

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Ověření schopnosti rašeliníkového pektinu  
inhibovat aktivitu půdních enzymů**

Diplomová práce

**Bc. Lucie Chroustová**

Školitel: RNDr. Tomáš Hájek Ph.D.

České Budějovice 2021

Chroustová, L., 2021: Ověření schopnosti rašeliníkového pektinu inhibovat aktivitu půdních enzymů. [Verification of the ability of Sphagnum pectin to inhibit the activity of soil enzymes. Mgr. Thesis, in Czech.] – 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

This work deals with the influence of sphagnum, a *Sphagnum* moss-derived pectin, on the activity of soil enzymes. The aim of this work is to verify the extent to which sphagnum inhibits the activity of pure (commercial) enzymes and enzymes extracted from peatland. The inhibitory effects of sphagnum were compared with the effects of another moss pectin isolated from *Leucobryum glaucum* and selected phenolic compounds (humic substances from peat water and gallic, tannic, sphagnum and 4-hydroxybenzoic acids).

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 14. 4. 2021

Bc. Lucie Chroustová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomášovi Hájkovi Ph.D. za trpělivé vedení této práce, za jeho udělené rady, ochotu a čas, který mi věnoval.

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Rašeliniště .....	2
2.1	Rašeliniště jako úložiště v globálním cyklu uhlíku .....	2
2.2	Koloběh C v rašeliništi .....	3
2.3	Význam rašeliníků v rašeliništích mírného až subarktického pásma .....	3
2.4	Příčiny hromadění rašeliny (pomalé dekompozice) .....	4
2.4.1	Specifika rašelinného půdního prostředí.....	4
2.4.2	Biochemická specifika rašeliníků .....	5
3	Podstata rozkladu organické hmoty v půdě.....	6
3.1	Enzymy .....	6
3.2	Mechanismus účinku enzymů.....	7
3.3	Mikrobiální a enzymatická aktivita v půdě.....	8
3.4	Měření enzymatické aktivity .....	9
3.4.1	Specifické fluorescenční substráty pro hydrolytické enzymy.....	9
3.5	Rozklad organických sloučenin v aerobních půdách.....	10
3.6	Rozklad v anaerobních půdách .....	11
3.7	Inhibice enzymů.....	11
3.7.1	Fenolické látky .....	12
3.7.2	Fenolické látky jako inhibitory enzymů.....	13
4	Sphagnum .....	15
4.1	Inhibice mikrobiální aktivity sphagnumem.....	15
5	Hypotézy .....	17

6	Cíle práce.....	18
7	Metodika.....	19
7.1	Uspořádání experimentů .....	19
7.2	Příprava inhibitorů enzymů .....	20
7.2.1	Příprava rašelinných huminových látek.....	20
7.2.2	Příprava sphagnanu .....	21
7.2.3	Příprava pektinu izolovaného z <i>Leucobryum glaucum</i> .....	21
7.3	Vliv sphagnanu a vybraných fenolických látek na aktivitu hydrolytických enzymů v extraktech z rašelinného prostředí .....	21
7.3.1	Příprava výluhů .....	22
7.4	Měření enzymatické aktivity .....	23
7.5	Vyhodnocení dat .....	25
8	Výsledky.....	27
8.1	Vliv mechových pektinů a fenolických látek na enzymatickou aktivitu čistých enzymů .....	27
8.1.1	Fosfatáza .....	27
8.1.2	Celobiohydroláza .....	31
8.2	Vliv mechových pektinů a fenolických látek na aktivitu čisté fosfatázy srovnatelnou s environmentálními vzorky .....	33
8.3	Vliv sphagnanu a vybraných fenolických látek na aktivitu hydrolytických enzymů v extraktech z rašelinného prostředí .....	36
9	Diskuse.....	39
9.1	Vliv mechových pektinů a fenolických látek a pH na enzymatickou aktivitu čistých enzymů .....	39

9.2 Vliv sphagnanu a vybraných fenolických látek na aktivitu hydrolytických enzymů v extraktech z rašelinného prostředí .....	41
10 Závěr.....	44
11 Literatura .....	45
12 Přílohy .....	51

# 1 Úvod

Rašeliniště představuje unikátní mokřadní ekosystém, ve kterém dochází k akumulaci rašeliny a jsou tak významnou zásobárnou uhlíku. Ke vzniku rašeliny dochází zejména hromaděním rostlinných zbytků v trvale zaplaveném prostředí. Na tvorbě rašeliny se většinou podílí odumřelá pletiva mechů rašelínků a cévnatých rostlin. Pomalý rozklad rašeliny je způsobený řadou abiotických faktorů (například anoxickými podmínkami, nízkým pH a nízkou teplotou) i chemickým složením rostlinného opadu. Mezi organické sloučeniny rostlinného původu zpomalující rozklad opadu a rašeliny patří fenolické látky, které mohou inhibovat enzymy půdních mikrobiálních společenstev (Frolking et al., 2001, Gonçalves a Romano, 2017, Rydin a Jeglum, 2013).

Rašelínky obsahují pektinový polysacharid sphagnan, který je během rozkladu uvolňován do půdního prostředí rašeliny (Painter, 1991). Tento polysacharid je považován také za jeden z důvodů pomalého rozkladu rašeliny (Painter, 1991, Hájek et al., 2011). Sphagnan snižuje pH prostředí s nízkou pufrací kapacitou. Snížení pH způsobuje inhibici mikrobiálního růstu druhů, které jsou citlivé na kyselé prostředí (Stalheim et al., 2009). Sphagnan může přímo potlačovat aktivitu enzymů prostřednictvím interakce mezi disociovanými karboxylovými skupinami sphagnanu a volnými aminoskupinami enzymů (Ballance et al., 2008). Není však známo, v jakém rozsahu jsou enzymy tímto polysacharidem inhibovány, čímž se experimentálně zabývá tato práce.

Podstatou této práce je ověření, zda sphagnan inhibuje enzymatickou aktivitu hydroláz, a porovnání jeho inhibičních schopností s fenolickými látkami a dalšího mechového pektinu. Bude porovnán vliv těchto inhibitorů na aktivitu vybraných čistých (komerčních) hydrolytických enzymů a enzymů v extraktu z rašelinného prostředí.

## 2 Rašeliniště

Jak už bylo zmíněno v úvodu, jedná se o jedinečný mokřadní ekosystém, jehož půdní pokryv je tvořen rašelinou. Pomalý rozklad rašeliny způsobuje také odolnost některých pletiv vegetace rašeliniště vůči rozkladu (především rašeliníků) (Frolking et al., 2001, Hogg, 1993, Rydin a Jeglum, 2013).

Utváření rašeliniště obvykle doprovází vznik dvou vrstev uvnitř rašelinového profilu, a to akrotelmu a katotelmu. Akrotelm představuje horní aktivní vrstvu rašeliny, ve které kolísá hladina vody a je ovlivněna živými rostlinami, které zde koření. Akrotelm se vyznačuje vysokým obsahem organických látek a vyšší mikrobiální aktivitou. V této vrstvě oproti katotelmu probíhá intenzivní rozklad, neboť zde dominuje aerobní dekompozice. Rašelina v této vrstvě není úplně rozložená, má vysokou pórovitost a vyšší hydraulickou vodivost, tudíž je umožněn snazší transport živin. Spodní vrstva rašeliny katotelmu je permanentně nasycená vodou. V této vrstvě se nachází rozloženější organický materiál. Rašelina v katotelmu obsahuje malé póry, což zapříčiňuje mnohem menší hydraulickou vodivost, a tedy pomalý pohyb vody v katotelmu. Se zvětšující se hloubkou dochází k poklesu mikrobiální aktivity a ke snižování rychlosti rozkladu, probíhá zde pomalejší anaerobní dekompozice (van Breemen, 1995, Frolking et al., 2001, Holden, 2005, Strack et al., 2008).

### 2.1 Rašeliniště jako úložiště v globálním cyklu uhlíku

Uhlík patří mezi prvky, které jsou úzce spojené se životem. Představuje hlavní složku tkání všech organismů. Zprostředkovává přenos energie v biosféře, uvnitř organismů a ekosystémů (Lavelle a Spain, 2001).

Rašeliniště jsou významnou zásobárnou uhlíku (C) v celosvětovém měřítku. Severská rašeliniště obsahují přibližně jednu polovinu z množství uhlíku, které je uloženo v půdách celého světa (Nichols a Peteet, 2019). Množství uhlíku v rašeliništích představuje více než polovinu zásoby uhlíku v atmosféře ve formě oxidu uhličitého, přestože pokrývají zhruba 3 % světové rozlohy. Probíhá zde výměna uhlíku mezi živou biomasou, rašelinou, vodou a plyny v atmosféře (Rydin a Jeglum, 2013). V rašeliništích přesahuje roční čistá primární produkce vegetace dekompozici rašeliny a opadu, proto zde dochází k akumulaci uhlíku (Frolking et al., 2001).



Rostliny podílející se na vytváření rašeliniště, například rašeliníky, produkují odolnější opad vůči rozkladu, který společně se zaplavením rašeliniště vodou způsobuje snížení rychlosti rozkladu. Rychlost produkce je pak vyšší než rychlost rozkladu a následně tím dochází k hromadění uhlíku ve formě rašeliny (Holden, 2005).

## 2.2 Koloběh C v rašeliništi

Během fotosyntézy dochází k fixaci CO<sub>2</sub> rostlinami, který je následně zpracován do rostlinné biomasy. Část CO<sub>2</sub> se do atmosféry vrací prostřednictvím rostlinného dýchání. Část rostlinné biomasy odumírá a vytváří tak opad v akrotelmu. Podstatné množství tohoto opadu je ztraceno ve formě CO<sub>2</sub>. To je zapříčiněno především aerobním rozkladem bakteriemi a houbami, které se v této části nacházejí. Odumřelá organická hmota, která se hromadí v akrotelmu, se postupně dostává do katotelmu. V anoxickém katotelmu dochází k rozkladu části opadu na methan a CO<sub>2</sub>, ale většina tohoto opadu zůstává uložena v rašelině. Produkci methanu zajišťují za vysoce redukovaných podmínek methanogenní bakterie. Tvorba methanu tedy probíhá ve vodou nasycené zóně, odkud může být methan transportován difúzí, bubláním či prostřednictvím cévnatých rostlin do atmosféry. Při pohybu methanu skrz méně redukované zóny rašeliny (například nenasycenou půdní vrstvou) může docházet k oxidaci methanu na CO<sub>2</sub>, která je způsobená metanotrofními bakteriemi. Ke ztrátám uhlíku z rašeliny dochází také odtokem vyluhovaných organických látek (Rydin a Jeglum, 2013, Strack et al., 2008).

## 2.3 Význam rašeliníků v rašeliništích mírného až subarktického pásma

V boreálních oblastech vytvářejí mechorosty kolem 45 % rašeliny (Turetsky, 2003). Bez mechů rašeliníků a jejich typických vlastností by boreální rašeliniště neměla své specifické rysy ani rozsah. Rašeliníky jsou přizpůsobené kyselým, podmáčeným, chladným a na živiny chudým podmínkám. Současně se podílejí na utváření tohoto prostředí tím, že ho okyselují a zbavují ho kyslíku (van Breemen, 1995, Rydin a Jeglum, 2013). Tyto mechy mají značnou kapacitu pro zadržování vody. Jejich hyalinní buňky jsou obvykle nasycené vodou. Ovšem větší množství vody je uloženo mezi lístky rašeliníků v dalších kapilárních prostorech mechového porostu. Zadržování vody rašeliníky má pro ekosystém velký význam. Díky trvale vysoké hladině vody dominují anoxické podmínky, které zpomalují dekompozici, a tudíž může docházet k postupnému hromadění rašeliny (Rydin a Jeglum, 2013).

Rašeliníky slouží mnoha druhům cévnatých rostlin, které obývají rašeliníště, jako růstový substrát, ale současně musí cévnaté rostliny s nimi bojovat o světlo, živiny a prostor. Rašeliníky tak jako jiné mechy nemají kořeny. Z tohoto důvodu nemohou rašeliníky soutěžit o živiny uvolňované rozkladem rašeliny pod povrchem. Dokážou však účinně zachycovat živiny, které jsou obsažené v dešťové vodě, před tím, než se dostanou ke kořenům cévnatých rostlin. Toto je limitující pro cévnaté rostliny především ve vrchovištích, kde je hlavním zdrojem živin dešťová voda. Cévnaté rostliny jsou tak do značné míry omezeny na mineralizované živiny v umírající zóně rašeliníků nebo na živiny z dešťové vody, které projdou rašeliníky. Cévnaté rostliny mají výhodu při přijímání světla, protože převyšují koberec rašeliníků. Aby mohly zmíněné rostliny využívat této výhody, musí držet krok v růstu do výšky s rašeliníky. Pokud by cévnaté rostliny rostly pomaleji než rašeliníky, hrozilo by, že budou pohřbeny v mechu (Rydin a Jeglum, 2013).

Mezi zajímavé vlastnosti rašeliníků patří to, že nejsou potravou téměř nikoho. Hlavní důvodem bude, že rašeliníky obsahují málo dusíku a velké množství organických kyselin. Rašeliníky však představují prostředí pro mnoho mikroorganismů a bezobratlých živočichů (Clymo a Hayward, 1982, Rydin a Jeglum, 2013).

## 2.4 Příčiny hromadění rašeliny (pomalé dekompozice)

### 2.4.1 Specifika rašelinného půdního prostředí

Na dekompozici působí abiotické faktory, kvalita opadu, složení a četnost mikrobiálního společenstva. Mezi významné abiotické faktory, které ovlivňují rychlost dekompozice, se řadí výška vodní hladiny a její fluktuace pro její vliv na typ mikrobiální respirace (aerobní a anaerobní respirace) (Rydin a Jeglum, 2013). Rychlost rozkladu v anaerobních podmínkách je pomalejší ve srovnání s aerobními podmínkami (Strack et al., 2001). Přestože dostupnost kyslíku je zásadním faktorem, který limituje rychlost dekompozice, záleží i na dalších abiotických faktorech, zejména na pH, teplotě a dostupnosti živin (Rydin a Jeglum, 2013).

Dekompozice je ovlivněna i složením vegetace kvůli rozdílné rozložitelnosti organických látek, které jsou obsažené v různých druzích rostlin. Záleží také na chemismu dostupného substrátu (Strack et al., 2001). Kvalita substrátu se odvíjí od toho, jak snadno je organický materiál rozložitelný mikroorganismy (Rydin a Jeglum, 2013).

