou práci vzorek česneku 1 a 2 = komerčně dostupné (země původu Česko), vzorky cibule kuchyňské 1 a 2 = komerčně dostupné (cib. červená a žlutá respektive)

Druh		Obsah sušiny	Obsah v čerstvé hmotě ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) *					Metoda stanovení
			Methiin	Alliin	Isoalliin	Propiin	Ethiin	
Česnek kuchyňský	Vzorek 1	36,90 %	844	9921	1757	-	x	CE-FMOC
	Vzorek 2	35,90 %	825	10991	1985	-	x	CE-FMOC
	a ^{vzorek 1†}	-	1047	11840	<2	<2	<2	GC
	a ^{vzorek 2†}	-	1073	9241	<2	-	<2	GC
	b	-	‡	5536-10254	‡	-	x	HPLC-OPA
	c	-	1230	9963	1107	-	x	CE-FMOC
	d	-	330	1730	230	-	x	HPLC-OPA
		13,50 %	105	<35	565	-	x	CE-FMOC
Pór zahradní	a	-	40	<2	176	<2	<2	GC
	c	-	184	<20	1346	<20	x	CE-FMOC
		9,40 %	187	56	1116	-	x	CE-FMOC
Pažitka pravá	a	-	322	21	310	66	5	GC
	c	-	539	<20	1911	<20	x	CE-FMOC
Cibule zimní		7,80 %	77	-	699	-	x	CE-FMOC
		17,30 %	128	-	916	-	x	CE-FMOC
Cibule šalotka	a ^{vzorek 1}	-	414	11	927	177	29	GC
	a ^{vzorek 2}	-	217	26	197	34	19	GC
	c	-	256	<20	1094	-	x	CE-FMOC
Cibule kuchyňská	Vzorek 1	13,70 %	150	<35	1000	-	x	CE-FMOC
	Vzorek 2	11,40 %	111	-	755	-	x	CE-FMOC
	c	-	106	-	484	-	x	CE-FMOC

analýz, dávkování bylo provedeno pouze z jediného vzorku a sledován byl vývoj migračních časů v dlouhé sekvenci analýz. Tento průběh je zobrazen na obr. 16. Pro každý analyt byl odvozen průměrný čas během 44 analýz. V grafu je vynesena relativní posun migračního času od průměrné hodnoty, a je patrné, že nárůst není relativní. Největší relativní nárůst byl sledován u interního standardu, nejmenší u methiinu, analytu s nejkratším migračním časem. Vzhledem k tomu, že je pozorován mezi analyty neidentický relativní nárůst migračních časů, ve výsledku je ovlivněna i kvantifikace. Výpočet odezvy signálu vyžaduje čtyři proměnné, z nichž známy jsou pouze dvě (migrační časy). Míra s jakou narůstají plochy píků v čase vyžaduje v tomto případě mnohem větší počet analýz vzhledem k jejich výrazné variabilitě, která je způsobena chybou měření a integrace píků. Odhadnutí chyby bylo proto provedeno empiricky.

Vývoj migračního času v sekvenci analýz



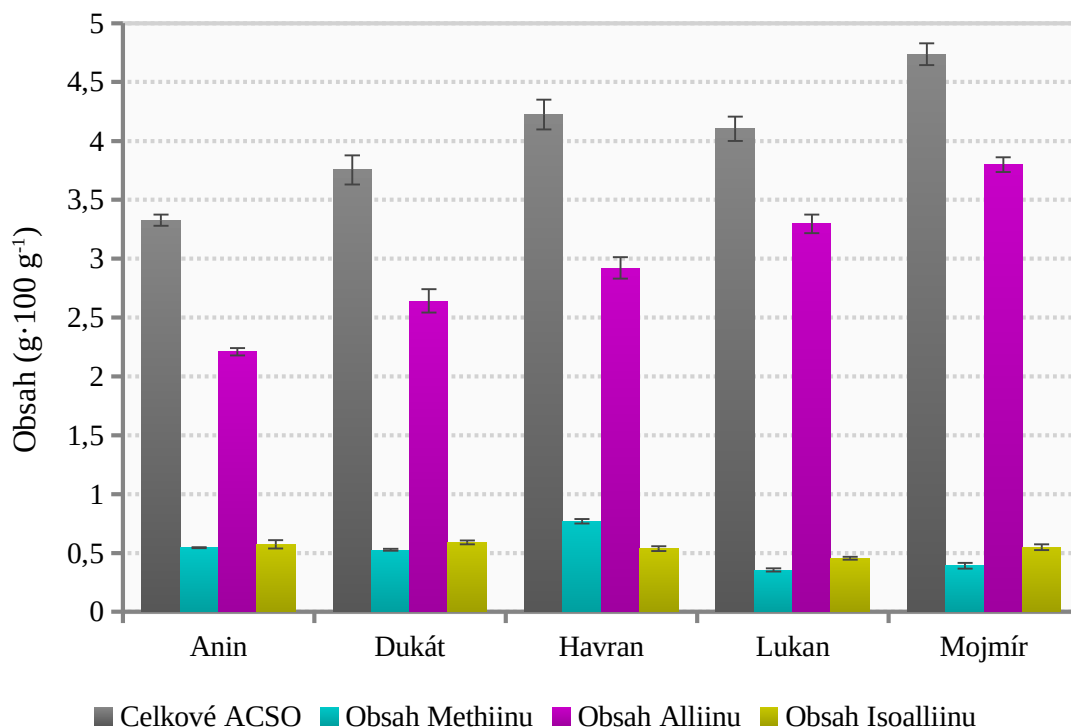
Obr. 16: Graf vývoje migračních časů analytů.

Byla sledována závislost ploch píků na migračním čase interního standardu (graf neuveden). Velmi slabá pozitivní korelace byla pozorována mezi plochou píku norleucinu a jeho migračním časem ($R = 0,234$, $R^2 = 0,055$). Dále byla pozorována závislost odezvy signálu alliinu na migračním čase pro zjištění zda existuje korelace mezi nimi a jakým způsobem ovlivňuje kvantifikaci. Na obr. 17 je uveden graf relativní odchylky odezvy signálu na migračním čase. Zjištěna byla slabá negativní korelace ($R = 0,343$; $R^2 = 0,118$). Tento trend udává podhodnocení výsledku o 1 % při prodloužení migračního času o 45,5 s.

Jako opatření proti tomuto jevu byla zavedena častější výměna zákl. elektrolytu. Degradace zákl. elektrolytu se projevuje v grafu na obr. 16 repetitivními úseky, znehodnocování elektrolytu vede ke snižování migračních časů. Z obav, že se jedná o jev zapříčiněný maticí česneku, byl totožný experiment proveden na čistých standardech. Měření s čistými standardy vedlo ke stejnému závěru.

I přes výrazné změny migračních časů se v extrémech jedná o posuny 1 min, které podle trendu přináší chybu podhodnocení přibližně 1,3 %. Relativní směrodatná odchylka dávkování vzorku se pohybuje v oblasti 1,5 % pro všechny sledované analyty,

Obsah ACSO vybraných odrůd česneku



Obr. 18: Sloupcový graf obsahů ACSO ve vybraných odrůdách česneku. Poskytnut byl jeden biologický replikát. (Chybové úsečky \pm SD, n =3)

biologickém replikátu. Taktéž vzorky vykazovaly větší variabilitu velikosti cibulí oproti komerčně zakoupeným. Výsledné hodnoty obsahů jsou uvedeny v grafu (viz obr. 18). Volba odrůd česneků byla založena na předchozí znalosti orientačních obsahů ACSO. Nižší zastoupení bylo předpokládáno u odrůd Anin, Havran a Lukan, vysoké zastoupení naopak u odrůd Dukát a Mojmír. Stanovené obsahy korespondují až na výjimku odrůdy Dukát. Pro zjištění zda se jedná o typický trend odrůdy, by bylo vhodné analyzovat více biologických replikátů.

4.3 Stanovení enzymové aktivity

Dalším z cílů práce bylo stanovení enzymové aktivity alliinasy v odrůdách česneku. Pro tento úkol byla adaptována metoda Miron *et al.*, 2002, která byla dodatečně modifikována pro potřeby práce.

Podle Michaelisových konstant substrátů se odvíjí koncentrace nutná pro stanovení aktivity a specifické aktivity. K_m alliinu se pohybuje v řádech jednotek $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Miron *et al.*, 2002). Koncentrace, jež jsou nutné pro měření, vyžadují minimálně desetinásobné hodnoty, což se odráží ve vysokých navážkách čistého standardu.

K dispozici nebylo dostatečné množství alliinu pro provedení všech experimentů. Práce se proto taktéž věnovala adaptaci metody na druhý substrát methiin.

4.3.1 Adaptace měření v malých objemech

Jedním ze způsobů jak předejít velkým spotřebám substrátů, bylo převedení analýzy na výrazně nižší objemy než 1 ml, jak uvádí výchozí publikace. Provedení bylo otestováno v objemech 100 μl a 2 μl . Měření ve 100 μl bylo provedeno na mikrotitrační desce, objem 2 μl byl nanášen na desku Take3 (adaptér spektrofotometrického readeru).

Optická dráha spektrofotometrického měření byla výrazně kratší, než při měření v kvetách. Proto byla zvýšena koncentrace 4-MP na $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při měření v objemu 100 μl a na $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při měření ve 2 μl . Tím došlo k posunu počáteční hodnoty absorbance z oblasti 0,2 do oblasti 0,6. Tento krok byl proveden jako opatření pro snížení chyby měření způsobené monochromátorem readeru.