Organické sloučeniny mohou být seřazeny z hlediska narůstající odolnosti vůči rozkladu následovně:

1. cukry, škroby, proteiny;
2. hemicelulóza;
3. celulóza;
4. tuky a vosky;
5. ligniny a fenolické sloučeniny (Weil a Brady, 2017).

Podíl těchto sloučenin v rašelině je dán jejím botanickým složením – rašeliníková rašelina, dřevinová rašelina, ostricová rašelina a další podtypy (Rydin a Jeglum, 2013).

#### 2.4.2 Biochemická specifika rašeliníků

Rašeliníky obsahují fenolické látky, které způsobují pomalý rozpad rašeliníkového opadu. Mechy neobsahují lignin jako cévnaté rostliny, u nichž přispívá k mechanické pevnosti buněčné stěny. Pravděpodobně jiné fenolické látky vykonávají podobnou strukturální funkci v buněčné stěně jako lignin. Tyto látky podobné ligninu jsou odolné vůči rozkladu a díky tomu dochází k hromadění jejich derivátů v rašelině (Rydin a Jeglum, 2013). Toxicita fenolických látek hromadících se v rašeliníkové rašelině představuje další z příčin, která způsobuje pomalý rozklad (Dobrovol'skaya et al., 2014). Rašeliníky mají antibiotické účinky. Antibiotické sekundární metabolity, které jsou přítomné v rostlinách, mohou způsobovat inhibici mikrobiálního růstu (Verhoeven a Toth, 1995).

Rašeliníky obsahují v buněčné stěně kyselé (neesterifikované) pektiny, které umožňují efektivní získávání živin z vody v chudých rašelinistích. Uronové kyseliny těchto pektinů uvolňují  $H^+$  a vytvářejí tak na buněčných stěnách negativně nabitě karboxylové skupiny. Tyto skupiny tvoří vazebná místa pro kationty z rašelinné vody. Tyto pektiny, jak vázané v buněčné stěně, tak uvolněné do rašelinného prostředí rozkladem rašeliníků, byly pro své předpokládané unikátní vlastnosti označeny jako sphagnan. Sphagnan je považován za jeden z faktorů, který zpomaluje rozklad opadu rašeliníků tím, že podobně jako fenolické látky tlumí aktivitu půdních mikrobiálních enzymů (Hájek et al., 2011, Painter, 2001).

## 3 Podstata rozkladu organické hmoty v půdě

### 3.1 Enzymy

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly, které působí jako biokatalyzátory. Podílí se na řízení a koordinaci sítě chemických dějů, která zajišťuje přísun a využití energie a stavebního materiálu z okolí na provoz organismů a výstavbu jejich součástí (Gonçalves a Romano, 2017, Vodrážka, 2002). Enzymy mají řadu pozoruhodných vlastností. Mezi ty nejdůležitější vlastnosti se řadí jejich vysoká katalytická síla, jejich specifčnost a rozsah, v jakém je možné jejich katalytickou aktivitu regulovat prostřednictvím přirozeně vyskytujících se sloučenin. Tato aktivita může být regulována jinými molekulami, malými ionty nebo malými změnami kovalentní struktury enzymů. Enzymy ovlivňují rychlost chemických reakcí. Tuto rychlost jsou schopné zvýšit až  $10^{17}$ krát. Většina enzymů je vysoce specifická v katalyzované reakci a současně i v povaze využívaného substrátu či substrátů (Price a Stevens, 1999). Aktivitu enzymů ovlivňuje mnoho faktorů, mezi které patří například koncentrace specifického enzymatického substrátu a enzymu, ale také přítomnost inhibitorů (Gonçalves a Romano, 2017).

Názvosloví enzymů se v průběhu let upravovalo, protože však pojmenovávání enzymů bylo nejednotné a složité, přistoupilo se ke klasifikaci a pojmenování enzymů dle povahy chemické reakce, jež katalyzují. Enzymy byly rozděleny do šesti hlavních tříd: oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy. Enzymy hydrolázy, na které se zaměřuje tato práce, katalyzují hydrolytické reakce, při kterých dochází za pomoci molekuly vody ke štěpení vazeb v dané molekule (Kodíček et al., 2015, Robinson, 2015, Voet a Voetová, 1995).

V půdách mají hydrolázy důležité postavení v cyklu uhlíku a živin a odpovídají za degradaci polymerních látek. Primárně obstarávají zdroj uhlíku, energie a minerálních živin pro půdní mikroby. Hydrolázy jsou aktivní v aerobních i anaerobních podmínkách. Mezi hydrolázy patří například glukosidázy (glykosyl hydrolázy), které zajišťují katalýzu hydrolýzy glykosidické vazby, která je mezi molekulou sacharidu a další skupinou. Tímto dochází k uvolnění menších cukrů (například glukózy). Konkrétně enzym beta-glukosidáza katalyzuje hydrolýzu koncových neredukujících zbytků beta-glukózy a hydrolyzuje tak produkty celulázové degradace celulózy, nejhojnějšího polymeru na Zemi. Podobně celobiohydroláza odštěpuje dimer glukózy, celobiózu z konců celulózových

polysacharidových řetězců (Deng a Popova, 2011, Dunn et al., 2014, Lynd et al., 2002, Parvin et al., 2018).

Mezi hydrolázy se řadí i enzym fosfatáza, která uvolňuje fosfátovou skupinu z organických molekul. Uvolnění této skupiny je provedeno hydrolýzou monoesterů kyseliny fosforečné na molekulu s volnou hydroxylovou skupinou a na fosfátový aniont; jedná se o tak zvanou defosforylaci (Dunn et al., 2014). Tento proces bývá důležitý pro primární produkci ekosystémů, pro které může být dostupnost fosforu omezující (Saraswati et al., 2019). Rašeliniště se vyznačují relativně vysokou aktivitou tohoto enzymu, která je důsledkem vysoké poptávky mikrobů po fosforu (Parvin et al., 2018).

### 3.2 Mechanismus účinku enzymů

Pro vývoj názorů na mechanismus účinku enzymů měly zásadní význam dvě teorie, a to teorie komplementarity a teorie L. Michaelise a M. L. Mentenové. Podle teorie komplementarity, která byla formulována již v roce 1894, je účinná jen omezená oblast molekuly enzymu, která je dnes nazývána aktivní centrum. Tato oblast umožňuje kontakt jenom se substrátem, který má vhodnou geometricky doplňkovou strukturu, tudíž do aktivního centra padne jen substrát s vhodnou velikostí a tvarem molekuly (Vodrážka, 2002).

Teorie L. Michaelise a M. L. Mentenové z počátku 20. století předpokládá, že molekuly enzymů vážou substrát za vzniku meziproduktu. Vznik tohoto meziproduktu lze vystihnout zákonem o chemické rovnováze. Později byla několikrát prokázána existence komplexu enzym–substrát, která se stala výchozím bodem všech současných interpretací mechanismu působení enzymů. K názoru, že enzymová reakce se uskutečňuje odlišným, energeticky výhodnějším mechanismem než nekatalyzovaná reakce, vedl předpoklad vzniku meziproduktu reakce – komplexu enzym–substrát. Na základě samotného chemického metabolismu však nelze vysvětlit velkou katalytickou účinnost enzymů. Ta je způsobena působením řady faktorů vycházejících ze struktury molekul enzymů (Vodrážka, 2002).

Mezi faktory, které jsou zodpovědné za vysokou účinnost a specifitu enzymové katalýzy, patří chemický aparát aktivního centra, vazebné místo, přesná orientace a způsob fixace substrátu. Chemický aparát aktivního centra deformuje či polarizuje vazby v substrátech a dělá je reaktivnější. Vazebné místo umožňuje koncentrování substrátu z okolního roztoku a imobilizuje ho ve správné geometrii vzhledem ke skupinám, jenž se podílí při chemické přeměně substrátu. Díky přesné orientaci substrátu v aktivním centru

se uskutečňuje každý krok reakce s minimálním rotačním či translačním pohybem substrátu. Energie pro enzymovou reakci je poskytována způsobem fixace substrátu v aktivním centru (Vodrážka, 2002).

Katalytické skupiny aktivních center enzymů mají stejnou povahu jako skupiny, které se účastní nekatalyzovaných reakcí. Jedná se především o skupiny s volnými elektronovými páry, které mohou vytvářet koordinační vazby s elektrofilními skupinami substrátu. V některých případech naopak přijímají elektronový pár katalytické skupiny enzymu od nukleofilní skupiny substrátu. Mnoho enzymů působí na základě acidobazické katalýzy, to znamená, že k zvýšení reaktivity jednoho z reaktantů dochází odštěpením či naopak přidáním protonu. Značné množství enzymů zvyšuje rychlost reakce tím, že produkuje velmi reaktivní kovalentní meziprodukty se substrátem. Katalyzovaná reakce tak probíhá ve dvou či více dílčích dějích, čímž dojde i k rozdělení celkové aktivační energie na několik menších částí. Každá z nich je menší než energie, která je potřebná pro nekatalyzovanou reakci. Jedná se o takzvanou kovalentní katalýzu (Vodrážka, 2002).

### 3.3 Mikrobiální a enzymatická aktivita v půdě

Půdní enzymy jsou důležité pro zajištění toku látek mezi živou a neživou složkou půdy. Na činnosti enzymů jsou závislé všechny biochemické přeměny, které probíhají v půdě, a to jak přeměny, které se uskutečňují ve vnějším prostředí, tak ty, co probíhají uvnitř organismů. Půdní enzymy jsou nepostradatelné pro přeměnu živin (například proteinů na aminokyseliny) a štěpení biopolymerů jako zdrojů uhlíku a energie (například celulózy na glukózu). Enzymy nacházející se v půdě mají primárně mikrobiální původ a mohou být prostorově i časově odděleny od buňky, která je vyprodukovala (Kiss et al., 1975, Šantrůčková et al., 2018, Wall, 2012).

Extracelulární enzymy jsou důležité pro výživu buňky, protože přeměňují složité organické molekuly mimo buňku na malé molekuly, které mohou být následně asimilovány. Činnost extracelulárních enzymů zvyšuje možnost přežití mikrobiální populace a umožňuje její rozšíření. Tyto enzymy jsou pro mikroorganismy významné pouze v případě, kdy jsou produkty těchto enzymových reakcí přístupné rostoucím a množícím se buňkám. Při produkci extracelulárních enzymů je spotřebováván dusík a uhlík, proto musí mikroorganismy optimalizovat náklady na získávání živin a uhlíku. Většina těchto enzymů je produkována podle aktuální lokální koncentrace substrátu. Dekompozice určitého substrátu je zajištěna směsí enzymů s různou efektivitou (Allison a Vitousek, 2005, Šantrůčková et al., 2018).

S narůstající půdní hloubkou klesá podíl odumřelé organické hmoty (substrátu), a proto dochází ke snižování aktivity enzymů (Gianfreda a Ruggiero, 2006).

### 3.4 Měření enzymatické aktivity

Přeměna půdních biopolymerů na jednodušší sloučeniny, které pak mohou využívat rostliny a mikroorganismy, je zprostředkována působením hydrolytických enzymů. Na základě studia enzymatické aktivity ve vzorcích půdy či opadu lze posoudit funkční rozmanitost mikrobiálního společenstva v půdě či obrat půdní organické hmoty (Baldrian, 2009, Kandeler et al., 1999). Enzymatické testy mohou být prováděny buď přímou nebo nepřímou metodou. Přímá metoda se zakládá na tom, že reakční substrát je přidán do studovaného systému. U nepřímé metody jsou enzymy získány z půdy a poté jsou testovány. Problém nepřímé metody představuje to, že kvůli vazbě na složky půdy není řada enzymů extrahovatelná z půdy (Baldrian, 2009).

Protože během experimentální části práce byla enzymatická aktivita měřena metodou využívající specifické fluorescenční substráty pro hydrolytické enzymy, zabývá se další kapitola touto metodou

#### 3.4.1 Specifické fluorescenční substráty pro hydrolytické enzymy

Substráty, které jsou napojené na vysoce fluorescenční látku 4-methylumbelliferon (MUF, v některých pracích též MUB), která je excitována zářením o vlnové délce 330 nm a emituje fluorescenci při 450 nm, představují systém, který umožňuje citlivou detekci a kvantifikaci enzymatické aktivity (Chrost a Krambeck, 1986, Freeman et al., 1995).

K látce MUF může být navázáno mnoho sloučenin. Tímto však MUF ztrácí své fluorescenční vlastnosti. Fluorescence MUF silně vzroste, dojde-li k jeho uvolnění enzymovou hydrolýzou vazby mezi MUF a připojenou sloučeninou (Freeman et al., 1995). Fluorescence uvolněného MUF závisí na jeho koncentraci (a tedy na enzymové aktivitě) a na pH (Baldrian, 2009, Chrost a Krambeck, 1986). Výhodou této metody je, že díky vysoké fluorescenci látky MUF je možné lehce detekovat i malé množství hydrolyzovaného substrátu, a tudíž provádět testy při nízkých koncentracích substrátu (Marx et al., 2001). Protože fenolické látky (například huminové látky) mohou zapříčinit zhášení fluorescence MUF a samy mohou být fluorescenční, je důležité mít sadu standardů připravených ze zásobního roztoku MUF (Baldrian, 2009, Deng et al., 2011), přidaných k paralelním vzorkům bez substrátu. Dále je podstatné provádět odečet přirozeně vyskytující se fluorescence

substrátů pomocí slepých vzorků bez enzymu (blank) (Hendel a Marxsen, 2005). Se vzorky, standardy a slepými vzorky je nutné zacházet přesně stejným způsobem (Deng et al., 2011).

Při tomto typu enzymatických testů se v současnosti využívají fluorimetry zaznamenávající fluorescenci z jamek mikrotitračních destiček, které umožňují analyzování velkého množství enzymů a vzorků půdy v krátkém čase. Měření tvorby produktu může probíhat přímo na mikrotitrační destičce bez předešlé extrakce a čištění produktu (Marx et al., 2001).

### 3.5 Rozklad organických sloučenin v aerobních půdách

V půdě probíhá rozklad velkých organických molekul na menší a jednodušší složky. Poté co se organická pletiva dostanou do aerobní půdy, nastanou čtyři obecné procesy. Jedná se o oxidaci, uvolňování, syntézu a ochranu, které jsou výsledkem mikrobiální činnosti. Během enzymatické oxidace rostlinných sloučenin uhlíku dochází k tvorbě CO<sub>2</sub> a vody. Při této reakci vzniká energie a biomasa rozkladače. Esenciální prvky (například fosfor, dusík, síra) jsou uvolňovány v reaktivních (asimilovatelných) formách, jako je fosfát, amonný iont, síran. Poté následuje syntéza nových sloučenin činností mikrobů jako buněčných složek či jako produktů rozkladu nebo sekundárních metabolitů. Některé rostlinné sloučeniny a jejich produkty, které vznikly během rozkladu, jsou chemicky nebo fyzicky chráněny před dalším mikrobiálním rozkladem. Tato ochrana je zajištěna interakcí rostlinných sloučenin s půdním prostředím (Weil a Brady, 2017).