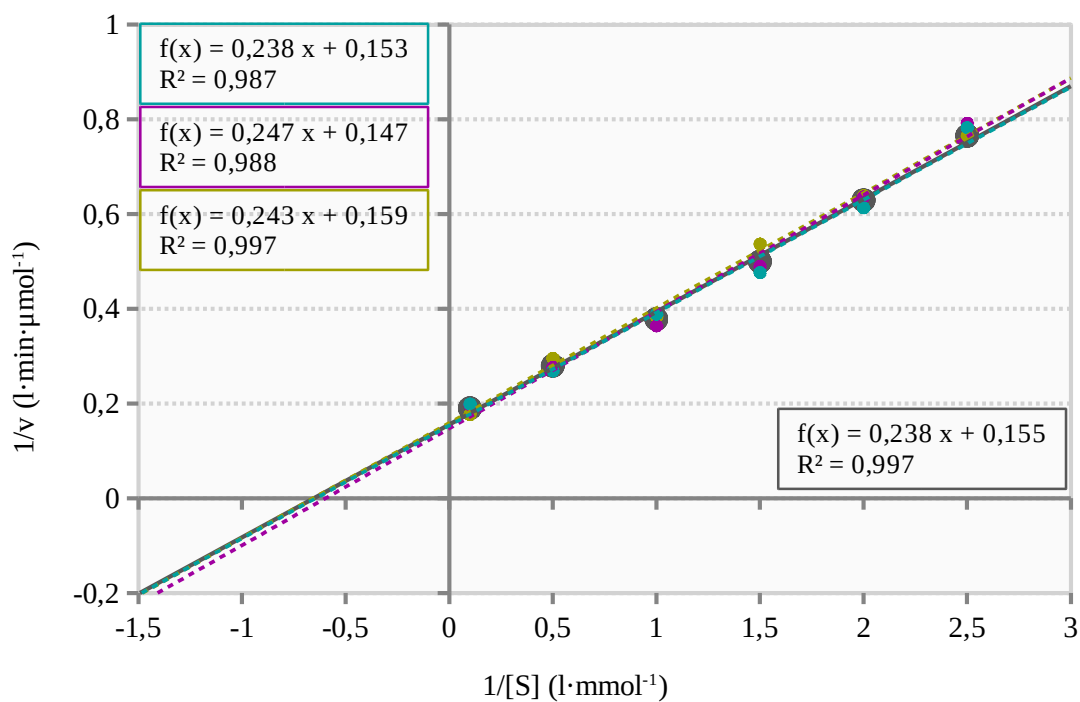
Velmi atraktivní se jevila možnost stanovení aktivity v minimálním objemu 2 μl , nicméně se měření potýkalo s řadou problému. Adaptování by muselo být věnováno výrazně více času. Měření aktivity v objemu 100 μl bylo bez větších potíží adaptováno s tím rozdílem, že před zahájením vlastního měření byly změřeny optické dráhy (900 a 980 nm) a před individuálním měřením byl obsah desky promíchán readerem.

4.3.2 Měření kinetiky alliinu

Jednou z možností ověření správnosti měření ve 100 μl bylo stanovení K_m pro substrát alliin. Alliinasa byla do reakční směsi přidána ve formě hrubého extraktu česneku (AHOLD a.s., země původu Španělsko, odrůda Morado). Měření bylo provedeno ve třech opakováních. Přestože byla koncentrační řada připravena pro vynesení dle Lineweaver a Burka (viz obr. 19), vyhodnocení bylo ještě provedeno vynesením podle Eadie a Hofsteeho (viz obr. 20). Druhé vynesení bylo zvoleno z důvodu náchylnosti vynesení Lineweavera a Burka k chybám při měření aktivity s nízkými koncentracemi substrátu. Vyneseny byly taktéž průměrné hodnoty počátečních rychlostí a získané hodnoty K_m a V_{lim} sloužily k sestrojení hyperbol, které byly dodatečně proloženy naměřenými počátečními rychlostmi (viz obr. 21).

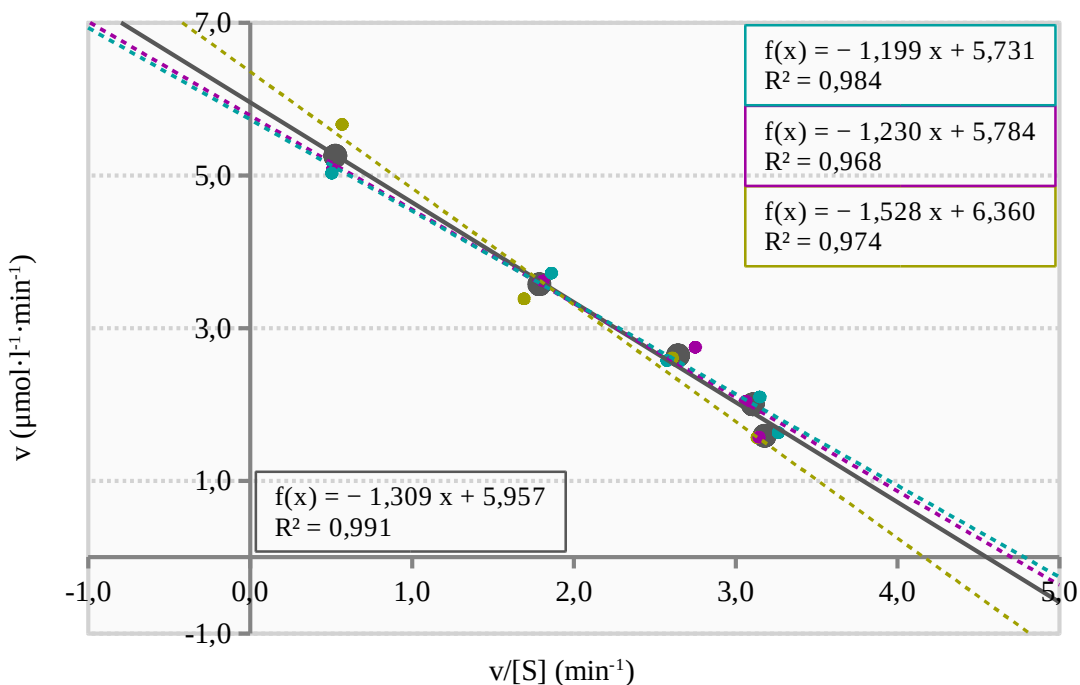
Vynesením Lineweavera a Burka byla získána hodnota K_m pro alliin $1,59 \pm 0,09 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Prostřednictvím vynesení Eadie a Hofsteeho byla získána hodnota $1,32 \pm 0,18 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. V druhém vynesení byly vynechány hodnoty měření při nejnižší koncentraci substrátu, jelikož pozice těchto bodů se nacházely nalevo od předchozích

Lineweaver-Burkovo vynesení kinetického měření alliinu



Obr. 19: Graf vynesení dle Lineweaver a Burka měření kinetiky alliinu. Měření ve třech opakováních (BAREVNĚ). Vyneseny byly taktěž reciproké hodnoty průměrných rychlostí (ŠEDĚ).

Eadie a Hofsteeho vynesení kinetického měření alliinu



Obr. 20: Eadie a Hofsteeho vynesení měření kinetiky alliinu. Měření ve třech opakováních vyznačeno BAREVNĚ. Vynesení průměrných rychlostí (ŠEDĚ) sloužilo pro sestavení hyperboly.

bodů a nikoli napravo, hodnoty $v/[S]$ dosahovaly nesmyslných nižších hodnot oproti předchozím.

Hyperboly byly sestrojeny podle následujícího vzorce:

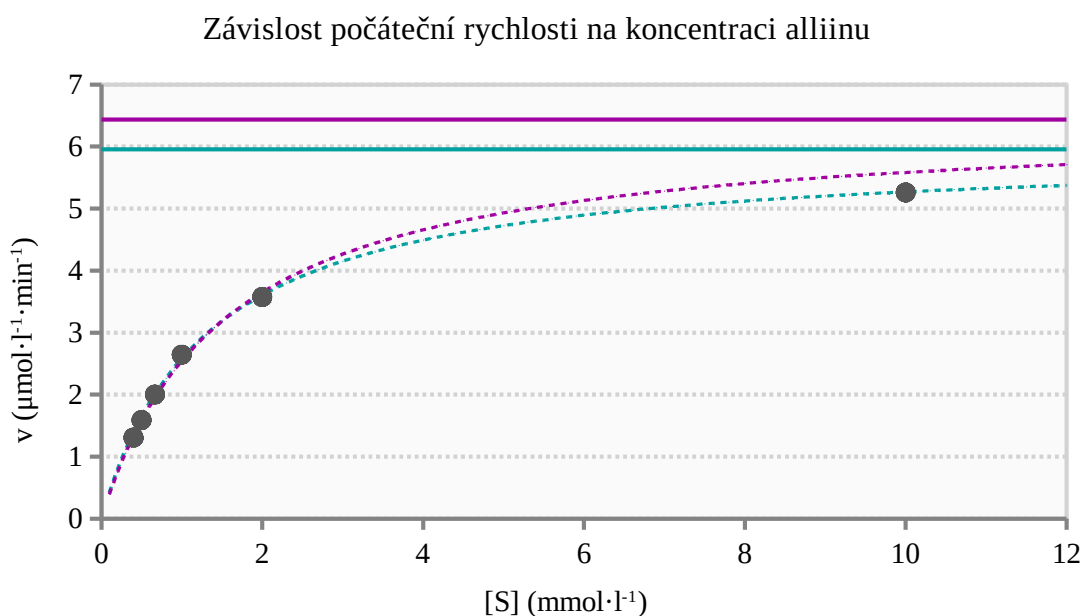
$$v' = \frac{[S] \cdot V_{\text{lim}}}{[S] + K_m}$$

Hyperbola sestřená podle hodnot vynesení Eadie a Hofsteeho lépe prokládá počáteční rychlosti při vyšších koncentracích substrátů a není tolik zatížena chybou jako vynesení Lineweaver a Burka.

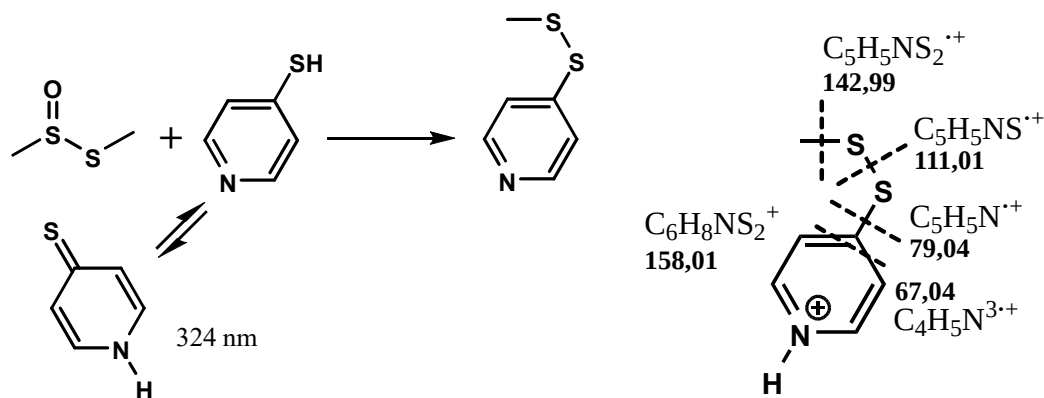
4.3.3 Produkt reakce dimethylthiosulfinátu s 4-merkaptopyridinem

Produkt reakce allieinu s 4-MP potvrzen byl (Miron *et al.*, 2002), produkt reakce 4-MP s dimethylthiosulfinátem (vznik přeměnou methiinu) prozatím nikoliv. Předpokládaný průběh reakce je zobrazen na obr. 22. Taktéž je vyobrazena fragmentace předpokládaného produktu.