V provzdušněné části rašeliniště jsou aktivní oxidativní enzymy peroxidázy a fenol-oxidázy, které degradují fenolické látky. Při oxidaci fenolických látek využívají fenol-oxidázy kyslík a peroxidázy peroxid vodíku. Aktivita těchto enzymů obecně narůstá se zvyšující se hodnotou pH půdy a zajišťuje důležité ekosystémové funkce (degradace ligninu, humifikace, export rozpuštěného organického uhlíku, mineralizace uhlíku). Vysoká oxidační aktivita vede k omezení hromadění organické hmoty v půdě (Freeman et al., 2004, Min et al., 2015, Sinsabaugh et al., 2008, Sinsabaugh, 2010).

V akrotelmu omezují rozklad živé rašeliníky, které okyselují prostředí. Okyselení je způsobené hromaděním organické hmoty kyselého charakteru a iontovýměnou, v menší míře i fyziologickým vylučováním kyselin z buňky (protonů a např. kyseliny sphagnové) (Verhoeven a Liefveld, 1997).



### 3.6 Rozklad v anaerobních půdách

V zaplavené půdě může dojít k vyčerpání zásob kyslíku, protože voda zabraňuje difúzi plynů z atmosféry. Při nedostatku kyslíku nemohou v půdě fungovat aerobní organismy, které jsou tak nahrazeny anaerobními organismy (Weil a Brady, 2017). Anaerobní mikroorganismy vyžívají nízký oxidoredukční potenciál, který představuje poměr mezi redukovanými a oxidovanými látkami v prostředí (Votava, 2005).

V zamokřených anaerobních půdách se hromadí značné množství částečně rozložené organické hmoty. Akumulace této hmoty je také zapříčiněna tím, že některé produkty anaerobního metabolismu jsou pro mikroby jedovaté a tím účinkují jako konzervační látka pro organickou hmotu. Při anaerobním rozkladu vzniká methan a částečně oxidované organické sloučeniny, mezi které patří alkoholy a organické kyseliny (Weil a Brady, 2017). V rašelinistích může za anaerobních podmínek docházet k hromadění fenolických látek různé molekulové hmotnosti, protože kvůli nedostatku kyslíku nejsou rozkládány oxidativními enzymy. Tyto látky mohou způsobovat inhibici hydroláz (Freeman et al., 2001, Freeman et al., 2004), i když tento proces v rašelinném prostředí nemusí být významný (Urbanová a Hájek, 2021). Rozkladem rašeliníků je uvolňován sphagnan, který by mohl reagovat s enzymy a inhibovat je (Ballance et al., 2008, Painter, 1991).

### 3.7 Inhibice enzymů

Inhibitory enzymů jsou látky, které reverzibilně či ireverzibilně snižují enzymatickou katalytickou aktivitu či ji úplně zabraňují. Při ireverzibilní inhibici se obvykle enzym mění chemicky, ale reverzibilní inhibitory, které se dělí na kompetitivní, akompetitivní a nekompetitivní, se vážou nekovalentně (Gonçalves a Romano, 2017).

Během kompetitivní inhibice se na enzym může vázat buď substrát nebo inhibitor, který tak konkuruje substrátu o aktivní místo (Gonçalves a Romano, 2017). Kompetitivní inhibitory mají podobnou strukturu jako substrát do té míry, že je enzym není schopen rozeznat. Místo komplexu enzym–substrát vzniká inaktivní komplex s inhibitorem. Tímto mechanismem dochází k blokování enzymu. Míra kompetitivní inhibice je závislá na poměru koncentrací substrátu a inhibitoru a na poměru afinit těchto látek k enzymu. Úplného odstranění účinku kompetitivního inhibitoru lze docílit dostatečně vysokou koncentrací substrátu (Vodrážka, 2002).

U akompetitivní inhibice dochází k vazbě inhibitoru na komplex enzym-substrát, což vede k zabránění přeměny tohoto komplexu na produkt a ke vzniku neaktivního komplexu enzym–substrát–inhibitor. Nekompetitivní inhibitory, které nemají vliv na vazbu substrátu na enzym, způsobují zpomalení rychlosti přeměny substrátu na produkt. Jsou schopné se stejně dobře vázat jak na komplex enzym–substrát, tak na volný enzym (Gonçalves a Romano, 2017, Vodrážka, 2002).

Protože je část mé experimentální práce zaměřena na vyhodnocení inhibiční aktivity fenolických látek pocházejících z rašelinné půdy, zaměřují se následující kapitoly na ně.

### 3.7.1 Fenolické látky

Fenolické látky představují sekundární metabolity produkované rostlinami s rozmanitou strukturou (Cheynier, 2012). Bylo určeno více jak 8000 různých struktur těchto látek (Martin a Apple, 2010). Podle odhadů je ve fenolických látkách obsaženo 40 % organického uhlíku, který cirkuluje v biosféře. Sekundární metabolity nepředstavují sloučeniny, které jsou nutné pro základní respirační a fotosyntetický metabolismus. Tyto sloučeniny jsou však důležité pro přežití rostlin v životním prostředí. Na rozdíl od primárních metabolitů, mezi které se řadí zejména aminokyseliny, mastné kyseliny, cukry a nukleové kyseliny, jsou sekundární metabolity chemicky a strukturně rozmanitější (Lattanzio, 2013).

Fenolické sloučeniny jsou primárně bezdusíkaté látky, které obsahují alespoň jedno aromatické jádro, na kterém je navázaná nejméně jedna hydroxylová skupina (Míka, 2001, Velíšek a Cejpek, 2008, Vermerris a Nicholson, 2006), ale toto kritérium není pro definici fenolických látek dostatečné. Pro přesnější vymezení této skupiny se ještě navíc využívá kritérium jejich biosyntézy. Aromatická jádra fenolických látek vznikla z metabolismu šikimové kyseliny nebo polyacetátu, případně kombinací obou zmíněných sloučenin (Míka, 2001). Hydroxylové skupiny fenolických látek mohou být methylovány, oxidovány, případně spojené s karboxylovými kyselinami, cukry či jinými fenolickými látkami (Velíšek a Cejpek, 2008).

Fenolické látky mají různé funkce v růstu, vývoji a obraně rostlin (Vermerris a Nicholson, 2006). Mezi významné funkce patří to, že slouží jako prostředek ochrany proti herbivorům a dávají rostlinám specifické vlastnosti (například vzhled a vůni) (Míka, 2001). Mezi fenolické látky, které slouží k ochraně před hmyzem a jinými herbivory, se řadí taniny (trísloviny). Tyto sloučeniny svíravé chuti se kombinují s proteiny, čímž dochází ke vzniku

komplexů se sníženou stravitelností. Taniny fungují i jako inaktivátory enzymů (Lattanzio, 2013). Velmi rozšířenou polymerickou fenolickou látkou je lignin, který je charakteristický pro cévnaté rostliny, jimž slouží jako podpůrná struktura. Naopak mechorosty a řasy skutečný lignin neobsahují (Míka, 2001).

V půdě fungují fenolické látky jako regulátory půdních procesů a mohou řídit formu živin dostupných pro mikroby a rostliny. Svým přímým vlivem na aktivitu a složení společenstva dekompozitorů ovlivňují fenolické látky rychlost dekompozice a cyklus živin (Lattanzio, 2013).

### 3.7.2 Fenolické látky jako inhibitory enzymů

Fenolické látky (případně obecněji huminové látky, které jsou organickými polymery obsahující významné množství látek fenolické povahy) se mohou v půdě vyskytovat ve třech různých formách, a to v rozpuštěné (volné), sorbované či polymerizované s ostatní půdní organickou hmotou. Rozpuštěná forma se pohybuje volně v půdním roztoku, zatímco sorbovaná forma je reverzibilně vázaná na proteiny či půdní částice (Min et al., 2015). Fenolické látky rozkládá jen velmi málo enzymů (Freeman et al., 2001). Mezi enzymy, které mají tuto funkci patří fenol-oxidázy a peroxidázy. Tyto oxidativní enzymy potřebují pro svoji činnost kyslík, proto jsou v rašelinisti aktivní jen v provzdušeném akrotelmu a tím dochází k hromadění fenolických látek (Freeman et al., 2004).

Fenolické látky mají potenciál jako inhibitory enzymů (Gonçalves a Romano, 2017). Pokud se fenolické látky vyskytují při vyšších koncentracích, tak mohou inhibovat hydrolázy až o více než 80 % (Vuorinen a Saharinen, 1996). K inhibici hydroláz pravděpodobně dochází už při nízkých koncentracích fenolických látek ( $2\text{--}5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (Freeman et al., 2004). V rašelinistích může koncentrace fenolických látek dosahovat hodnoty vyšší než  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (Toberman et al., 2008).

Fenolické látky mohou způsobovat inhibici enzymů například vznikem komplexu enzym–fenolická látka. Dále mohou potlačovat mikrobiální růst tím, že dojde ke snížení pH nebo zvládnou z prostředí vyvázat kovové ionty. Vyvázání kovových iontů je způsobeno jejich velkou kationtovou výměnnou kapacitou (Min et al., 2015). Mezi inhibitory enzymů patří například taniny, které se pojí s enzymy vodíkovou vazbou mezi fenolickou hydroxylovou skupinou a kyslíkem peptidické vazby enzymu. Důležitým faktorem, který ovlivňuje interakci mezi enzymem a taninem, je molekulová hmotnost. Pro inhibici

enzymatické aktivity je optimální molekulová hmotnost oligomerních fenolických látek, zejména taninů (například kyselina tříslová). Naopak u monomerů a fenolických látek s vysokou molekulovou hmotností lze očekávat nižší inhibiční účinky, protože monomery nemohou utvářet četné vodíkové vazby s enzymy kvůli jejich malé velikosti a fenolické látky s vysokou molekulovou hmotností jsou moc velké na to, aby mohly efektivně pronikat k mikrobiálním proteinům (Field a Lettinga, 1992). Ačkoliv fenolické látky inhibují mikrobiální aktivitu v půdě, mohou být půdními mikroorganismy využívány i jako zdroj uhlíku (Souto et al., 2000).

## 4 Sphagnan

Významnou složku stélek, a tedy i opadu rašeliníků, představuje pektinový polysacharid, který má schopnost potlačovat mikrobiální aktivitu. Tento polysacharid byl pojmenován sphagnan a je otázkou, jak zásadní je jeho podíl na pomalé dekompozici rašeliníků a rašeliny. Sphagnan je součástí buněčných stěn a díky kovalentní vazbě s hemicelulózou a celulózou je v živých rašelinících nerozpustný (Dobrovol'skaya et al., 2014, Painter, 1991, Stalheim et al., 2009). Během přeměny odumřelých rašeliníků na rašelinu dochází k postupnému uvolňování sphagnanu autohydrolyzou do okolní vody (Painter, 1991).

Sphagnan je tvořen kyselinou galakturonovou a ramnózou (ramnogalakturonan) tvořící kostru, na kterou jsou navázány postranní řetězce dalších cukrů (zejména galaktóza, glukóza, xylóza) (Ballance et al., 2007).

Painter (1983a) ovšem uvádí, že kromě zbytku kyseliny D-galaktouronové a neutrálních cukrů obsahuje sphagnan také kyselinu ketouronovou, konkrétně 5-keto-D-manuronovou. Podle Paintera (1991) se sphagnan vyznačuje tím, že kromě obvyklých redukčních koncových skupin obsahují jeho řetězce také mnoho těchto reaktivních karbonylových skupin vázaných na manuronovou kyselinu. Proto je sphagnan reaktivní a nestabilní, a to jak v uvolněné, rozpustné formě, tak v nerozpustné formě, která je stále vázaná v buněčných stěnách. Obě formy se pomalu přeměňují kyselé katalyzovanou dehydratací a částečnou dekarboxylací na kyselý hnědý polymer (Børsheim et al., 2001, Painter, 1983b).

Informace v předchozím odstavci jsou však chybnými interpretacemi prací Paintera, jak později prokázali Ballance et al. (2007). Účelem jejich studie bylo opětovné prozkoumání složení a struktury polysacharidů rašeliníků, žádná analýza však neprokázala přítomnost 5-keto-D-manuronové či jiné ketouronové kyseliny, ani v buněčných stěnách, ani v izolovaném sphagnanu.

### 4.1 Inhibice mikrobiální aktivity sphagnanem

Sphagnan je obtížně rozkládán mikroorganismy (Dobrovol'skaya et al., 2014). Představuje vysoce rozvětvenou makromolekulu. Tato struktura pravděpodobně brání snadnému přístupu hydroláz (Hájek et al., 2011).

Disociované karboxylové skupiny sphagnanu mohou interagovat s volnými aminoskupinami extracelulárních enzymů, čímž dojde ke vzniku polyelektrolytového komplexu a enzymy se tak stanou neúčinnými. K tomuto procesu dochází v roztocích, které mají malou iontovou sílu při pH 2,0–4,8, to znamená za podmínek, které jsou podobné podmínkám ve vrchovištní vodě (Ballance et al., 2008, Hájek et al., 2011). Enzymová inhibice vede nejen k omezení mineralizace uhlíku, ale i minerálních živin, zejména dusíku, jehož nízká dostupnost snižuje produkci enzymů a nepřímo potlačuje mikrobiální růst (Hájek et al., 2011).

Sphagnan má schopnost silně vázat vápník a další kationty vícemocných kovů, což například zapříčinilo silnou inhibici růstu kmene *Azotobacter vinelandii*, který vyžadoval ionty vápníku. Bylo navrženo, že sphagnan může částečně zodpovídat za nízkou intenzitu mikrobiální aktivity v rašelině tím, že váže nezbytné kationty multivalentních kovů (Børsheim et al., 2001, Painter, 1991).

Sphagnan může inhibovat mikrobiální růst mikroorganismů citlivých na nízké pH tím, že snižuje pH prostředí s nízkou pufrací kapacitou. Zjištěné antimikrobiální vlastnosti sphagnanu nejsou mezi sacharidy jedinečné, protože i další sacharidy, v nichž je obsaženo významné množství uronových kyselin, jsou schopné potlačovat růst bakterií snížením pH (Stalheim et al., 2009).

## 5 Hypotézy

V experimentální části práce jsou ověřovány následující hypotézy:

Předpokládáme, že pektinový polysacharid sphagnan bude inhibovat aktivitu hydroláz a že míra této inhibice bude srovnatelná s inhibicí oligomerními fenolickými látkami, jejichž schopnost inhibovat aktivity enzymů je dobře známa.