Produkt reakce byl připraven ve vysoké koncentraci za pomoci částečně purifikované alliinasy. Směs byla chromatograficky separována a identita látky potvrzena tandemovou hmotnostní spektrometrií. Výsledky tohoto experimentu byly podpořeny

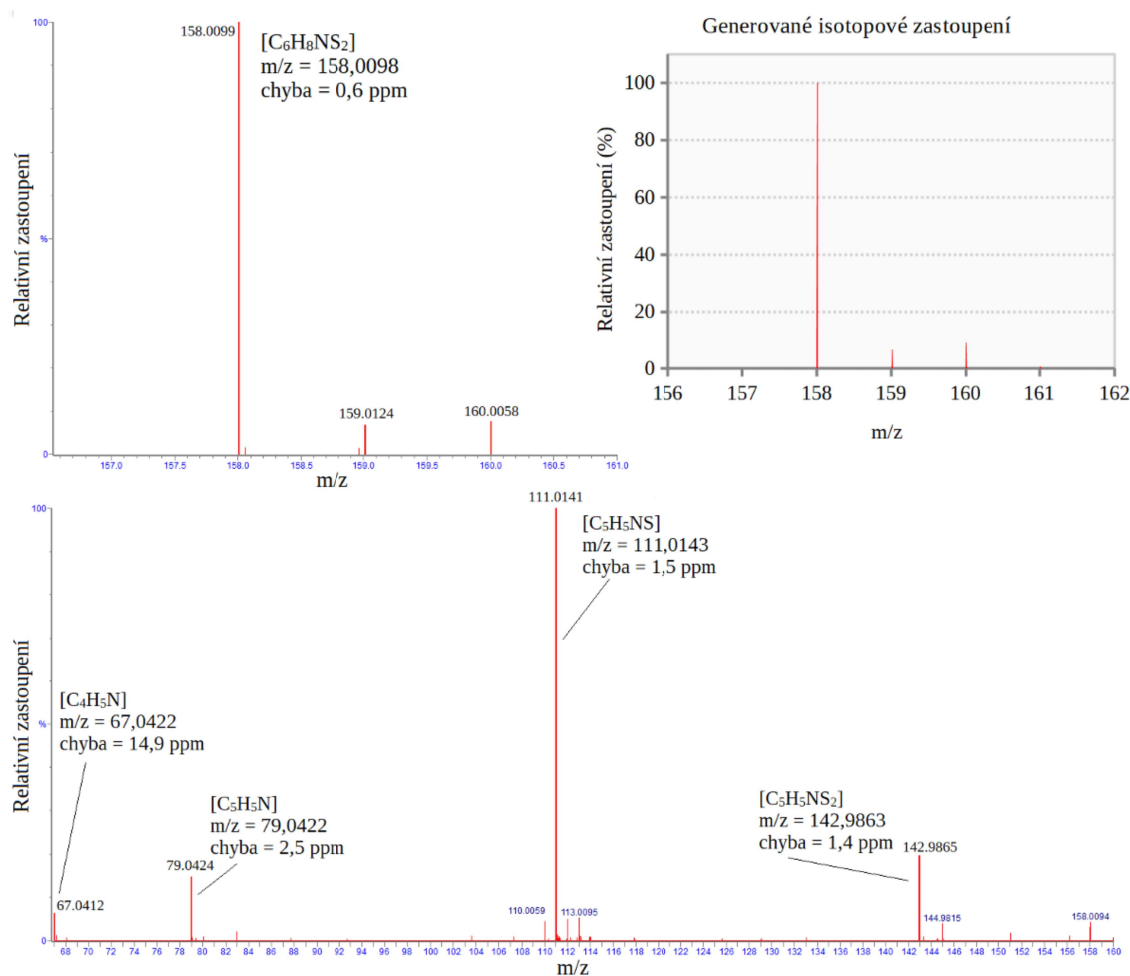


Obr. 21 Sestrojené hyperboly ze získaných hodnot z obou vynesení. Lineweaver a Burka FIALOVĚ; Eadie a Hofsteeho ZELEŇĚ. Plná čára znázorňuje V_{lim} . ŠEDĚ jsou znázorněny naměřené průměrné počáteční rychlosti reakce.



Obr. 22: Předpokládaná reakce produkovaného dimethylthiosulfinátu a fragmentace produktu reakce.

identickým experimentem při vysokém rozlišení. Hmotnostní spektrum a hmotnostní spektrum fragmentů je zobrazeno na obr. 23. Produkt reakce byl ionizován v pozitivním módu a poskytl signál při m/z 158,0099. Následně byla provedena jeho fragmentace.



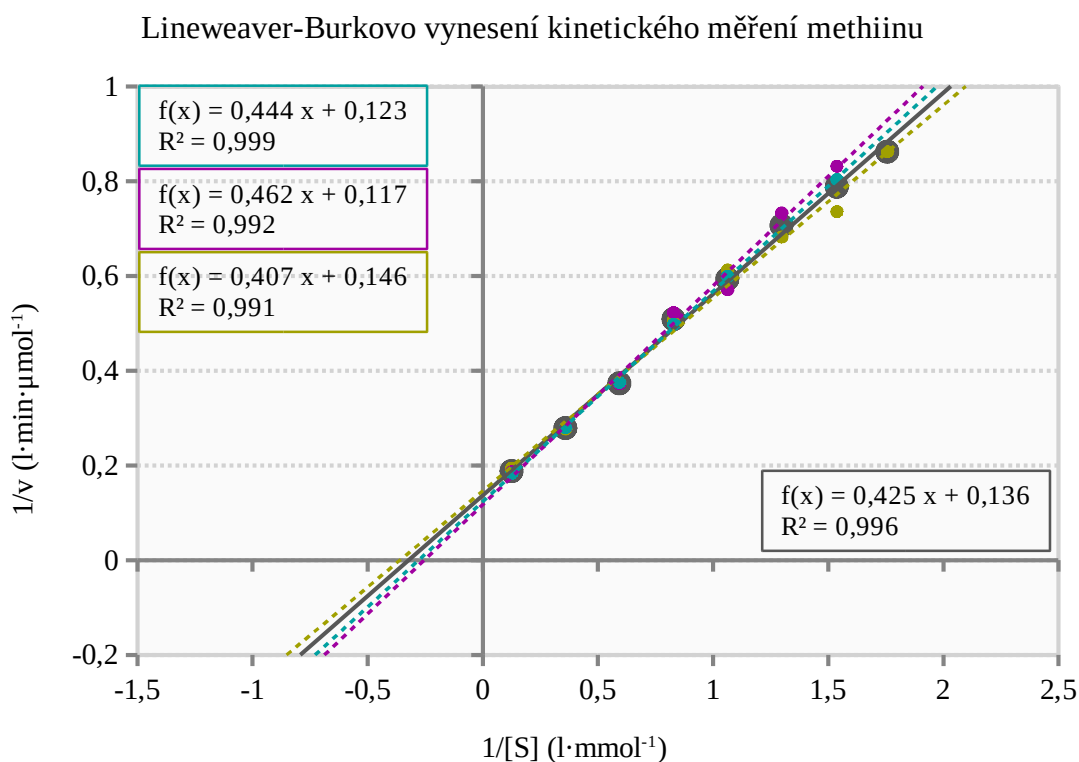
Obr. 23 Hmotnostní spektrum produktu reakce v porovnání s vygenerovaným spektrem online nástrojem. Spodní graf zobrazuje hmotnostní spektrum po fragmentaci.

Hodnota m/z fragmentů odpovídá těm uvedeným na obr. 22. Jako kontrola bylo sledováno absorpční spektrum produktu reakce a nebylo pozorováno žádné absorpční maximum při 324 nm. Takto byla potvrzena identita předpokládané látky.

4.3.4 Měření kinetiky methiinu

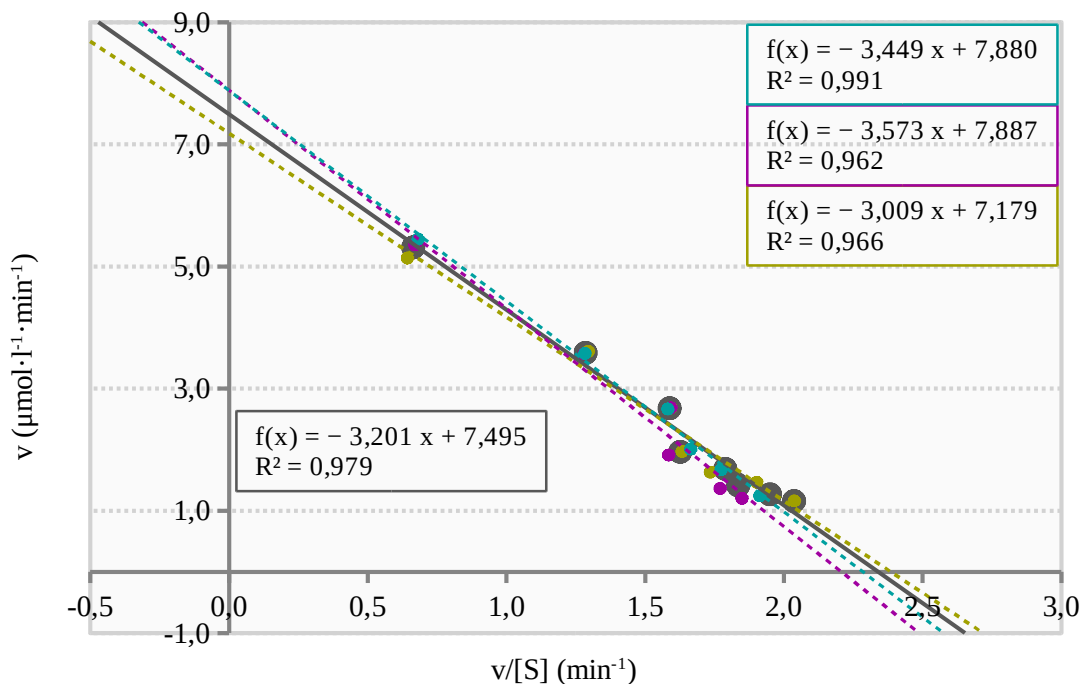
Měření kinetiky methiinu bylo provedeno stejným způsobem jako měření alliinu. Při prvních experimentech bylo měření provedeno ve stejných koncentracích, při kterých probíhalo měření alliinu, nicméně výsledky byly nepřesné. Proto byla sestavena nová koncentrační řada o více bodech a vyšších koncentracích. Měření bylo provedeno ve třech opakováních. Alliinasa byla do reakční směsi přidána ve formě hrubého extraktu česneku (AHOLD a.s., země původu Španělsko). Naměřené hodnoty počátečních rychlostí byly vyneseny opět podle vynesení Lineweaver a Burka a Edie a Hofsteeho. Vynesení průměrných rychlostí bylo provedeno pro získání hodnot K_m a V_{lim} , které byly využity pro sestrojení hyperbol.

Vynesením Lineweaver a Burka (viz obr. 24) byla získána hodnota K_m $3,49 \pm 0,60$ $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Z vynesení Edie a Hofsteeho (viz obr. 25) byla získána hodnota K_m



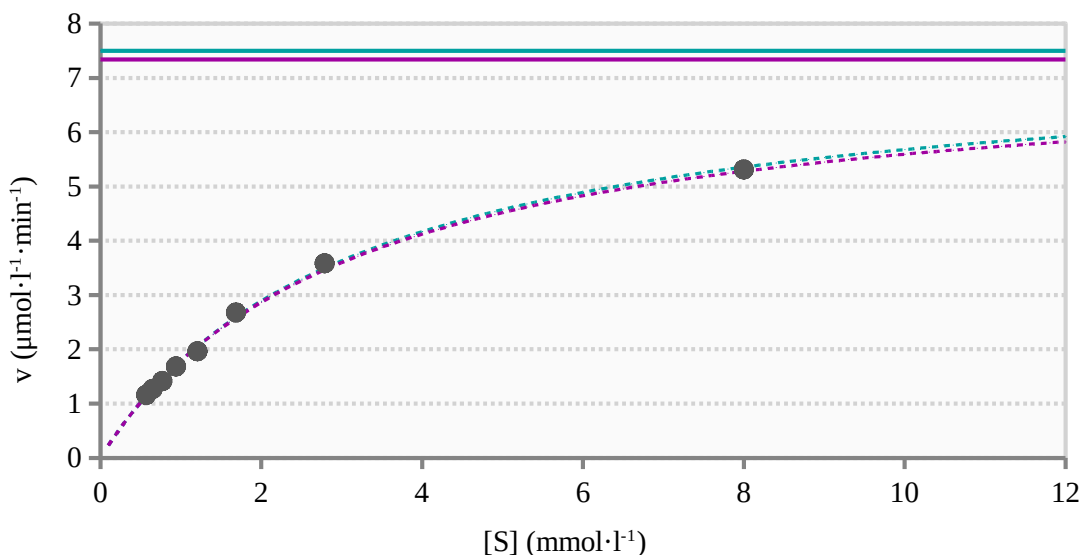
Obr. 24: Graf Lineweaver a Burkova vynesení měření kinetiky methiinu. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (BAREVNĚ). Vyneseny byly taktéž reciproké hodnoty průměrných rychlostí (ŠEDĚ).

Eadie a Hofsteeho vynesení kinetického měření methiinu



Obr. 25 Eadie a Hofsteeho vynesení měření kinetiky alliinu. Měření ve třech opakováních vyznačeno BAREVNĚ. Vynesení průměrných rychlostí (ŠEDĚ) sloužilo pro sestrojení hyperboly.

Závislost počáteční rychlosti na koncentraci methiinu



Obr. 26 Sestrojené hyperboly ze získaných hodnot z obou vynesení. Lineweaver a Burka FIALOVĚ; Eadie a Hofsteeho ZELENĚ. Plná čára znázorňuje V_{lim} . ŠEDĚ jsou znázorněny naměřené průměrné počáteční rychlosti reakce.

$3,43 \pm 0,30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Hyperboly (viz obr. 26) sestrojené z obou vynesení dostatečně reprezentují průběh reálných počátečních rychlostí. V tomto případě obě vynesení poskytují podobné výsledky. Na rozdíl od Edie a Hofsteeho vynesení měření alliinu nebyl vynechán žádný bod měření a i přes nižší korelační koeficient ($R^2 = 0,979$) poskytuje podobné výsledky jako vynesení Lineweaver a Burka.

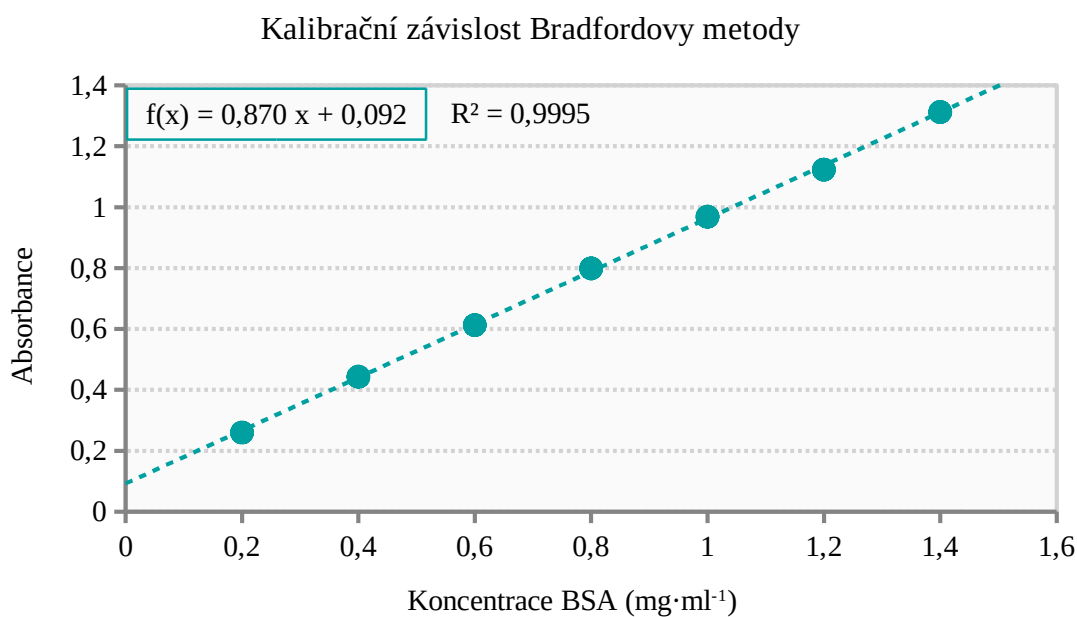
4.3.5 Celkové proteiny

Pro charakterizaci odrůd česneku aktivitou alliinasy bylo provedeno stanovení celkových proteinů, parametru nutného k získání specifické aktivity alliinasy. Pro tento účel byla aplikována Bradfordova metoda. Byla sestrojena kalibrační závislost (viz obr. 27) a vhodně naředěné hrubé extrakty česneku byly kvantifikovány.

Obsah proteinů v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ č. hm. byl ve vzorcích následující: Anin 15,1; Dukát 21,3; Havran 22,5; Lukan 20,3; Mojmír 18,8. Obsah proteinů vztažený na suchou hmotu stroužků byl následující (v $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$): Anin 40,2; Dukát 49,1; Havran 54,3; Lukan 53,2 a Mojmír 49,4.

4.3.6 Stanovení aktivity alliinasy ve vybraných odrůdách

Stanovení aktivity alliinasy bylo provedeno s oběma substráty. Koncentrace alliinu byla $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, koncentrace methiinu byla zvolena $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. I přes výrazné ředění



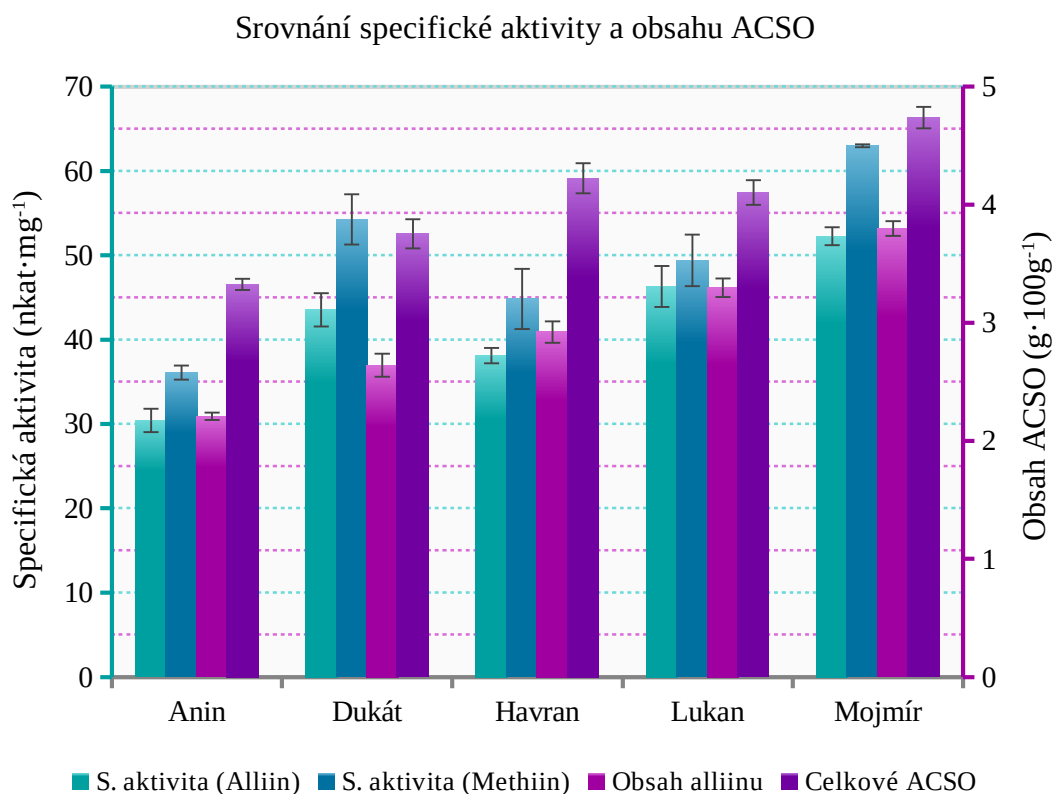
Obr. 27: Kalibrační závislost Bradfordovy metody. Standardem byl hovězí sérový albumin.

vzorků reakce probíhala velmi rychle, řádově v jednotkách minut. Proto byl průběh reakce zaznamenáván v krátkých časových intervalech a sledována počáteční rychlost reakce. Vzorky byly několikrát ředěny výsledný ředící faktor činí 2500. Nejprve byly ředěny pětkrát ošetřujícím roztokem 4-MP, následně stokrát fosfátovým pufrům pH 6,5 a závěrem pětkrát při zahájení enzymové reakce. Stanovené specifické aktivity alliinasy jsou zobrazeny na obr. 28. Vyobrazeny jsou hodnoty pro oba způsoby stanovení, a to s 10 mmol·l⁻¹ alliinem a 20 mmol·l⁻¹ methiinem.