Očekáváme, že inhibice oligomerní fenolickou látkou kyselinou tříslovou bude větší než inhibice monomerními fenolickými látkami kyselinou sphagnovou, kyselinou gallovou a kyselinou 4-hydroxybenzoovou. Inhibice kyselinou tříslovou by měla být větší než inhibice polymerními fenolickými látkami, které jsou reprezentované rozpuštěnými huminovými látkami z rašelinné vody. Zejména inhibiční účinek jejich vysokomolekulární frakce by měl být malý.

Očekáváme, že enzymatický aparát přirozeného mikrobiálního společenstva rašeliniště, které je dlouhodobě vystaveno vysokým koncentracím fenolických látek, bude na toto prostředí adaptován a míra inhibice tak bude menší než v případě čistých enzymů izolovaných z jiných zdrojů.

## 6 Cíle práce

Hlavním cílem této práce je ověřit, do jaké míry rašeliníkový pektin (sphagnan) inhibuje aktivitu enzymů a zda jsou jeho případné inhibiční schopnosti mezi mechovými pektiny jedinečné. Proto bude účinek sphagnanu na enzymatickou aktivitu porovnán s účinkem pektinu izolovaného z jiného mechu (*Leucobryum glaucum*).

Dalším cílem je porovnat vliv sphagnanu a vybraných fenolických látek na čistou (komerční) fosfatázu a fosfatázu extrahovanou z přírodního rašelinného společenstva a případně jejich vliv na další enzymy.

Enzymatická aktivita bude hodnocena měřením fluorescence s využitím specifických fluorescenčních substrátů pro hydrolytické enzymy.



## 7 Metodika

### 7.1 Uspořádání experimentů

Pro zjištění a porovnání vlivu pektinových a fenolických látek na enzymatickou aktivitu byly vybrány následující potenciální inhibitory: (a) polysacharidy rašeliníkový pektin sphagnan a pektin izolovaný z bělomechu sivého (*Leucobryum glaucum*) a (b) látky fenolické povahy 4-hydroxybenzoová kyselina, kyselina sphagnová, kyselina gallová, kyselina tříslová a huminové látky z rašelinné vody (LMW a HMW HS, viz. níže).

V rámci praktické části této práce byly provedeny tři experimenty. V prvním experimentu byl testován vliv vybraných fenolických a pektinových látek na aktivitu čisté (komerční) kyselé fosfatázy ( $8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a celobiohydrolázy ( $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Byla posuzována míra inhibice fosfatázy všemi osmi výše uvedenými potenciálními inhibitory a míra inhibice celobiohydrolázy sphagnanem a kyselinou tříslovou. Byly testovány dvě hladiny pH – 4 a 5 – které svým rozmezím reprezentují vrchoviště a kyselá slatiniště, tedy biotopy typické hojným zastoupením rašeliníků. Výhodou tohoto rozmezí bylo použití jediného (acetátového) pufru, který neovlivňoval enzymatickou reakci (naopak morfolinové biologické pufrы MES a MOPS testované pro pH 6 a 7 nemohly být použity, protože potlačovaly enzymatickou aktivitu testované fosfatázy).

V druhém pokusu byl zkoumán vliv všech pektinových a fenolických potenciálních inhibitorů na aktivitu čisté (komerční) fosfatázy o snížené koncentraci ( $0,333 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), tedy aktivitu, která je srovnatelná s environmentálními vzorky.

Kyselá fosfatáza (Typ I, extrahovaná ze zárodků pšenice;  $0,4 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) a celobiohydroláza (Typ I, původem z houby *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) a extrahovaná z kukuřice (rekombinantní);  $0,13 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) byly zakoupeny u Sigma Aldrich.

Ve třetím pokusu byl určován vliv vybraných fenolických potenciálních inhibitorů a sphagnanu na aktivitu hydrolytických enzymů, konkrétně fosfatázy a beta-glukosidázy, které byly extrahovány z rašelinného prostředí. V tomto pokusu mezi zkoumané potenciální inhibitory patřily sphagnan, kyselina sphagnová, kyselina tříslová a rašelinné huminové látky o molekulové hmotnosti vyšší než 14 kDa (HMW HS).

## 7.2 Příprava inhibitorů enzymů

Následující kapitoly popisují přípravu možných inhibitorů sphagnanu, pektinu izolovaného z *Leucobryum glaucum* a rašelinných huminových látek. Další použité inhibitory (4-hydroxybenzoová kyselina, kyselina sphagnová, kyselina gallová a kyselina tříslová) byly dodány komerčními firmami. Kyselina 4-hydroxybenzoová byla zakoupena od společnosti Merck, kyseliny gallová a tříslová od společnosti Sigma-Aldrich. Kyselina sphagnová (jako trans-isomer) byla syntetizována na zakázku společností Exclusive Chemistry (Rusko).

### 7.2.1 Příprava rašelinných huminových látek

Pro přípravu rašelinných huminových látek obsahujících fenolické látky byla odebrána rašelinná voda z mělkého jezírka v lokalitě Červené blato (48°51'36.1"N, 14°48'45.2"E). Rašelinné jezírko po revitalizaci dříve těžného rašeliniště a v místě odběru bylo již téměř zazemněno suchopýrem pochvatým (*Eriophorum vaginatum*) a rašeliníkem bodlavým (*Sphagnum cuspidatum*). Koncentrace fenolických látek v této vodě byla 66,6 mg·l<sup>-1</sup> (Folin-Ciocalteuova metoda, kyselina tříslová jako standard; Box, 1983). Rašelinná voda byla filtrována přes pískový filtr, následně přes čtyři vrstvy filtračního papíru a skleněný filtr (0,40 μm) a poté lyofilizována. Výtěžnost sušiny představovala přibližně 300 mg·l<sup>-1</sup>. Dále byl lyofilizát rozpuštěn v destilované vodě a rozdělen přes dialyzační membránu (regenerovaná celulóza, dělicí molekulová hmotnost 14 kDa) na huminové látky o molekulové hmotnosti nižší než 14 kDa (LMW HS) a vyšší než 14 kDa (HMW HS). Poté byly roztoky obou frakcí lyofilizovány. V těchto dvou získaných frakcích huminových látek byla stanovena koncentrace fenolických látek, která představovala jednu pětinu sušiny, tedy cca 0,2 g standardu kyseliny tříslové na 1 g huminových látek.

### 7.2.2 Příprava sphagnanu

Příprava sphagnanu byla provedena podle Ballance et al. (2007). Jako zdroj byl použit rašeliník hnědý (*Sphagnum fuscum*), sebraný na vrchovištním rašeliništi u obce Záhvozdí na Šumavě. Ve stručnosti, očištěný mechový opad, tedy odumřelé části stélek, které ještě nenesou známky rozkladu, byly nejdříve povařeny v acetonu a následně extrahovány působením oxidu chloričitého při 75 °C po dobu 6 hodin (oxid chloričitý se uvolnil z přidaného chloritanu sodného do okyseleného roztoku). Po extrakci byl materiál promyt destilovanou vodou, okyselen 20 mM kyselinou chlorovodíkovou a opět důkladně promyt vodou, acetonem a dosušen. Při této extrakci došlo k degradaci fenolických polymerů buněčných stěn, výsledným produktem jsou polysacharidy buněčných stěn, tzv. holocelulóza, jejíž pektinová složka bohatá na volné (neesterifikované) uronové kyseliny je plně protonizovaná (neváže kationty). Tato kyselá holocelulóza pak byla převedena do nádoby s téměř vřící destilovanou vodou, nádoba byla uzavřena pro zamezení přístupu kyslíku a inkubována po dobu 24 h při 100 °C, aby došlo k uvolnění pektinů kyselou autohydrolyzou. Následně byl obsah zfiltrován a filtrát byl lyofilizován, znovu rozpuštěn v menším množství destilované vody a dialyzován (membrána z regenerované celulózy, dělicí molekulová hmotnost 14 kDa), aby byly odstraněny nízkomolekulární nečistoty. Po lyofilizaci byl získán kyselý rozpustný pektinový polysacharid, sphagnan.

### 7.2.3 Příprava pektinu izolovaného z *Leucobryum glaucum*

Postup přípravy pektinu z bělomechu sivého (*Leucobryum glaucum*) odpovídal postupu přípravy sphagnanu. Zdrojem mechového materiálu byl smrkovo-borový les u obce Horní Žďár na Třeboňsku.

## 7.3 Vliv sphagnanu a vybraných fenolických látek na aktivitu hydrolytických enzymů v extraktech z rašelinného prostředí

Měřením aktivity enzymů fosfatázy a beta-glukosidázy pocházejících z přirozeného rašelinného společenstva, bylo zjišťováno, zda použité inhibitory (sphagnan, HMW HS, kyselina tříslová, kyselina sphagnová) budou mít srovnatelnou schopnost inhibovat enzymy z přirozeného rašelinného společenstva jako čisté komerční enzymy. Ze vzorků mechových bultů byl připraven výluh, který obsahoval enzymy. Protože výluh obsahoval poměrně vysokou pozadřovou koncentraci fenolických látek, byl navíc i extrahován pomocí PVPP (polyvinyl polypyrrolidon), aby došlo ke snížení koncentrace fenolických látek.

### 7.3.1 Příprava výluhů

Byly připraveny výluhy (extrakty) dvou rašelinných substrátů: mladé vrchovištní rašeliny z hloubky 10-30 cm (Ex1) a opadové vrstvy borůvkového bultu (Ex2). Substrátem pro výluh Ex1 byly částečně zrašelinělé zbytky především rašeliníků (vláknitá rašelina), pocházející z různých šumavských vrchovištních rašeliníšť (směsný vzorek). Opad pro Ex2 pocházel z údolního vrchoviště u Záhvozdí na Šumavě a obsahoval především málo rozložené stélky nerašeliníkových mechů s převahou trávničku Schreberova (*Pleurozium schreberi*) a listů vlochyně (*Vaccinium uliginosum*); stáří opadu bylo přibližně 3 měsíce až 4 roky. Od sběru v terénu byly rašelinné substráty uloženy v chladničce v PE sáčcích po dobu 1 měsíce (pro Ex2) a 6 měsíců (pro Ex1).

Rašelinný materiál byl nejdříve rukama rozdušen a vložen do 10 mM acetátového pufru v hmotnostním poměru 1:5 tak, aby byl zcela ponořen. Obsah vody v rašelinných substrátech byl kolem 75 a 85 % (Ex2 a Ex1). Suspenze byla přemístěna do malé ultrazvukové lázně a za občasného míchání vystavena ultrazvuku po dobu 15 minut. Následně byl výluh filtrován přes cedník a čajové sítko a centrifugován při 30 000  $\times g$ . Takto vysoká odstředivá síla se osvědčila (oproti dříve testovaným 4777  $\times g$ ) vyšší enzymatickou aktivitou extraktu, pravděpodobně díky menším ztrátám enzymů při následné filtraci, neboť silný filtrační koláč enzymy patrně zadržuje. Supernatant byl pak filtrován pod tlakem přes skleněný filtrační papír o porozitě 1,0  $\mu m$  a 0,4  $\mu m$  a nakonec přetlakem 2 bar přes membránový nitrocelulóзовý filtr o porozitě 0,3  $\mu m$  (PRAGOPOR 7, Pragochema, Praha) pro odfiltrování mikroorganismů. Získané výluhy obsahující extracelulární enzymy byly nažloutlé (Ex2) až nahnědlé (Ex1) barvy díky obsahu huminových látek, tedy i látek fenolické povahy s očekávanou inhibiční aktivitou vůči enzymům. Proto byla část výluhu navíc extrahována pomocí PVPP (polyvinylpolypyrrolidon „Polyclar“, granulovaný, potravinářská kvalita, Lamothe-Abiet, Francie). Tento polymer má velkou afinitu k fenolickým látkám a je proto používán např. k odstranění huminových látek při izolaci a čištění půdní DNA (Arbeli a Fuentes, 2007). PVPP byl nejdříve hydratován v destilované vodě po dobu alespoň jedné hodiny, během které byla voda třikrát vyměněna, a pak byl přidán k výluhu v hmotnostním poměru cca 1:5. Suspenze byla pomalu třepána na horizontální třepačce po dobu 30 min a následně filtrována. Bylo ověřeno, že delší doba nemá pro další snížení obsahu fenolických látek význam. Výluhy byly uloženy v lednici po dobu až dvou týdnů.

Koncentrace fenolických látek ve výluzích Ex1 a Ex2 byla 25,2 a 10,0 mg·l<sup>-1</sup> a výluzích ošetřených PVPP (PVP-Ex1 a PVP-Ex2) byla v obou případech 3,7 mg·l<sup>-1</sup>. Přirozené koncentrace extrahovatelných fenolických látek v rašelinných substrátech byly po započtení ředění tedy pětinasobné, 126 mg·l<sup>-1</sup> v rašelině a 50 mg·l<sup>-1</sup> v opadu.

#### 7.4 Měření enzymatické aktivity

Ve všech třech pokusech byla míra inhibice enzymatické aktivity potenciálními inhibitory (oproti kontrolám bez inhibitorů) zjišťována měřením enzymatické aktivity. Enzymatická aktivita byla vyhodnocována měřením fluorescence, při kterém jsou využívány specifické substráty pro hydrolytické enzymy.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno (a) 50 μl substrátu (Tab. 1), ke kterému bylo dodáno (b) 50 μl inhibitoru (v různých testovaných koncentracích) v acetátovém pufru (10 mM, 1. pokus pH 4 a pH 5, 2. a 3. pokus pH 4), (c) acetátový pufr (1. pokus 100 μl, 2. a 3. pokus 150 μl) a (d) 50 μl enzymu (1. pokus enzym ve vodě, 2. pokus enzym v acetátovém pufru a 3. pokus výluh v acetátovém pufru). Každý vzorek byl připraven ve 3 opakováních.

Pro měření pozadí fluorescence (bez substrátu) bylo do (a) 50 μl MUF v mikrotitrační destičce přidáno (b) 50 μl inhibitoru v acetátovém pufru, (c) acetátový pufr (1. pokus 100 μl, 2. a 3. pokus 150 μl) a (d) 50 μl enzymu (1. pokus enzym ve vodě, 2. pokus enzym v acetátovém pufru a 3. pokus výluh v acetátovém pufru). Všechny standardy pro kalibraci byly připraveny ve 3 opakováních.