V grafu je patrný trend narůstající specifické aktivity u odrůd s vyšším obsahem ACSO.

4.3.7 Aktivita alliinasy v dalších maticích

Stejně jako bylo stanovení ACSO ověřeno v dalších maticích, bylo provedeno stanovení aktivity v cibuli kuchynšské, zimní a šalotce i v póru zahradním (vše Tesco



Obr. 28: Specifická aktivita odrůd česneku v porovnání s jejich obsahem ACSO. ZELENÝMI barvami jsou zobrazeny získané hodnoty specifické aktivity (alliinem 10 mmol·l⁻¹ a methiin 20 mmol·l⁻¹). FIALOVÝMI barvami jsou do kontrastu uvedeny obsahy ACSO. Chybové úsečky odpovídají SD, n = 3.

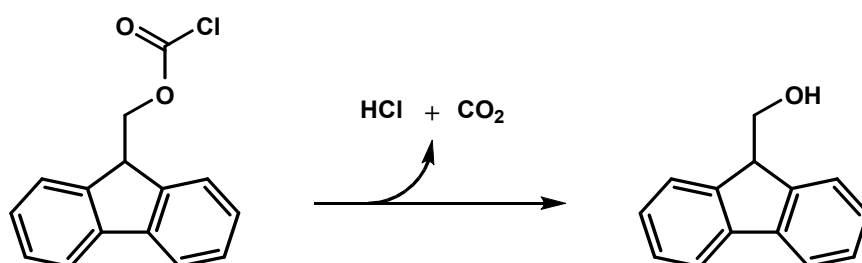
Stores ČR a.s.). Aktivita v hrubém extraktu však byla pozorována pouze u pažitky (pouze pilotní experiment) a póru. Specifická aktivita alliinasy v póru činila $0,17 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$. Ve vzorcích cibule nebyly pozorovány žádné změny absorbance ani při nejvyšší možné koncentraci hrubého extraktu (po ošetření 4-MP).

5 DISKUZE

Při volbě vhodného způsobu extrakce jsem vycházel z několika publikací (Kubec a Dadáková, 2008; Lundegardh *et al.*, 2008, Hrbek *et al.*, 2013). Ve všech těchto případech se pracovalo s čerstvou hmotou. Jednotlivé postupy jsem ověřil a adaptoval pro práci s lyofilizovaným materiálem. K samotné analýze ACSO byla převzata a modifikována metoda micelární elektrokinetické chromatografie publikované autory Kubec a Dadáková (2008).

První experimenty byly věnovány studiu stability derivatizačního činidla v roztoku, a přestože je rozpuštěno v aprotickém rozpouštědle, acetonitrilu, a bylo zjištěno, že dochází k jeho ztrátám (více jak 10 % za 24 h, při 4 °C). Clapp *et al.* (1998) uvádí, že ve vodném prostředí dochází k jeho hydrolýze a dekarboxylaci za vzniku 9-fluorenylmethanolu (viz obr. 29). Jedná se pravděpodobně o látku, která vytváří pík slepého vzorku v elektroferogramu. Vzhledem k nadbytku derivatizačního činidla, poskytuje produkt degradace široký pík. Proto je nutné vytřepání do hexanu. Migruje krátce po píku interního standardu a hrozí riziko nedostatečné separace těchto dvou látek.

Při kvantitativní analýze, pomocí separačních a elektromikračních metod je preciznost měření zajišťována použitím interního standardu. Od výchozí práce Kubec a Dadáková (2008) bylo významnou odlišností této diplomové práce použitím odlišného interního standardu. Ve výchozí práci zvolili interní standard S-(2-butyl)-L-cysteinsulfoxid, který však není komerčně dostupný. Na rozdíl od norleucinu, který je využit v této práci, je chemicky podobnější analyzovaným ACSO. Nicméně prodejci ACSO (Sigma-Aldrich, Abcam) uvádí stabilitu ve vodných roztocích při -20 °C pouze 24 h. Výhodou norleucinu je jeho nízká cena a stabilita ve vodných roztocích, proto mohl být připraven



Obr. 29: Hydrolýza a dekarboxylace derivatizačního činidla Fmoc za vzniku 9-fluorenylmethanolu ve vodném prostředí (adaptováno dle Clapp *et al.*, 1998).

jeho zásobní roztok. Migrační časy norleucinu jsou velmi podobné jako S-(2-butyl)-L-cysteinsulfoxidu. Autoři výchozí práce uvádí, že jejich interní standard je taktéž substrátem alliinasy a pokud je aktivní i během extrakce, tak dochází i ke katalýze přeměny interního standardu a tím i ke korekci výsledných hodnot. Avšak v této diplomové práci se nepředpokládá, že by byla alliinasa aktivní, jelikož je lyofilizovaný materiál extrahován do 90 % MeOH, který alliinasu denaturuje.

Tento fakt podpořil výsledek srovnání účinnosti inhibitorů. V literatuře jsou uvedeny odlišné přístupy k inhibici alliinasy. Lundegårdh *et al.*, (2008) a Hrbek *et al.* (2013) využili OCMHA, jež inhibuje PLP dependentní enzymy. Kubec a Dadáková (2008, 2009) využívají inhibice zvýšenou teplotou a snížením zdánlivého pH kyselinou chlorovodíkovou. Pro zachování jednoduchosti experimentu bylo od inhibice zvýšenou teplotou ustoupeno. V této diplomové práci byla využita kyselina mravenčí. Překvapivým výsledkem byla účinnější extrakce za použití kyseliny oproti OCMHA. Důvodem pravděpodobně nebyla účinnější inhibice enzymu. Jedním z možných vysvětlení je zlepšení rozpustnosti ACSO v MeOH během extrakce snížením zdánlivého pH směsi. Tyto látky jsou známé tím, že jejich rozpustnost v organických rozpouštědlech je nízká a rozpuštění obtížné.

Jedním z důvodů aplikace extrakce lyofilizovaného materiálu je minimalizace spotřeby rozpouštědel a chemikálií, především MeOH. Jelikož většina publikací uvádí extrakci ACSO z čerstvé hmoty a nikoliv z lyofilizovaného materiálu, bylo proto provedeno srovnání. Extrakce čerstvé hmoty dle Kubec a Dadáková (2008) probíhá v poměru 1:30 (w:v) a pro jediný vzorek vyžaduje spotřebu 300 ml MeOH. Hrbek *et al.* (2013) extrahovali čerstvý materiál v poměru 1:3. V této diplomové práci byl čerstvý materiál extrahován ve stejném poměru vztaheným na suchou hmotu (1:40; 1:14 vztaheno na čerstvou hmotu) a bylo prokázáno, že extrakce lyofilizované a čerstvé hmoty poskytují podobné výsledky (viz obr. 10).

Pokud fyzikálně chemické vlastnosti látek neumožňují použití konkrétní analytické techniky, je možné analyty upravit derivatizační reakcí. Kubec a Dadáková (2009) srovnali stabilitu několika derivatizačních činidel aminokyselin, v nichž bylo zahrnuto i činidlo FMOC. Nicméně v jejich experimentu byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě. Proto jsem dodatečně sledoval stabilitu vzorků při skladování v chladničce. Důvod byl velmi prostý, chladnička obecně poskytuje vhodnější podmínky

pro skladování předem připravených vzorků. Přestože při laboratorní teplotě nedochází k výrazné degradaci analytů mohou probíhat reakce, jež vedou ke zvýšení pozadí elektroferogramu. Tento jev byl v této diplomové práci pozorován a po dvou týdnech došlo k významnému nárůstu pozadí, který může vést k chybné integraci píků. Nízká preciznost měření neumožňuje sledovat stabilitu derivátů ACSO v prvních 10 dnech, z obr. 11 je však zřejmé, že po 30 dnech nedegradovalo více než 15 %.

Některé druhy rodu *Allium* produkují symetrické zásobní cibule, jako například cibule kuchyňská či pór zahradní a při přípravě vzorků mohou být symetricky děleny, čímž je výrazně sníženo množství materiálu nutného ke zpracování a stanovení ACSO. U česneku kuchyňského během vývoje dochází k rozdělení zásobní cibule na jednotlivé stroužky, jež narušují symetrii. Tato skutečnost byla důvodem pro experiment zjišťující jaké je minimální množství materiálu, které ještě dostatečně reprezentuje celou zásobní orgán. Výsledky naznačují, že rozptyl obsahů ACSO mezi jednotlivými zásobními cibulemi je menší než rozptyl obsahů ACSO ve stroužkách jedné zásobní cibule. Hledáním korelací mezi parametry obsahu ACSO, hmotností stroužků a obsahem sušiny se potvrdilo, že pro zvolení reprezentativního vzorku je vhodné zpracování celého orgánu, není vhodné použít jen jeho část (stroužek). Vysvětlení významné odlišnosti obsahu ACSO mezi stroužky je obtížné. K transportu ACSO pravděpodobně dochází i po vzniku stroužků, což může vést v závěru k nerovnoměrným obsahům. Nicméně k vysvětlení této problematiky žádná literatura nalezena nebyla.

Získané hodnoty obsahů ACSO ve vybraných plodinách rodu *Allium* se z větší části shodují s hodnotami udávanými v literatuře. Publikace (Kubec *et al.*, 2000; Kubec a Dadáková, 2008; Ovesná *et al.*, 2011) uvádí obsahy ACSO česneku řádově $10^3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ methiinu, $10^4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ alliinu a $1\text{-}2\cdot 10^3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ isoalliinu. Do těchto rozmezí spadají výsledky získané v této diplomové práci. Obsahy ACSO v póru se napříč pracemi řádově pohybují ve stejných oblastech, i poměry jednotlivých analytů jsou si podobné. Obsahy ACSO v pažitce stanovené v této práci se nejvíce přibližují výsledkům publikace Kubec a Dadáková, 2008. Nižší hodnoty mohou být způsobeny odlišnostmi zastoupení ACSO v závislosti na vegetačním stadiu rostliny. V práci Kubec *et al.* (2000) je viditelný významný rozdíl mezi obsahy ACSO ve dvou odrůdách cibule šalotky. Hodnoty uváděné ve všech pracích jsou si podobné řádově, poměrem analytů

i výslednými koncentracemi. Podobné výsledky byly zjištěny i u cibule kuchyňské (Kubec *et al.*, 2000).