Pro vytvoření slepých vzorků (blanků bez enzymů) bylo do mikrotitrační destičky napipetováno (a) 50 μl substrátu, ke kterým bylo doplněno (b) 50 μl inhibitoru v acetátovém pufru. Poté bylo přidáno (c) v 1. pokuse 50 μl vody a 100 μl acetátového pufru a ve 2. a 3. pokusu 200 μl acetátového pufru. Všechny blanky byly provedeny ve 3 opakováních.

Tab. 1 Použité enzymy a inhibitory a koncentrace substrátu, MUF a inhibitoru v jednotlivých pokusech při přípravě vzorků, slepých vzorků a standardů. Uvedené koncentrace jsou konečné koncentrace v jamce. Hvězdička specifikuje omezené experimentální uspořádání pro tyto kombinace.

Pokus	Enzymy	Koncentrace substrátu ( $\mu\text{M}$ )	Koncentrace MUF ( $\mu\text{M}$ )	Inhibitor	Koncentrace inhibitoru ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )
1	fosfatáza celobio- hydroláza*	100 350 1000 3500	0 5 10 20	sphagnan* pektin z bělomechu HMW HS LMW HS kyselina tříslová* kyselina gallová kyselina sphagnová kyselina 4- hydroxybenzoová	0 2 5 10 20 50
2	fosfatáza	100 350 1000 3500	0 25	jako v pokusu 1	0 0,5 2 10
3	fosfatáza beta- glukosidáza	100 200 500 1500	0 25	sphagnan HMW HS kyselina tříslová kyselina sphagnová	0 50

Fluorescence na fluorimetrech SPARK a Infinite F200 (Tecan, Švýcarsko) byla v 1. pokusu změřena po 30, 90 a 150 minutách, ve 2. pokusu po 10, 20, 30, 60, 90, 120 a 150 minutách a ve 3. pokusu 10, 20, 30, 60, 90 a 150 minutách. Pokud nějaká změřená hodnota ze tří opakování byla zjevně chybná, byla vymazána. Chybné změření hodnoty může být způsobené chybovostí fluorimetru (v časové řadě pro danou jamku je obvykle jedna vychýlená hodnota fluorescence) či nečistotou v mikrotitrační destičce (fluorescence v jednom ze tří opakování má v čase systematicky jinou hodnotu). Detekce potenciálně chybných hodnot byla provedena tak, že se ze tří naměřených hodnot spočítal variační koeficient (směrodatná odchylka dělená průměrem) a pokud byla jeho hodnota větší než 10 %, provedla se kontrola této trojice opakování.

## 7.5 Vyhodnocení dat

V 1. a 2. pokusu byla aktivita enzymu na jamku (v  $\mu\text{g MUF h}^{-1}$ ) spočítána standardně pomocí blanků a kalibračních standardů:

$$\frac{(\text{fluorescence vzorku} - \text{fluorescence blanku} - \text{průsečík kalibrační křivky}) / \text{směrnice kalibrační křivky} (\mu\text{g MUF}^{-1})}{\text{čas (h)}}$$

Protože především v 1. pokusu docházelo u vzorků s vysokou enzymatickou aktivitou ke zpomalování rychlosti reakce v čase (Obr. 1, Obr. 2), byla místo průměrné aktivity enzymu počítána aktivita maximální, vyjádřená nejvyšší směrnicí vyprodukovaného MUF v čase, obvykle ve 30 minutách. Ve druhém pokuse byla spočítána aktivita enzymu pouze za první hodinu měření. V tomto čase nebylo měření ovlivněno zpomalováním rychlosti reakce.

Ve 3. pokusu byla vysoká požadovaná fluorescence vzorku oproti jeho enzymatické aktivitě, proto byla aktivita enzymu na jamku vypočítána bez započtení průsečíku kalibrační křivky, ale se započtením extrapolace fluorescence v čase nula:

$$\frac{((\text{fluorescence vzorku} - \text{fluorescence blanku}) - (\text{extrapolace fluorescence vzorku v čase } t = 0 - \text{extrapolace fluorescence blanku v čase } t = 0)) / \text{směrnice kalibrační křivky}}{\text{čas (h)}}$$

Inhibiční aktivita inhibitoru byla vyčíslena jako procento inhibice enzymatické aktivity vyjádřené vůči variantě s nulovou koncentrací inhibitoru:

$$100 - (\text{aktivita enzymu s přidáním inhibitorem} / \text{aktivita enzymu varianty s nulovou koncentrací inhibitoru} \times 100)$$

Následně byl spočítán průměr inhibiční aktivity inhibitoru pro dané koncentrace inhibitoru z hodnot inhibičních aktivit spočítaných pro jednotlivé koncentrace substrátů. Protože v 1. pokusu docházelo k systematickému snížení enzymatické aktivity při nejvyšších koncentracích substrátu (3500  $\mu\text{M}$ ) bez inhibitoru (Obr. 1), nebyly do průměru míry inhibice hodnoty při této koncentraci substrátu započítány. Pro porovnání inhibičního potenciálu inhibitorů byla maximální míra inhibice fosfatázy v pokusech 1 a 2 spočtena jako průměr čtyř, resp. tří maximálních hodnot inhibice napříč koncentracemi substrátu a inhibitoru, aby nedošlo k podhodnocení vlivem snížené enzymatické aktivity při nejvyšších koncentracích substrátu.

Statisticky byly inhibiční aktivity inhibitoru vyhodnoceny pomocí vícecestné faktoriální analýzy variance (ANOVA). V prvním experimentu to byla čtyřcestná ANOVA (faktory *inhibitor*, *koncentrace inhibitoru*, *koncentrace substrátu* a *pH*) pro každý z testovaných enzymů zvlášť (inhibice celobiohydrolázy byla testována pouze dvěma inhibitory oproti osmi u fosfatázy), v druhém experimentu třícestná ANOVA (faktory *inhibitor*, *koncentrace inhibitoru* a *koncentrace substrátu*) a ve třetím experimentu čtyřcestná ANOVA (faktory *enzym*, *inhibitor*, *extrakt* a *koncentrace substrátu*). Hladina statistické významnosti  $\alpha$  je standardních 0,05. V rámci pokusu 1 a 2 byl maximální inhibiční potenciál jednotlivých inhibitorů porovnán jednocestnou ANOVou s následným Tukeyho testem. Data byla vyhodnocena pomocí programu Statistica (v. 13.5, TIBCO Software).

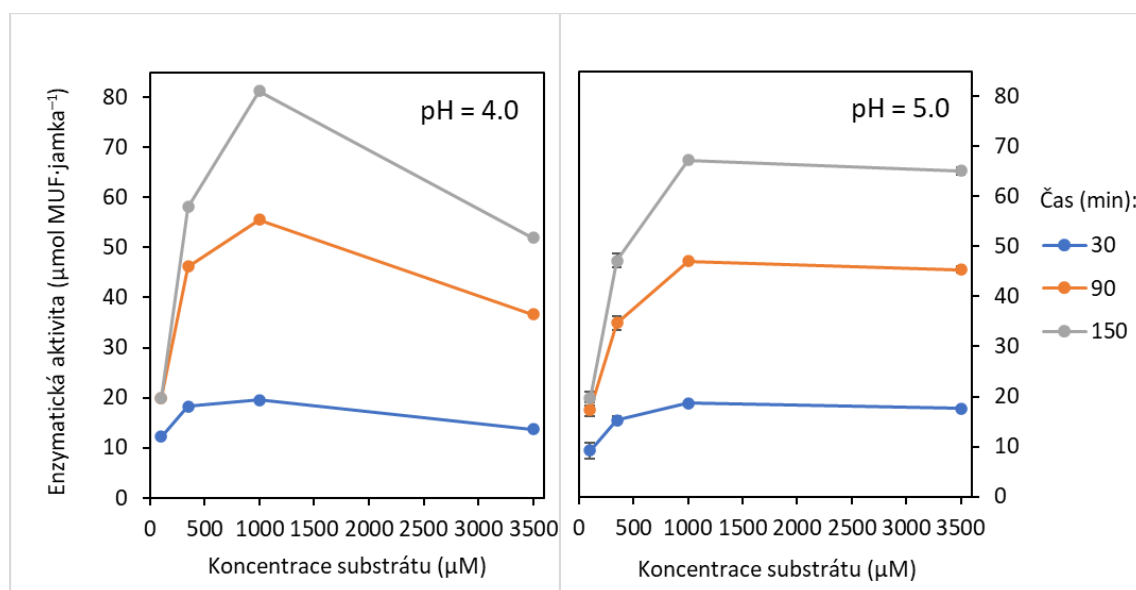


## 8 Výsledky

### 8.1 Vliv mechových pektinů a fenolických látek na enzymatickou aktivitu čistých enzymů

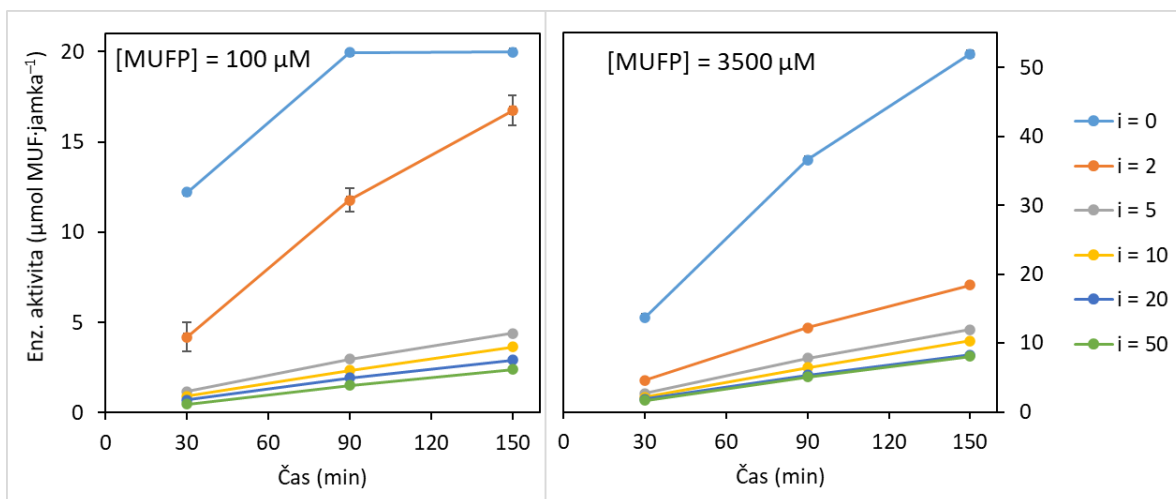
#### 8.1.1 Fosfatáza

Při vysokých koncentracích substrátu docházelo k zpomalení rychlosti enzymatické reakce, aniž by byl přidán inhibitor (Obr. 1). Proto nebyly do průměru míry inhibice hodnoty při této koncentraci substrátu započítány.



Obr. 1 Reprezentativní graf enzymatické aktivity (množství vyprodukovaného MUF na jamku) enzymem fosfatázou po 30, 90 a 150 minutách bez přidaného inhibitoru, při pH 4 a 5. Příklad jedné série, při které byl testován vliv sphagnanu jako jednoho z osmi inhibitorů. Vyneseny průměry  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ .

Při vysokých rychlostech enzymatických reakcí se rychlost enzymatické reakce v čase snižovala. U nejnižší koncentrace substrátu bez inhibitoru došlo po 90 minutách až k zastavení reakce (Obr. 2).



Obr. 2 Reprezentativní graf množství vyprodukovaného MUF na jamku enzymem fosfatázou v čase pro jednotlivé koncentrace sphagnanu coby inhibitoru ( $i$ ;  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Koncentrace substrátu = 100 a 3500  $\mu\text{M}$ ;  $\text{pH} = 4$ . Vyneseny průměry  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ .

Čtyřcestná analýza variance prokázala (Obr. P 1) rozdíly uvnitř všech faktorů (*inhibitor*, *koncentrace inhibitoru*, *koncentrace substrátu* a *pH*) a všech interakcí kromě interakce všech čtyř faktorů (Tab. 2). Inhibice při  $\text{pH} 4$  byla v průměru o 2,3 procentního bodu vyšší (52,5 %) než u  $\text{pH} 5$ , ale tři z osmi testovaných inhibitorů působily vyšší inhibici při  $\text{pH} 5$  (kyselina třísllová, sphagnová a gallová; průkazná interakce *inhibitor*  $\times$  *pH*). Při  $\text{pH} 5$  a nejnižší koncentraci inhibitorů 2  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  však byla inhibice vyšší (průkazná interakce *koncentrace inhibitoru*  $\times$  *pH*), především díky kyselině třísllové a monomerním fenolům (průkazná interakce *inhibitor*  $\times$  *koncentrace inhibitoru*  $\times$  *pH*; Obr. 3). Míra inhibice rostla s koncentrací substrátu pouze u přidavků monomerních fenolů, a to pouze mírně (interakce *inhibitor*  $\times$  *koncentrace substrátu*)

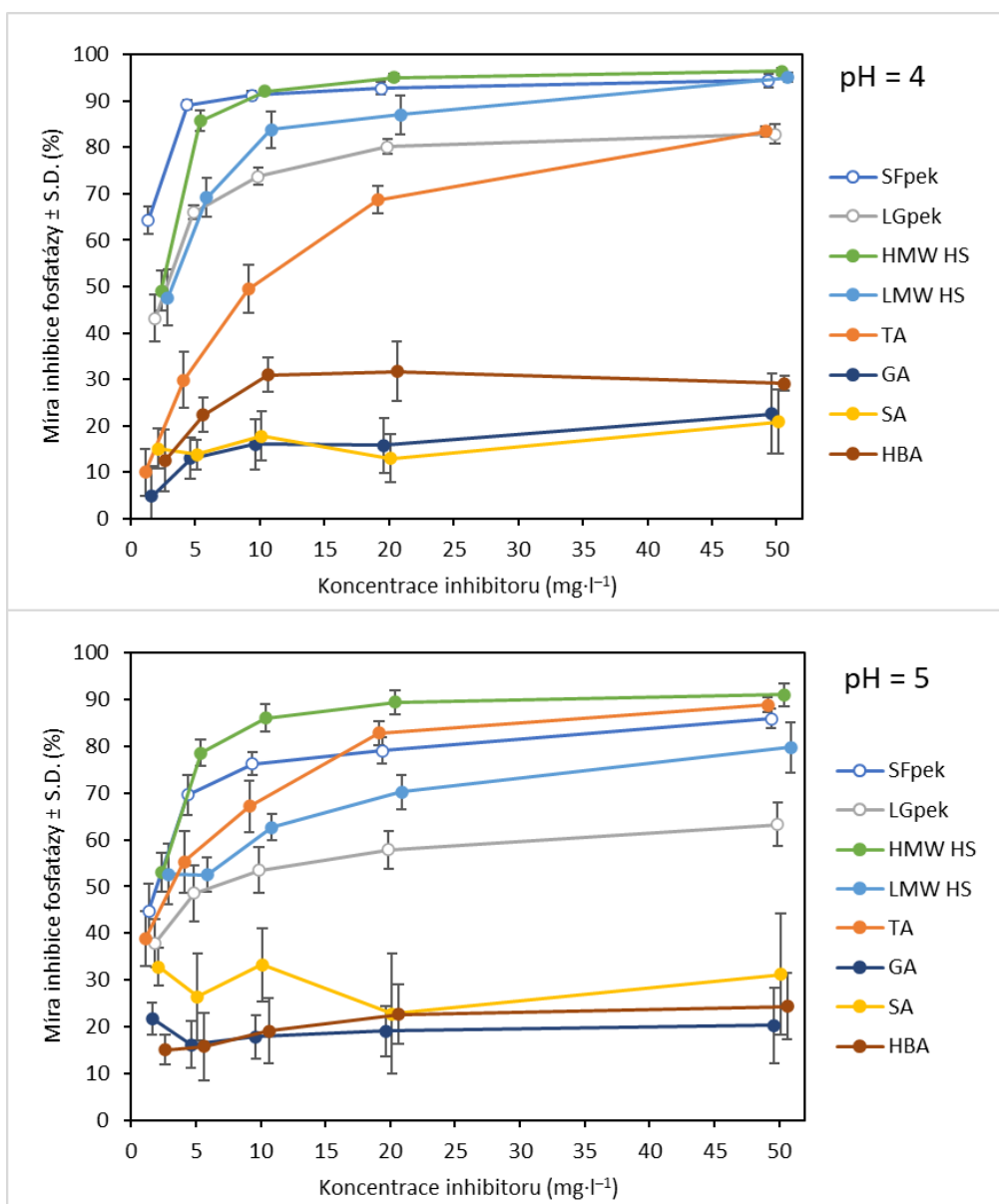
Tab. 2 Výsledek plně faktoriální čtyřcestné ANOVy testující vliv faktorů *inhibitor*, *koncentrace inhibitoru*, *koncentrace substrátu* a *pH* na míru inhibice fosfatázy.