Hodnoty obsahů odrůd česneku poskytnutých z genetických zdrojů jsou specifické nižším obsahem ACSO v porovnání s komerčně zakoupenými vzorky. Jedním z pravděpodobných důvodů je odlišnost účelu, pro který jsou pěstovány. Vzorky poskytnuté z genetických zdrojů se odlišovaly velikostí mnohem více, než zakoupené. Jedním z důležitých parametrů pro spotřebitele je ostrost a aroma zakoupeného česneku. To je zajištěno sirnými látkami, jejichž obsah lze výrazně podpořit hnojením s důrazem na vyšší obsah síry a vhodnými environmentálními podmínkami.

Proto, aby mohly být odrůdy česneku charakterizovány i z pohledu aktivity alliinasy, byla adaptována a upravena metoda Miron *et al.* (2002). Dříve používaná metoda byla postavena na spřažené reakci alliinasy s laktátdehydrogenasou (Schwimmer a Mazelis, 1962). Nespornou výhodou metody Miron *et al.* (2002) je menší počet chemikálií nutných ke stanovení enzymatické aktivity alliinasy. Ačkoliv autoři nezmiňují veškeré výhody oproti předchozí metodě, je velmi podstatné, že činidlo reaguje přímo s thiosulfináty a měření není postaveno na produkci pyruvátu. Proto je umožněno měření v hrubém extraktu česneku a jiných plodin. Pyruvát je substrátem řady enzymů a taktéž je přítomen v pletivech ve vysokých hladinách, proto je nutné dvojí stanovení – aktivity alliinasy a koncentrace endogenního pyruvátu. Přímou reakcí thiosulfinátů s 4-MP je zamezeno nežádoucím reakcím thiosulfinátů s volnými thioley a nedochází proto ani k reakci se samotnou alliinasou a její potenciální inhibicí. Proto se nová metoda jeví jako vhodnější.

Dalším dílčím cílem bylo převedení stanovení enzymatické aktivity alliinasy do malého objemu, tak aby byla snížena na minimum spotřeba nákladného substrátu. Deska Take3 pomocí readeru umožňuje měření absorbance v objemu 2 μl . Nicméně měření enzymatické aktivity alliinasy v tomto objemu úspěšné nebylo. I přes zdařilou adaptaci tohoto uspořádání by reprodukovatelnost výsledků s vysokou pravděpodobností zůstala nízká. Problémy spočívaly v mnoha komplikacích. Před samotným zahájením enzymatické reakce je problematické zacházení s nízkými objemy kapalin. Pipetování velmi nízkých objemů koncentrovaných roztoků proteinu v přesných poměrech je náročné. Dalším z problémů je rychlé vypařování malých kapek, které se projevilo razantním nárůstem absorbance blanku (zakoncentrování

čínidla 4-MP). Rychlost odpařování navíc není identická pro každou pozici desky, na krajních pozicích probíhalo odpařování intenzivněji. Během enzymatické reakce vstupují další komplikace. Jednou z nich je teplota, která je těžce udržitelná a reakce prakticky běží při teplotě, kterou má deska samotná. Z tohoto hlediska je pravděpodobně nutné temperování na přednastavenou teplotu. Komplikaci taktéž způsobuje nemožnost pravidelného promísení a je nutné provést měření v krátkém čase.

Zmenšení reakce do objemu 100 μl (v mikrotitrační desce) bylo provedeno bez větších obtíží. V tomto uspořádání byla provedena série měření kinetiky alliinu a methiinu. Vzhledem k tomu, že vynesení Lineweaver a Burka vyžaduje vysokou přesnost získaných počátečních rychlostí, byly hodnoty vyneseny i podle Eadie a Hofsteeho. Miron *et al.* (1998, 2002) uvádí K_m alliinu $1,9\pm 0,8$ a $1,93\pm 1,1$ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. K_m stanovené v této diplomové práci ($1,32\pm 0,18$ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) spadá do širokých intervalů zjištěných v publikacích autorů. Hodnota K_m v této práci uvádí výrazně nižší směrodatnou odchylku, jelikož stanovení K_m byla věnována pozornost a měření bylo několikrát opakováno. Za výslednou hodnotu je považována ta, jež byla získána z vynesení Eadie a Hofsteeho. Hyperbola sestavená podle parametrů tohoto vynesení mnohem lépe reprezentuje počáteční rychlosti měřené při vysokých koncentracích substrátu. Výsledná hodnota K_m methiinu je podobná z obou vynesení. Avšak vyšší hodnota K_m methiinu vyžaduje jeho vyšší koncentraci při měření specifické aktivity. Minimální koncentrace substrátů by měly zpravidla být desetinásobné pro dostatečnou saturaci enzymu. V případě alliinu je to více jak 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, nicméně problémem jsou vysoké navážky drahého standardu. Pro stanovení aktivity prostřednictvím methiinu byla zvolena koncentrace 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, přestože se nejedná o desetinásobnou koncentraci oproti K_m methiinu ($3,49\pm 0,60$ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $3,43\pm 0,30$ $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Vyšší koncentrace vyžadují příliš vysoké navážky substrátu. I při této koncentraci se počáteční rychlosti výrazně přibližují rychlosti limitní (86,2-86,5 % limitní rychlosti, při 30 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 90,4-90,6 %).

Vzhledem k tomu, že produkt (4-(methylthio)pyridin) reakce dimethylthiosulfinátu (vznikající přeměnou methiinu) s 4-MP nebyl doposud potvrzen, byl sestaven experiment pro jeho identifikaci. Předpokládaný produkt reakce byl identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Produkt po chromatografické separaci poskytl signál při m/z 158,0099 (s chybou pod 1 ppm) což odpovídá aduktu

s protonem. Isotopické spektrum (signály při m/z 159 a 160) odpovídá spektru vygenerovanému softwarovým nástrojem. Vysoké zastoupení těchto isotopů je zapříčiněno vysokým zastoupením hmotnějších stabilních isotopů síry. Isotopové zastoupení síry je následující: S^{32} (94,93 %), S^{33} (0,76 %), S^{34} (4,29 %), S^{36} (0,02 %) (Audi *et al.*, 2003). Z výsledků měření vyplývá, že při fotometrickém měření aktivity alliinasy je pokles absorbance dán přítomností vznikajícího dimethylthiosulfinátu.

Specifická aktivita alliinasy se napříč odrůdami česneku významně lišila. Pozorován byl podobný trend jako v případě obsahu ACSO. Je patrné, že odrůda s nejvyšším obsahem ACSO – Mojmír je zároveň odrůdou s nejvyšší specifickou aktivitou alliinasy. Stupňovitý trend narušuje pouze odrůda Dukát, ve které byla stanovena vysoká aktivita alliinasy, ale nižší obsah ACSO. To může být způsobeno nesprávným stanovením ACSO. Vzácně dochází během lyofilizace k degradaci ACSO alliinasy, což se projevuje tvorbou oranžového oleje. Nicméně ztráty v takových případech nejsou významné (data neuvedena). Dalším faktem je, že charakterizace byla provedena pouze na jediném biologickém replikátu, jelikož se jednalo o vzácný biologický materiál. Nicméně přes tuto jednu výjimku je pozorována silná korelace mezi obsahem ACSO a aktivitou alliinasy.

Jedná se o první práci srovnávající obsah ACSO a aktivitu alliinasy v odrůdách česneku zároveň. Pro některé aplikace je vhodné vysoké zastoupení enzymu (například farmaceutické přípravky). Na základě těchto výsledků výše uvedeným účelům více vyhovují odrůdy s vysokou aktivitou alliinasy – Mojmír, Dukát. Pokud je zároveň požadovaným parametrem vysoký obsah ACSO, je vhodná volba odrůdy Mojmír. Pro charakterizaci většího počtu odrůd by bylo nutné získání většího počtu biologických replikátů i zajištění dostatečného množství substrátu vlastní syntézou.

Adaptaci metody stanovení aktivity alliinasy v dalších maticích nebylo věnováno příliš pozornosti. V případě cibule dokonce nebyla měřitelná aktivita enzymu.

6 ZÁVĚR

Prvním cílem práce bylo podání informací o sirných látkách vyskytujících se v česneku a příbuzných druzích. Byly uvedeny informace jak o zásobních látkách, tak i o látkách vznikajících po přeměně enzymem alliinasou. Část teoretické práce je věnována vzniku a biosyntetické dráze zásobních látek. Zahrnuty jsou i informace o alliinase, biologických účincích zásobních i nově vznikajících těkavých látek. Byly popsány metody stanovení sirných látek i metody stanovení aktivity alliinasy.

Byla adaptována a optimalizována metoda stanovení S-alk(en)ylcysteinsulfoxidů micelární elektrokinetickou chromatografií. Velký důraz byl kladen na minimalizaci experimentálního měřítka a snížení provozních nákladů. Vybrané odrůdy česneku byly charakterizovány z pohledu obsahu ACSO. Obsah celkových ACSO byl nejvyšší v odrůdě Mojmír, následovaly odrůdy Havran, Lukan, Dukát a Anin s obsahy v suché hmotě $4,73 \pm 0,39$; $4,22 \pm 0,77$; $4,10 \pm 0,35$; $3,75 \pm 0,52$; $3,32 \pm 0,54$ g·100g⁻¹. Metodou byly analyzovány další matrice, a to cibule kuchyňská, cibule zimní, cibule šalotka, pór zahradní a pažitka pravá s obsahy celkových ACSO v suché hmotě $0,84 \pm 0,01$; $1,00 \pm 0,01$; $0,60 \pm 0,07$; $0,50 \pm 0,01$, $1,45 \pm 0,08$ g·100g⁻¹.

Taktéž bylo provedeno stanovení enzymové aktivity alliinasy. Identita derivátu produktu přeměny methiinu alliinasou byla potvrzena hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením. Hodnoty K_m alliinu a methiinu byly stanoveny a porovnány s literaturou. Dále bylo zjištěno, že v odrůdě Mojmír byla nejvyšší specifická aktivita alliinasy v hrubém extraktu $52,23 \pm 1,06$ nkat·mg⁻¹. Následovaly odrůdy Lukan, Dukát, Havran a Anin se specifickými aktivitami $46,28 \pm 2,42$; $43,53 \pm 1,97$; $38,09 \pm 0,91$; $30,39 \pm 1,38$ nkat·mg⁻¹. Vyšší aktivita alliinasy byla naměřena u odrůd s vyšším obsahem ACSO. Tyto odrůdy jsou vhodnější pro aplikace vyžadující vysoké zastoupení ACSO i aktivity enzymu. Může se například jednat o výrobu česnekových doplňků stravy.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- The Angiosperm Phylogeny Group (2009): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**, 105-121.
- Amagase H., Petesch B. L., Matsuura H., Kasuga S. a Itakura Y. (2001): Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition* **131**, 955S-962S.
- Ariga T. a Seki T. (2006): Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: A review. *Biofactors* **26**, 93-103.
- Arnault I., Christidès J. P., Mandon N., Haffner T., Kahane R. a Auger J. (2003): High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *Journal of Chromatography A* **991**, 69-75.
- Audi G., Bersillon O., Blachot J. a Wapstra A.H. (2003): The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties. *Nuclear Physics A* **729**, 3-128.
- Aviello G., Abenavoli L., Borelli F., Capasso R., Izzo A. A., Lembo F., Romano B. a Capasso F. (2009): Garlic: Empiricism or Science? *Natural Product Communications* **4**, 1-12.
- Bae S. E., Cho S. Y., Won Y. D., Lee S. H. a Park H. J. (2014): Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment. *LWT - Food Science and Technology* **55**, 397-402.
- Baker D. R. (1995): *Capillary Electrophoresis*. John Wiley and Sons, New York, USA, 244 stran.
- Baumgartner S., Dax T. G., Praznik W. a Falk H. (2000): Characterisation of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.). *Carbohydrate Research* **328**, 177-183.
- Bautista D. M., Movahed P., Hinman A., Axelsson H. E., Sterner O., Högestätt E. D., Julius D., Jordt S.-E. a Zygmund P. M. (2005): Pungent products from garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proceedings on the National Academy of Sciences* **102**, 12248-12252.
- Block E. (1992): The Organosulfur Chemistry of the Genus *Allium* – Implications for the Organic Chemistry of Sulfur. *Angewandte Chemie International Edition* **31**, 1135-1178.
- Block E. (2010): *Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Spojené království, 434 stran.
- Bloem E., Haneklaus S. a Schnug E. (2004): Influence of Nitrogen and Sulfur Fertilization on the Alliin Content of Onions and Garlic. *Journal of Plant Nutrition* **27**, 1827-1839.
- Bloem E., Haneklaus S. a Schnug E. (2010): Influence of Fertilizer Practices on S-Containing Metabolites in Garlic (*Allium sativum* L.) under Field Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 10690-10696.
- Borlinghaus J., Albrecht F., Gruhlke M., Nwachukwu I. a Slusarenko A. (2014): Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules* **19**, 12591-12618.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248-254.
- Cavallito C. J. a Bailey J. H. (1944): Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of the American Chemical Society* **66**, 1950-1951.

- Clapp C. H., Swan J. S. a Poechmann J. L. (1992): Identification of amino acids in unknown dipeptides: A derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and HPLC. *Journal of Chemical Education* **69**, A122-A126.
- Colín-González A. L., Santana R. A., Silva-Islas C. A., Chánez-Cárdenas M. E., Santamaría A. a Maldonado P. D. (2012): The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract-and S-allylcysteine-induced protection. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2012**.
- Cutler R. R. a Wilson P. (2004): Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science* **61**, 71-74.
- Dam T. K., Bachhawat K., Rani G. a Surolia A. (1998): Garlic (*Allium sativum*) Lectins Bind to High Mannose Oligosaccharide Chains. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 5528-5535.
- Eady C. C., Kamoi T., Kato M., Porter N. G., Davis S., Shaw M., Kamoi A. a Imai S. (2008): Silencing Onion Lachrymatory Factor Synthase Causes a Significant Change in the Sulfur Secondary Metabolite Profile. *Plant Physiology* **147**, 2096-2106.
- Ellmore G. S. a Feldberg R. S. (1994): Alliin lyase localization in bundle sheaths of the garlic clove (*Allium sativum*). *American Journal of Botany* **81**, 89-94.
- EnviPat:Isotope pattern calculator; dostupné online z <https://www.envipat.eawag.ch>, (cit. 15.4.2019)
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division): dostupné online <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, (cit. 7.1.2019.)
- Frazier R. A., Ames J. M. a Nursten H. E. (2007): *Capillary electrophoresis for food analysis: Method development*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Spojené Království, 118 stran.
- Gao C., Jiang X., Wang H., Zhao Z. a Wang W. (2013): Drug metabolism and pharmacokinetics of organosulfur compounds from garlic. *Journal of Drug Metabolism and Toxicology* **4**, 1-10.
- Gruhlke M. C. H., Antelmann H., Bernhardt J., Kloubert V., Rink L. a Slusarenko A. J. (2019): The human allicin-proteome: S-thioallylation of proteins by the garlic defence substance allicin and its biological effects. *Free Radical Biology and Medicine* **131**, 144-153.
- He T., Chambers M. I. A Musah R. A. (2018): Application of Direct Analysis in Real Time-High Resolution Mass Spectrometry to Investigations of Induced Plant Chemical Defense Mechanisms-Revelation of Negative Feedback Inhibition of an Alliinase. *Analytical Chemistry* **90**, 12802-12809.
- Hell R., Jost R., Berkowitz O. a Wirtz M. (2002): Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* **22**, 245-257.
- Hildebrandt T. M., Nesi A. N., Araújo W. L. a Braun H.-P. (2015): Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant* **8**, 1563-1579.
- Horie H. a Yamashita K. I. (2006): Non-derivatized analysis of methiin and alliin in vegetables by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1132**, 337-339.
- Horn T., Bettray W., Slusarenko A. a Gruhlke M. (2018): S-allylmercaptogluthathione Is a Substrate for Glutathione Reductase (EC 1.8. 1.7) from Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Antioxidants* **7**, 86.

- Hrbek V., Vodrážka P., Cajka T., Ovesná J. a Hajšlová J. (2013): Český česnek: Charakterizace, kvalita a autenticita česneku. In: *Sborník Příspěvků XLIII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin* (Cejpek K. a Špicner J., eds.), Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, Česko, 12-15.
- Hýbl M., Kopecký P., Doležalová I., Petrželová I., Smékalová K., Dušková E., Stavělíková H. a Dušek K. (2016): *Semena a plody vybraných druhů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin. 1. část – zeleniny.* (Hýbl M., Doležalová I., Petrželová I., Smékalová K., Kopecký P., eds.), Agriprint, s.r.o., Olomouc, Česko.
- Choi I. S., Cha H. S. a Lee Y. S. (2014): Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules* **19**, 16811-16823.
- Ichikawa M., Ide N. a Ono K. (2006): Changes in Organosulfur Compounds in Garlic Cloves during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4849-4854.
- Imai S., Tsuge N., Tomotake M., Nagatome Y., Sawada H., Nagata T a Kumagai H. (2002): An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature* **419**, 685.
- Jones G. J., Hughes J., Tregova A., Milne J., Tomsett A. B., a Collin H. A. (2004): Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany* **55**, 1903-1918.
- Jones M. G., Collin H. A., Tregova A., Trueman L., Brown L., Cosstick R., Hughes J., Milne J., Wilkinson M. C., Tomesett A. B. a Thomas B. (2007): The Biochemical and Physiological Genesis of Alliin in Garlic. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* **1**, 21-24.
- Kamata Y., Aoyagi M., Sawada Y., Nakabayashi R., Hirai M. Y., Saito K. a Imai S. (2016): Changes in *trans*-S-1-propenyl-L-cysteine Sulfoxide and Related Sulfur-Containing Amino Acids during Onion Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**, 9063-9071.
- Kodera Y., Suzuki A., Imada O., Kasuga S., Sumioka I., Kanezawa A., Taru N., Fujikawa M., Nagae S., Masamoto K., Maeshige K. a Ono K. (2002): Physical, Chemical and Biological Properties of S-Allylcysteine, an Amino Acid Derived from Garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 622-632.
- Krest I., Glodek J. a Keusgen M. (2000): Cysteine Sulfoxides and Alliinase Activity of Some Allium Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 3753-3760.
- Kubec R., Svobodová M. a Velíšek J. (2000): Distribution of S-Alk(en)ylcysteine Sulfoxides in Some Allium Species. Identification of a New Flavor Precursor: S-Ethylcysteine Sulfoxide (Ethiin). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **48**, 428-433.
- Kubec R., Kim S., McKeon D. M. a Musah R. A. (2002): Isolation of S-*n*-butylcysteine Sulfoxide and Six *n*-butyl-containing Thiosulfinates from *Allium siculum*. *Journal of Natural Products* **65**, 960-964.
- Kubec R., Hrbáčová M., Musah R. A. a Velíšek J. (2004): *Allium* discoloration: precursors involved in onion pinking and garlic greening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 5089-5094.
- Kubec R. a Dadáková E. (2008): Quantitative determination of S-alk(en)ylcysteine-S-oxides by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A* **1212**, 154-157.
- Kubec R. a Dadáková E. (2009): Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives—A comparative study. *Journal of Chromatography A* **1216**, 6957-6963.