<b>Efekt</b>	<b>D.f.</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Inhibitor	7	64303	5507,8	< <b>0,0001</b>
[Inhibitor]	4	18467	1581,7	< <b>0,0001</b>
pH	1	1018	87,2	< <b>0,0001</b>
[Substrát]	2	278	23,8	< <b>0,0001</b>
Inhibitor × [Inhibitor]	28	1381	118,3	< <b>0,0001</b>
Inhibitor × pH	7	3942	337,6	< <b>0,0001</b>
[Inhibitor] × pH	4	868	74,3	< <b>0,0001</b>
Inhibitor × [Substrát]	14	212	18,2	< <b>0,0001</b>
[Inhibitor] × [Substrát]	8	103	8,9	< <b>0,0001</b>
pH × [Substrát]	2	165	14,1	< <b>0,0001</b>
Inhibitor × [Inhibitor] × pH	28	117	10,0	< <b>0,0001</b>
Inhibitor × [Inhibitor] × [Substrát]	56	35	3,0	< <b>0,0001</b>
Inhibitor × pH × [Substrát]	14	218	18,7	< <b>0,0001</b>
[Inhibitor] × pH × [Substrát]	8	47	4,0	<b>0,0001</b>
Inhibitor × [Inhibitor] × pH × [Substrát]	56	9	0,8	0,91
Error	480	12		

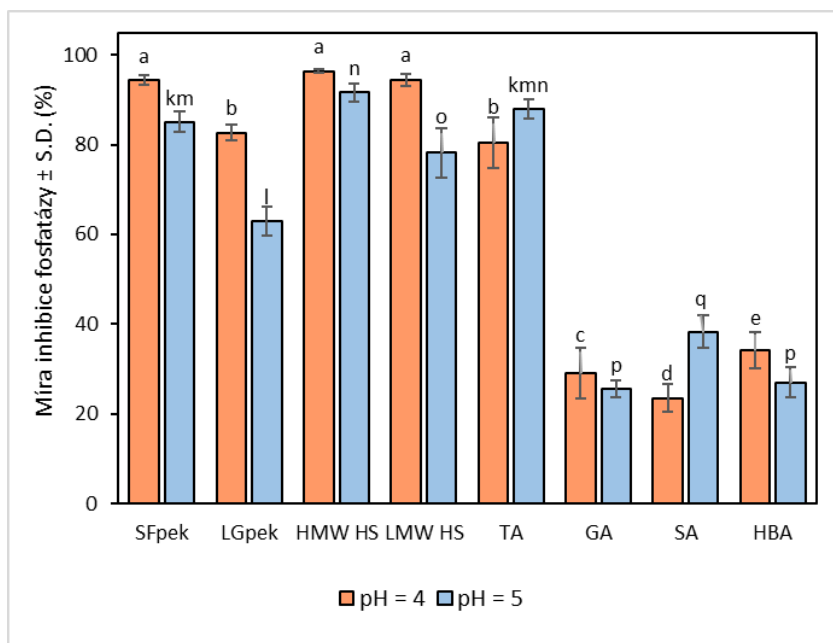
Celkově byla schopnost sphagnanu inhibovat fosfatázovou aktivitu při hladině pH 4 srovnatelná s huminovými látkami z rašelinné vody a při pH 5 kyselinou tříslovou (Obr. 4). Při nejnižší testované koncentraci inhibitoru dosahovala míra inhibice (Obr. 3, Tab. P 1, Tab. P 2) sphagnanem 64 % (pH 4) a 45 % (pH 5), huminovými látkami z rašelinné vody kolem 50 % a kyselinou tříslovou 10 % (pH 4) a 39 % (pH 5). Při nejvyšší koncentraci inhibitoru se navýšila míra inhibice sphagnanem na 94 % (pH 4) a 86 % (pH 5) a kyselinou tříslovou na 83 % (pH 4) a 89 % (pH 5). Kyselina tříslová měla mezi všemi testovanými látkami nejvýraznější koncentrační závislost. Huminové látky inhibovaly fosfatázu při své nejvyšší koncentraci a při hladině pH 4 zhruba z 96 %, při hladině pH 5 byla míra inhibice způsobená LMW HS 80 % a HMW HS 91 %.

Pektin z bělomechu měl oproti sphagnanu v obou pH inhibiční aktivitu statisticky průkazně nižší (Obr. 4). Při nejnižší koncentraci inhibitoru představovala míra inhibice tímto pektinem 43 % (pH 4) a 38 % (pH 5), která stoupala s koncentrací až na 83 % (pH 4) a 63 % (pH 5) (Obr. 3).

Všechny monomerní fenolické látky měly výrazně nižší, zhruba třetinovou inhibiční aktivitu oproti všem polymerním látkám i oligomerní kyseliny tříslové (Obr. 4). Inhibice fosfatázy monomerními fenolickými látkami (kyselinou gallovou, kyselinou sphagnovou a kyselinou 4-hydroxybenzoovou) nepřesáhla 33 % (Obr. 3).



Obr. 3 Míra inhibice fosfatázy sphagnanem (SFpek), pektinem izolovaným z *Leucobryum glaucum* (LGpek), vysoko- a nízkomolekulárními huminovými látkami (HMW HS a LMW HS), kyselinou tříslovou (TA), kyselinou gallovou (GA), kyselinou sphagnovou (SA) a kyselinou 4-hydroxybenzoovou (HBA) v závislosti na jejich koncentraci při pH 4 a 5. Vyneseny průměry (přes 3 koncentrace substrátu)  $\pm$  S.D.,  $n = 9$ . Koncentrace inhibitorů byla 2, 5, 10, 20 a 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (datové řady byly vůči sobě na ose x mírně posunuty, aby se chybové úsečky nepřekrývaly).



Obr. 4 Maximální míra inhibice fosfatázy (%) sphagnanem (SFpek), pektinem izolovaným z *Leucobryum glaucum* (LGpek), vysoko- a nízkomolekulárními huminovými látkami (HMW HS a LMW HS), kyselinou tříslovou (TA), kyselinou gallovou (GA), kyselinou sphagnovou (SA) a kyselinou 4-hydroxybenzoovou (HBA) při pH 4 a 5. Vyneseny průměry ± S.D.,  $n = 12$ . Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky průkazné rozdíly mezi testovanými inhibitory při dané hladině pH (jednocestná ANOVA  $p < 0,0001$ , Tukeyho test).

### 8.1.2 Celobiohydroláza

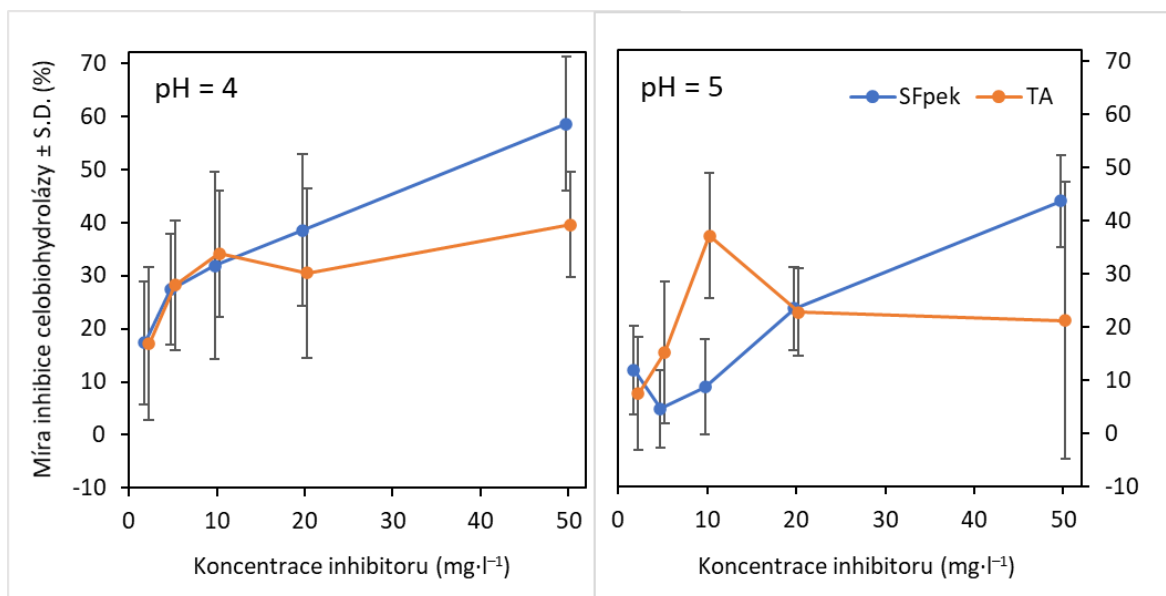
U kontrolních variant (bez přídavku inhibitoru) byly enzymatické aktivity čisté celobiohydrolázy zhruba 200× nižší oproti čisté fosfatáze, proto jsou výsledky zatíženy vyšší variabilitou.

Čtyřcestná analýza variance (Tab. 3, Obr. P 2) neprokázala rozdíl mezi inhibitory (sphagnanem a kyselinou tříslovou). Oproti fosfatáze byla inhibice celobiohydrolázy v průměru výrazně větší při pH 4 než při pH 5 (32,3 vs 19,6), výrazněji u sphagnanu (průkazná interakce *inhibitor* × *pH*). Zatímco při pH 4 míra inhibice oběma inhibitory vzrůstala s jejich koncentrací, při pH 5 začíná míra inhibice sphagnanem narůstat až při jeho koncentraci 20 mg·l<sup>-1</sup> (průkazná interakce *inhibitor* × *koncentrace inhibitoru* × *pH*). Při koncentraci sphagnanu 2 mg·l<sup>-1</sup> dosahovala míra inhibice celobiohydrolázy pouze 17 % (pH 4) a 12 % (pH 5) a při nejvyšší koncentraci (50 mg·l<sup>-1</sup>) vzrostla na 59 % (pH 4) a 44 % (pH 5) (Obr. 5, Tab. P 3). Inhibice celobiohydrolázy kyselinou tříslovou se při koncentracích 5–50 mg·l<sup>-1</sup> výrazně nelišila, nabývala maximálně 40 % (pH 4) a 37 % (pH 5). Oproti fosfatáze inhibice

s koncentrací substrátu spíše klesala, zejména u přidavků sphagnanu (interakce *inhibitor* × *koncentrace substrátu*) a zejména při pH 4 (*interakce inhibitor* × *koncentrace substrátu* × *pH*).

Tab. 3 Výsledek plně faktoriální čtyřcestné ANOVy testující vliv faktorů *inhibitor*, *koncentrace inhibitoru*, *koncentrace substrátu* a *pH* na míru inhibice celobiohydrolázy.

<b>Efekt</b>	<b>D.f.</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Inhibitor	1	98	0,9	0,35
[Inhibitor]	4	5257	47,6	< <b>0,0001</b>
pH	1	9699	87,8	< <b>0,0001</b>
[Substrát]	3	2575	23,3	< <b>0,0001</b>
Inhibitor × [Inhibitor]	4	2145	19,4	< <b>0,0001</b>
Inhibitor × pH	1	760	6,9	<b>0,0095</b>
[Inhibitor] × pH	4	230	2,1	0,09
Inhibitor × [Substrát]	3	825	7,5	< <b>0,0001</b>
[Inhibitor] × [Substrát]	12	83	0,7	0,70
pH × [Substrát]	3	581	5,3	<b>0,0017</b>
Inhibitor × [Inhibitor] × pH	4	458	4,1	<b>0,0032</b>
Inhibitor × [Inhibitor] × [Substrát]	12	92	0,8	0,61
Inhibitor × pH × [Substrát]	3	531	4,8	<b>0,0031</b>
[Inhibitor] × pH × [Substrát]	12	132	1,2	0,29
Inhibitor × [Inhibitor] × pH × [Substrát]	12	110	1,0	0,46
Error	160	110		



Obr. 5 Míra inhibice aktivity enzymu celobiohydrolázy sphagnanem (SFpek) a kyselinou tříslovou (TA) v závislosti na jejich koncentraci při pH 4 a 5. Vyneseny průměry (přes 4 koncentrace substrátu)  $\pm$  S.D.,  $n = 12$ . Koncentrace inhibitorů byla 2, 5, 10, 20, a 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (datové řady byly vůči sobě na ose x mírně posunuty, aby se chybové úsečky nepřekrývaly).