- Kubec R., Cody R. B., Dane A. J., Musah R. A., Schraml J., Vattekatte A. a Block E. (2010): Application of Direct Analysis in Real Time-Mass Spectrometry (DART-MS) in Allium Chemistry. (Z)-Butanethial S-Oxide and 1-Butenyl Thiosulfinates and Their S-(E)-1-Butenylcysteine S-Oxide Precursor from *Allium sicutum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 1121-1128.
- Kuettner E. B., Hilgenfeld R. a Weiss M. S. (2002): The active principle of garlic at atomic resolution. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 46402-46407.
- Lancaster J. E. a Shaw M. L. (1989): γ -Glutamyl Peptides in the Biosynthesis of S-Alk(en)yl-L-Cysteine Sulfoxides (Flavour Precursors) in *Allium*. *Phytochemistry* **28**, 455-460.
- Lancaster J. E., Shaw M. L., Pither Joyce M. D., McCallum J. A. A McManus M. T. (2000): A Novel Alliinase from Onion Roots. Biochemical Characterization and cDNA Cloning. *Plant Physiology* **122**, 1269-1279.
- Lanzotti V. (2006): The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A* **1112**, 3-22.
- Lanzotti V., Scala F. a Bonanomi G. (2014): Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews* **13**, 769-791.
- Lawson L. a Hunsaker S. (2018): Allicin bioavailability and bioequivalence from garlic supplements and garlic foods. *Nutrients* **10**, 812.
- Lundegårdh B., Botek P., Schulzová V., Hajšlová J., Strömberg A. a Andersson H. C. (2008): Impact of Different Green Manures on the Content of S-Alk(en)yl-L-cysteine Sulfoxides and L-Ascorbic Acid in Leek (*Allium porrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 2102-2111.
- Manabe T., Hasumi A., Sugiyama M., Yamazaki M. a Satio K. (1998): Alliinase [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive) – Purification, localization, cDNA cloning and heterologous functional expression. *European Journal of Biochemistry* **257**, 21-30.
- Matsuura H. (2001): Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutrition* **131**, 1000S-1005S.
- Miean K. H. a Mohamed S. (2001): Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 3106-3112.
- Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Weiner L. a Wilchek M. (1998): A spectrophotometric assay for allicin and alliinase (Alliin lyase) activity: reaction of 2-nitro-5-thiobenzoate with thiosulfinates. *Analytical biochemistry* **265**, 317-325.
- Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Wilchek M. a Weiner L. (2000): The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* **1463**, 20-30.
- Miron T., Shin I., Feigenblat G., Weiner L., Mirelman D., Wilchek M. a Rabinkov A. (2002): A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. *Analytical biochemistry* **307**, 76-83.
- Nelson C. J. a Spollen W. G. (1987): Fructans. *Physiologia Plantarum* **71**, 512-516.
- Nohara T., Fujiwara Y., Ikeda T., Murakami K., Ono M., Nakano D. a Kinjo J. (2013): Cyclic Sulfoxides Garlicnins B₂, B₃, B₄, C₂, and C₃ from *Allium sativum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **61**, 695-699.

- Nohara T., Fujiwara Y., Ikeda T., Yamaguchi K., Manabe H., Muramaki K., Ono M., Nakano D. a Kinjo J. (2014): Acyclic Sulfides, Garlicnins L-1 – L-4, E, and F, from *Allium sativum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **62**, 477-482.
- Nohara T., Fujiwara Y., Komota Y., Kondo Y., Saku T., Yamaguchi K., Komohara Y. a Takeya M. (2015): Cyclic Sulfoxides-Garlicnins K₁, K₂, and H₁-Extracted from *Allium sativum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **63**, 117-121.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1979): Units of Enzyme Activity Recommendations 1978. *European Journal of Biochemistry* **97**, 319-320.
- Ovesná J., Kučera L., Králová J., Leišová L., Stavělíková H. a Velíšek J. (2007): Genetic diversity among garlic clones as revealed by AFLP, phenotypic descriptors and S-amino acids level. *Vegetable Crops Research Bulletin* **66**, 105-116.
- Ovesná J., Kučera L., Horníčková J., Svobodová L., Stavělíková H., Velíšek J. a Milella L. (2011): Diversity of S-alk(en)yl cysteine sulphoxide content within a collection of garlic (*Allium sativum* L.) and its association with the morphological and genetic background assessed by AFLP. *Scientia horticulurae* **129**, 541-547.
- Peshev D. a Van den Ende W. (2014): Fructans: prebiotics and immunomodulators. *Journal of Functional Foods* **8**, 348-357.
- Poole L. B. (2015): The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology and Medicine* **80**, 148-157.
- Ramirez D. A., Locatelli D. A., Gonzalez R. E., Cavagnaro P. F. a Camargo A. B. (2017): Analytical methods for bioactive sulfur compounds in *Allium*: An integrated review and future directions. *Journal of Food Composition and Analysis* **61**, 4-19.
- Reiter J., Levina N., van der Linden M., Gruhlke M., Martin C. a Slusarenko A. (2017): Diallylthiosulfinate (allicin), a volatile antimicrobial from garlic (*Allium sativum*), kills human lung pathogenic bacteria, including MDR strains, as a vapor. *Molecules* **22**, 1711.
- Rose P., Whiteman M., Moore P. K. a Zhu, Y. Z. (2005): Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Natural Product Reports* **22**, 351-368.
- Salazar H., Llorente I., Jara-Oseguera A., García-Villegas R., Munari M., Gordon S. E., Islas L. D. a Rosenbaum T. (2008): A single N-terminal cysteine in TRPV1 determines activation by pungent compounds from onion and garlic. *Nature Neuroscience* **11**, 255-261.
- Saravanan G., Ponmurugan P., Kumar G. S. a Rajarajan T. (2010): Antidiabetic effect of S-allylcysteine: Effect on plasma and tissue glycoproteins in experimental diabetes. *Phytomedicine* **17**, 1086-1089.
- Shao S. L., Zhang W. W., Li X. Y., Yun D. Z. a Zhang Y. (2012): The study of apoptosis induced by allicin in HT-9/HL-60 and its transfection cell. *Advanced Materials Research* **340**, 409-415.
- Shimon L. J. W., Rabinkov A., Shin I., Miron T., Mirelman D., Wilchek M. a Frolow F. (2007): Two Structures of Alliinase from *Allium sativum* L.: Apo Form and Ternary Complex with Aminoacrylate Reaction Intermediate Covalently Bound to the PLP Cofactor. *Journal of Molecular Biology* **366**, 611-625.
- Shin I., Mirelman D., Weiner L., Villar E., Shnyrov V. L. a Rabinkov A. (2018): Stabilization of Alliinase from Garlic by Osmolytes and Mannose-Specific Lectin ASAI. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **6**, 437-447.

- Shouk R., Abdou A., Shetty K., Sarkar D. A Eid A. H. (2014): Mechanisms underlying the antihypertensive effects of garlic bioactives. *Nutrition Research* **34**, 106-115.
- Scheffler L., Sauermann Y., Heinlein A., Sharapa C. a Buettner A. (2016): Detection of volatile metabolites derived from garlic (*Allium sativum*) in human urine. *Metabolites* **6**, 43.
- Schwimmer S. a Mazelis M. (1963): Characterization of alliinase of *Allium cepa* (onion). *Archives of biochemistry and biophysics* **100**, 66-73.
- Street T. O., Wayne Bolen D. A Rose G. D. (2006): A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proceeding of National Academy of Sciences* **103**, 13997-14002.
- Suzuki T., Sugii M. a Kakimoto T. (1962): Metabolic Incorporation of L-Valine-[¹⁴C] into S-(2-karboxypropyl)glutathione and S-(2-karboxypropyl)cysteine in Garlic. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **10**, 328-331.
- Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A. a Ando T. (1984): Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Analytical Chemistry* **56**, 111-113.
- Truscott R. J. W., Malegan D., McCairns R., Halpern B., Hammond J., Cotton R. G. H., Mercer J. F. B., Hunt S., Rogers J. G. a Danks D. M. (1981): Two New Sulphur-containing Amino Acids in Man. *Biomedical Mass Spectrometry* **8**, 99-104.
- Turnbull A., Galpin I. J. a Collin H. A. (1980): Comparison of the Onion Plant (*Allium cepa*) and Onion Tissue Culture III. Feeding of ¹⁴C Labelled Precursors of the Flavour Precursors Compounds. *The New Phytologist* **85**, 483-487.
- Wirtz M. a Droux M. (2005): Synthesis of the sulfur amino acids: cysteine and methionine. *Photosynthesis Research* **86**, 345-362.
- Weiner L., Shin I., Shimon L. J. W., Miron T., Wilchek M., Mirelman D. Frolow F. a Rabinkov A. (2008): Thiol-disulfide organization in alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*). *Protein Science* **18**, 196-205.
- Yoshimoto N., Yabe A., Sugino Y., Muramaki S., Sai-ngam N., Sumi S.-I., Tsuneyoshi T. a Saito K. (2015a): Garlic γ -glutamyl transpeptidases that catalyze deglutamylation of biosynthetic intermediate of alliin. *Frontiers in Plant Science* **5**: 758.
- Yoshimoto N., Onuma M., Mizuno S., Sugino Y., Nakabayashi R., Imai S., Tsuneyoshi T., Sumi S.-I. a Saito K. (2015b): Identification of a flavin-containing S-oxygenating monooxygenase involved in alliin biosynthesis in garlic. *The Plant Journal* **83**, 941-951.
- Yoshimoto N. a Saito K. (2017): Biosynthesis of S-Alk(en)yl-L-Cysteine Sulphoxides in *Allium*: Retro Perspective. In: *Sulfur Metabolism in Higher Plants – Fundamental, Environmental and Agricultural Aspects. Proceedings of the International Plant Sulfur Workshop.* (De Kok L. J., Hawkesford M. J., Haneklaus S. H., Schnug E., eds). Springer, Cham, Švýcarsko, 49-60.
- Zhai B., Zhang C., Sheng Y., Zhao C., He X., Xu W., Huang K. a Luo Y. (2018): Hypoglycemic and hypolipidemic effect of S-allyl-cysteine sulfoxide (alliin) in DIO mice. *Scientific reports* **8**, 3527.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1SP	1-sulfinylpropan
4-MP	4-merkaptopyridin
ACSO	S-alk(en)ylcysteinsulfoxid
APS	5'-adenylylsulfát
ASA I(II)	z angl. <i>Allium sativum</i> agglutinin I(II), lektin vázající mannosu
CE	kapilární elektroforéza
dH ₂ O	deionizovaná voda
Dns-Cl	dansylchlorid
EST	z angl. expressed sequence tag
FMOG	fluorenylmethylchlorformiát
γGC	γ-glutamyl-S-alk(en)ylcystein
GSH	glutathion (redukovaná forma)
GSSG	dimerní glutathion (oxidovaná forma)
IU	mezinárodní jednotka (z angl. international unit)
LDH	laktátdehydrogenasa (EC 1.1.1.27)
LDL	lipoprotein nízké hustoty
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NTB	2-nitro-5-thiobenzoová kyselina
OCMHA	O-(karboxymethy)hydroxylamin-hemihydrochlorid
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
PLP	pyridoxal-5-fosfát
SAC	S-allyl-L-cystein
SAMC	S-allylmerkaptol-L-cystein
SDS	dodecylsírán sodný