## 8.2 Vliv mechových pektinů a fenolických látek na aktivitu čisté fosfatázy srovnatelnou s environmentálními vzorky

Třicetná analýza variance (Obr. P 3) prokázala rozdíly uvnitř všech faktorů (*inhibitor*, *koncentrace inhibitoru* a *koncentrace substrátu*) a všech jejich interakcí. Míra inhibice aktivity enzymu sphagnanem, pektinem izolovaným z *Leucobryum glaucum*, huminovými rašelinnými látkami a kyselinou tříslovou rostla se zvyšující se koncentrací inhibitoru, u monomerních fenolů však nikoli (průkazná interakce *inhibitor*  $\times$  *koncentrace inhibitoru*; Obr. 6, Tab. 4).

Míra inhibice fosfatázy pektiny o koncentraci 0,5  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  dosahovala hodnoty při použití sphagnanenu 78 % a pektinu izolovaného z *Leucobryum glaucum* 44 %. Míra inhibice sphagnanem se postupně navyšovala až na 87 % a pektinem izolovaným z *Leucobryum glaucum* na 71 % (Obr. 6, Tab. P 4).

U koncentrace inhibitoru HMW HS  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  byla zjištěna míra inhibice 84 % a LMW HS o téže koncentraci 70 %. Míra inhibice huminovými látkami byla maximálně 95 % (Obr. 6, Tab. P 4). Inhibice fosfatázy monomerními fenolickými látkami (kyselinou sphagnovou, gallovou a 4-hydroxybenzoová) nepřesáhla 20 % (Obr. 6, Obr. 7, Tab. P 4).

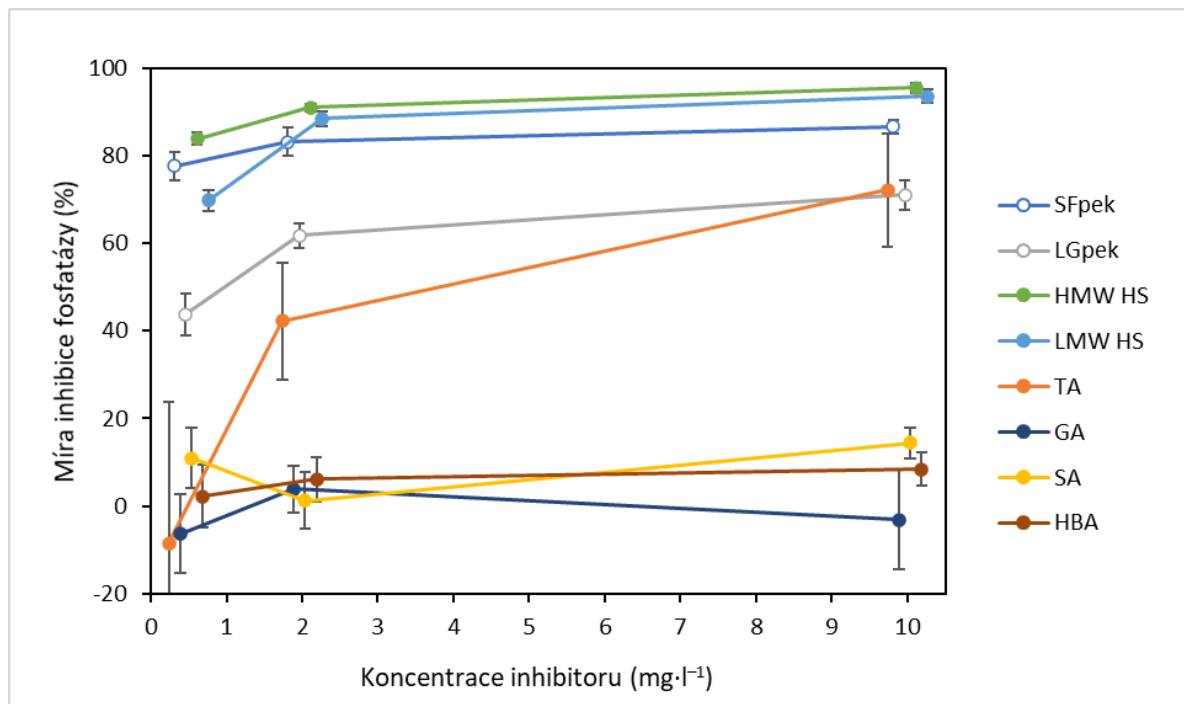
Vliv koncentrace substrátu na míru inhibice byl zanedbatelný, kromě kyseliny tříslové, který při jejich nízkých koncentracích prudce rostl (interakce *inhibitor*  $\times$  *koncentrace substrátu*  $\times$  *koncentrace inhibitoru*), přičemž nejnížší koncentrací kyseliny tříslové ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) při nejnížší koncentraci substrátu ( $100 \mu\text{M}$ ) byla enzymatická aktivita výrazně stimulována (míra inhibice  $-51 \%$ ); při nejvyšších koncentracích substrátu i kyseliny tříslové míra inhibice narostla až na 82 %.

Oproti předchozímu experimentu s vyšší koncentrací fosfatázy byla maximální míra inhibice sphagnanem i pektinem z bělomechu mírně snižena (Obr. 7); totožná byla v případě obou frakcí huminových látek a výrazněji snižena v případě monomerních fenolických látek.

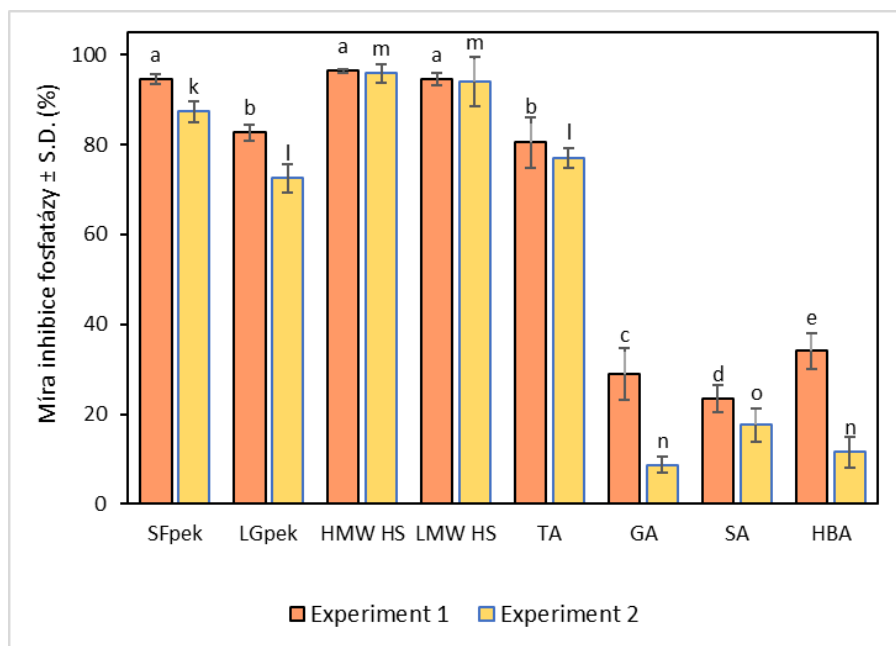
Tab. 4 Výsledek plně faktoriální třicetné ANOVy testující vliv faktorů *inhibitor*, *koncentrace inhibitoru* a *koncentrace substrátu* na míru inhibice fosfatázy, jejíž neinhibovaná aktivita je srovnatelná s environmentálními vzorky z rašeliny.

<b>Efekt</b>	<b>D.f.</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Inhibitor	7	50776	4842,3	< <b>0,0001</b>
[Substrát]	3	827	78,9	< <b>0,0001</b>
[Inhibitor]	2	10229	975,5	< <b>0,0001</b>
Inhibitor $\times$ [Inhibitor]	21	247	23,5	< <b>0,0001</b>
Inhibitor $\times$ [Inhibitor]	14	2044	194,9	< <b>0,0001</b>
[Inhibitor] $\times$ [Substrát]	6	296	28,2	< <b>0,0001</b>
Inhibitor $\times$ [Inhibitor] $\times$ [Substrát]	42	171	16,3	< <b>0,0001</b>
Error	181	10		





Obr. 6 Míra inhibice fosfatázy, jejíž aktivita je srovnatelná s environmentálními vzorky, sphagnanem (SFpek), pektinem izolovaným z *Leucobryum glaucum* (LGpek), vysoko a nízkomolekulárními huminovými látkami (HMW HS a LMW HS), kyselinou tříslovou (TA), kyselinou gallovou (GA), kyselinou sphagnovou (SA) a kyselinou 4- hydroxybenzoovou (HBA) v závislosti na jejich koncentraci. Vyneseny průměry (přes 4 koncentrace substrátu)  $\pm$  S.D.,  $n = 12$ . Koncentrace inhibitorů byla 0,5, 2 a 10 mg·l<sup>-1</sup> (datové řady byly vůči sobě na ose x mírně posunuty, aby se chybové úsečky nepřekrývaly).



Obr. 7 Maximální míra inhibice fosfatázy (%) sphagnanem (SFpek), pektinem izolovaným z *Leucobryum glaucum* (LGpek), vysoko- a nízkomolekulárními huminovými látkami (HMW HS a LMW HS), kyselinou tříslovou (TA), kyselinou gallovou (GA), kyselinou sphagnovou (SA) a kyselinou 4-hydroxybenzoovou (HBA) v experimentu 1 a 2 (při vyšší a nižší koncentraci čistého enzymu). Vyneseny průměry  $\pm$  S.D.,  $n = 9$ . Rozdílná písmena nad sloupci značí statisticky průkazné rozdíly mezi testovanými inhibitory v daném experimentu (jednocestná ANOVA  $p < 0,0001$ , Tukeyho test).

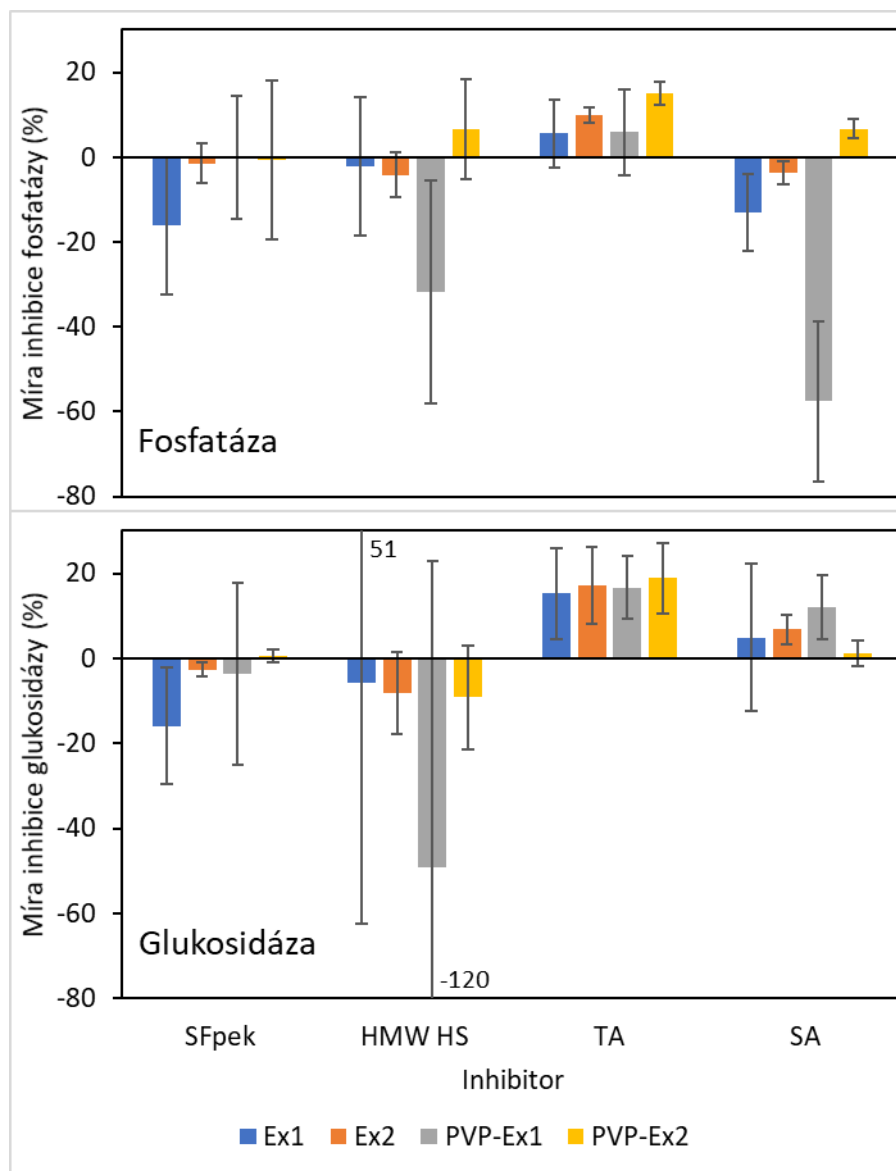
### 8.3 Vliv sphagnanu a vybraných fenolických látek na aktivitu hydrolytických enzymů v extraktech z rašelinného prostředí

Plně faktoriální uspořádání experimentu umožnilo zahrnout do statistického vyhodnocení i faktor enzym. Čtyřcestná analýza variance (Obr. P 4) prokázala rozdíly uvnitř všech faktorů (*enzym, inhibitor, extrakt a koncentrace substrátu*) a většiny jejich interakcí. Enzymatické aktivity extraktů byly jen minimálně inhibovány přidávkou inhibitorů (Tab. P 5, Tab. P 6), častěji enzymatické aktivity stimulovaly. Pouze kyselina tříslová měla v průměru kladné hodnoty míry inhibice (13 %; průkazný vliv faktoru inhibitor, Tab. 5, Obr. 8). Největší rozdíl v míře inhibice obou enzymů působila kyselina sphagnová, která aktivitu fosfatázy stimulovala (míra inhibice  $-17$  %), ale aktivitu beta-glukosidázy inhibovala (6 %; interakce *enzym  $\times$  inhibitor*). U beta-glukosidázy se výrazněji projevila inhibice fenolickými inhibitory při nižších koncentracích substrátu; HMW HS pak silně stimulovala enzymatickou aktivitu při nejvyšší koncentraci substrátu (míra inhibice  $-56$  %; interakce *enzym  $\times$  inhibitor  $\times$*

[substrát]). Za touto stimulací jsou extrakty z mladé vrchovištní rašeliny Ex1 a zejména Ex1-PVP (ačkoli interakce všech faktorů není statisticky průkazná).

Tab. 5 Výsledek plně faktoriální čtyřcestné ANOVy testující vliv faktorů *enzym*, *inhibitor*, *extrakt* a *koncentrace substrátu* na míru inhibice fosfatázy a beta-glukosidázy v extraktech z rašeliny.

<b>Efekt</b>	<b>D.f.</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Enzym	2103	1	2103	<b>0,0041</b>
Inhibitor	35822	3	11941	<b>&lt; 0,0001</b>
Extrakt	19697	3	6566	<b>&lt; 0,0001</b>
[Substrát]	15286	3	5095	<b>&lt; 0,0001</b>
Enzym × Inhibitor	14678	3	4893	<b>&lt; 0,0001</b>
Enzym × Extrakt	3337	3	1112	<b>0,0047</b>
Inhibitor × Extrakt	22965	9	2552	<b>&lt; 0,0001</b>
Enzyme × [Substrát]	6941	3	2314	<b>&lt; 0,0001</b>
Inhibitor × [Substrát]	12907	9	1434	<b>&lt; 0,0001</b>
Extrakt × [Substrát]	9271	9	1030	<b>0,0001</b>
Enzym × Inhibitor × Extrakt	17045	9	1894	<b>&lt; 0,0001</b>
Enzym × Inhibitor × [Substrát]	7153	9	795	<b>0,0012</b>
Enzym × Extrakt × [Substrát]	3603	9	400	0,12
Inhibitor × Extrakt × [Substrát]	8675	27	321	0,17
Enzym × Inhibitor × Extrakt × [Substrát]	8766	27	325	0,16
Error	62485	249	251	



Obr. 8 Míra inhibice fosfatázy a beta-glukosidázy (%) obsažené v extraktu z mladé vrchovištní rašeliny (Ex1), v extraktu z opadu borůvkového bultu (Ex2) a v těchto dvou extraktech po snížení koncentrace fenolických látek pomocí PVPP (PVP-Ex1, PVP-Ex2). Testovanými inhibitory byly sphagnan (SFpek), vysokomolekulární huminové látky (HMW HS), kyselina tříslivá (TA) a sphagnová (SA). Vyneseny průměry (přes 4 koncentrace substrátu)  $\pm$  S.D.,  $n = 12$ .

## 9 Diskuse

### 9.1 Vliv mechových pektinů a fenolických látek a pH na enzymatickou aktivitu čistých enzymů

Rašeliníkový pektin sphagnan se považuje za jednu z příčin pomalého rozkladu rašeliníkového opadu. Schopnost sphagnanu napomáhat pomalému rozkladu tohoto opadu by mohla spočívat v inhibici enzymatické aktivity. Už dříve se několik autorů zabíralo myšlenkou, že sphagnan inhibuje enzymatickou aktivitu tím, že reaguje s enzymy (Ballance et al., 2008, Hájek et al., 2011, Painter, 1991). Na základě toho jsem předpokládala, že sphagnan bude inhibovat enzymatickou aktivitu a že tato inhibice bude podobná inhibici oligomerní fenolickou látkou kyselinou tříslovou, která je známá svými inhibičními účinky (Rao et al., 1998, Tejirian a Xu, 2011).

K inhibici sphagnanem došlo při obou hladinách pH jak u čisté fosfatázy, tak u celobiohydrolázy. Míra inhibice fosfatázy dosahovala mnohem vyšších hodnot než inhibice celobiohydrolázy. Inhibice extracelulárních enzymů sphagnanem je způsobená reakcí disociovaných karboxylových skupin sphagnanu s kladně nabitými volnými aminoskupinami enzymu a projevuje se v roztocích s malou iontovou silou při hladině pH 2,0–4,8 (Ballance et al., 2008). Proto mohla být míra inhibice sphagnanem u obou enzymů vyšší při hladině pH 4 než při pH 5, kdy kladný náboj volných aminových skupin slábne. Naplnilo se i očekávání, že inhibice sphagnanem bude srovnatelná s inhibicí kyselinou tříslovou. Inhibice fosfatázy sphagnanem při pH 4 dosahovala dokonce i vyšších hodnot než inhibice kyselinou tříslovou.

Kvůli ověření, zda jsou inhibiční vlastnosti sphagnanu mezi pektiny jedinečné, byl zjišťován vliv i dalšího mechového pektinu na enzymatickou aktivitu. Ukázalo se, že i mechový pektin izolovaný z bělomechu (*Leucobryum glaucum*) inhibuje aktivitu fosfatázy při obou hladinách pH. To však popírá představu, že se sphagnan vyznačuje mezi mechovými pektiny jedinečnými inhibičními schopnostmi vůči enzymům. Inhibice pektinem izolovaným z *Leucobryum glaucum* byla menší zhruba o 20–30 % než inhibice sphagnanem. Stejně jako v případě sphagnanu i inhibice pektinem z *Leucobryum glaucum* dosahovala vyšších hodnot při hladině pH 4 než při pH 5.

Dále bylo předpokládáno, že inhibice oligomerní fenolickou látkou kyselinou tříslovou bude větší než inhibice monomerními (kyselinou sphagnovou, kyselinou gallovou a kyselinou 4-hydroxybenzoovou) a polymerními (LMW a HMW HS) fenolickými látkami. Inhibice fosfatázy kyselinou tříslovou se vskutku projevila ve vyšší míře než inhibice monomerními fenolickými látkami, pouze při hladině pH 4 a nejnižší koncentraci inhibitoru byla míra inhibice fosfatázy kyselinou tříslovou s inhibicí monomerními fenolickými látkami srovnatelná. Při nejvyšší koncentracích inhibitoru byl už vidět výrazný rozdíl v inhibici kyselinou tříslovou a monomerními fenolickými látkami. To potvrzuje, že oligomerní fenolické látky mají silnější inhibiční účinky než monomerní fenolické látky (Field a Lettinga, 1992). Tito autoři uvádí, že pro inhibici enzymů mají právě oligomerní fenolické látky optimální molekulovou hmotnost. Na rozdíl od monomerních fenolických látek jsou schopné vytvářet četné vodíkové vazby s enzymy. I Tejirian a Xu (2011) zabývající se inhibicí enzymatické celulólyzy fenolickými látkami došli k závěru, že oligomerní fenolické látky jsou silnějšími inhibitory než jednoduché fenolické látky. Kyselina tříslová měla větší vliv na fosfatázu než na celobiohydrolázu; vyšší afinitu této kyseliny k fosfatáze potvrzuje i Rao et al. (1998), kteří srovnali míru inhibice kyselinou tříslovou na kyselou fosfatázu (největší inhibice), na ureázu a invertázu (nejmenší inhibice).

Navzdory očekávání nenabývala míra inhibice fosfatázy kyselinou tříslovou vyšších hodnot než inhibice polymerními fenolickými látkami. Jedině při hladině pH 5 a koncentraci inhibitoru vyšší než  $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  převyšovala inhibice fosfatázy kyselinou tříslovou inhibici tohoto enzymu polymerními fenolickými látkami LMW HS. Vysokomolekulární frakce HMW HS měla překvapivě silné inhibiční účinky. Rašelinné huminové látky mají tak obecně velký potenciál inhibovat enzymy v rašelině. V tomto případě se jedná pouze o potenciál, protože testovaná fosfatáza pochází z pšenice.

U vysokých koncentracích substrátu, aniž by byl použit inhibitor, docházelo ke snižování rychlosti enzymatické reakce. Současně se enzymatická reakce zpomalovala v čase při vysokých rychlostech enzymatické reakce. Vodrážka (2002) upozorňuje na to, že v případě, kdy je substrát ve vysoké koncentraci, může u některých enzymů docházet k inhibici substrátem. Příčinnou této inhibice může být navázání více molekul substrátu do aktivního centra enzymu. Rao et al. (1998), kteří se zabývali vlivem kyseliny tříslové na činnost kyselou fosfatázy, zjistili, že při koncentraci substrátu vyšší než 1 mM došlo k inhibici substrátem. Při vyšších koncentracích kyseliny tříslové byl však účinek substrátové inhibice méně výrazný. Tento jev nedokázali Rao et al. (1998) vysvětlit. V experimentu

s čistou fosfatázou se snížení rychlosti enzymatické aktivity projevilo také při koncentraci substrátu vyšší než 1000  $\mu\text{M}$ . To ovšem nemusí jednoznačně znamenat, že nastala inhibice substrátem. Při vyšších koncentracích substrátu může docházet k tvorbě většího množství produktu, který rovněž může fungovat jako inhibitor (Rao et al., 1998, Vodrážka, 2002). Inhibice reakce produktem by mohla být příčinnou zpomalování enzymatické reakce v čase. Gerritse a Dijk (1978) uvádějí, že při koncentraci fosfátu, která je vyšší než 0,1 mM, dochází k silné inhibici kyselých a alkalických fosfatáz. Silná inhibice fosfatázy je možná při mnohem menších koncentracích fosfátu. Již fosfát o koncentraci 10  $\mu\text{M}$  inhiboval pšeničnou fosfatázu z 85 % (Hájek a Urbanová, nepublikovaná data).

## 9.2 Vliv sphagnanu a vybraných fenolických látek na aktivitu hydrolytických enzymů v extraktech z rašelinného prostředí

Na rozdíl od čistých enzymů diskutovaných výše, ani sphagnan, ani fenolické látky téměř neinhibovaly aktivity přirozených enzymů v rašelinných extraktech. U výluhu extrahovaných pomocí PVPP byla snížena pozadřová koncentrace fenolických látek. Proto by se dalo očekávat, že inhibice těchto vzorků použitými potenciálními inhibitory bude větší než inhibice vzorků, které nebyly extrahovány pomocí PVPP. Tato situace ovšem nastala pouze v některých případech. Nelze ovšem vyloučit, že extrakce PVPP snížila i koncentraci enzymů, a tedy že se molekulový poměr fenolických látek vůči enzymům výrazně nesnížil a jejich aktivita tak zůstala potlačena přirozenými inhibitory.

Oligomerní fenolická látka kyselina tříslová inhibovala oba zkoumané enzymy. Pro srovnání, nejvyšší hodnota inhibice fosfatázy kyselinou tříslovou o koncentraci 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  byla v rašelinných extraktech jen 15 % (Tab. P 5), zatímco míra inhibice čisté fosfatázy, jejíž neinhibovaná aktivita byla srovnatelná s environmentálními vzorky, dosahovala 72 % při koncentraci inhibitoru 10  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (Tab. P 4). Inhibice obou enzymů kyselinou tříslovou byla větší než inhibice monomerní fenolickou látkou kyselinou sphagnovou a polymerními fenolickými látkami HMW HS. Verhoeven a Toth (1995) navrhli, že kyselina sphagnová svým antibiotickým účinkem odpovídá za pomalý rozklad rašeliníků. Mellegård et al. (2009) však nezjistili výrazné antibakteriální účinky kyseliny sphagnové, neinhibovala růst zkoumaných bakteriálních kmenů. Kyselina sphagnová se neukázala ani jako silný inhibitor enzymů, které byly extrahované z rašelinného prostředí.

Freeman et al. (2001) se domnívají, že díky anaerobním podmínkám se v rašeliništi hromadí fenolické látky, protože za daných podmínek nemohou být rozkládány oxidativním enzymem fenol oxidázou. To má za následek inhibici hydroláz nahromaděnými fenolickými látkami. Podle studie Freeman et al. (2004) může už nízká koncentrace fenolických látek ( $2\text{--}5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) inhibovat hydrolázy o 16–47 %, konkrétně fosfatázu o 18 % a beta-glukosidázu o 26 %. Tento mechanismus tudíž může odpovídat za pomalou dekompozici a s ní související ukládání uhlíku v rašeliništi. Fenolické látky by tak mohly hrát důležitou roli v globálním cyklu uhlíku jeho hromaděním v rašeliništích. Ovšem několik dalších studií tento mechanismus nepotvrdilo (Hall et al., 2014, Urbanová a Hájek, 2021). K těmto studiím se přiklání i tato práce, jelikož zkoumané fenolické látky téměř neinhibovaly hydrolázy z rašelinného prostředí.

Experimenty s čistými enzymy sice ukázaly, že oligomerní a polymerní fenolické látky fungují jako silné inhibitory enzymatické aktivity, ale tyto inhibiční schopnosti se neprojeví vůči přirozeným enzymům z rašelinného prostředí. V mé práci byly použity fenolické látky (kyselina třísllová, kyselina sphagnová a HMW HS) o mnohem vyšší koncentraci ( $50\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) než ve studii Freeman et al. (2004), ale snižovaly činnost fosfatázy i beta-glukosidázy v menší míře (Tab. P 5, Tab. P 6), což podporuje hypotézu, že enzymatický aparát mikrobiálního společenstva rašeliniště dlouhodobě vystaveného vysokým koncentracím fenolických látek bude na toto prostředí adaptován a míra inhibice těchto enzymů se tudíž projeví v menší míře.

Tato rozdílná citlivost enzymů na koncentraci fenolických, respektive huminových látek vč. mechových pektinů může být dána typem rašelinišť, na jejichž prostředí je enzymatický aparát mikrobiálních společenstev adaptován. Urbanová a Hájek (2021) upozorňují na to, že zmíněné nízké koncentrace fenolických látek (Freeman et al., 2001 a 2004) mohou souviset s oceánickým charakterem tzv. pokryvných rašelinišť, kde dochází k vymývání rozpuštěných organických látek kvůli hojným srážkám. V této práci však pracuji s enzymy a huminovými látkami, které pochází ze subkontinentálních rašelinišť s vyššími koncentracemi fenolických látek. Urbanová a Hájek (2021) navrhují, že enzymatický aparát mikrobiálního společenstva, které je dlouhodobě vystaveno rašelinnému prostředí s vysokými koncentracemi fenolických látek, bude na toto prostředí adaptován. Již dříve byla prokázána schopnost mikrobiálního společenstva přizpůsobit svůj enzymatický aparát změnám v množství a charakteru rostlinných fenolických látek (Triebwasser et al., 2012).



Výsledky této práce nasvědčují tomu, že schopnost sphagnanu ani fenolických látek inhibovat enzymy se zásadně nepodílí na pomalé dekompozici rašeliny. Ovšem v této práci nebyly testovány další enzymy, jejichž nižší aktivita byla zastíněna značnou autofluorescencí testovaných inhibitorů. Současně, na rozdíl od fenolických látek, není známa skutečná koncentrace sphagnanu v rašelinném prostředí, kde je spolu s fenolickými látkami součástí rozpuštěných huminových látek. Lze očekávat, že fragmenty sphagnanu budou součástí makromolekul rozpuštěných huminových látek, neboť kyselé sacharidy (obsahující uronové kyseliny) jsou významnou složkou huminových látek v rašelinné vodě (Smidsrød a Painter, 1984). Na druhou stranu, hydrolýza obou testovaných frakcí huminových látek, HMW a LMW, prokázala jen malý podíl cukrů a nestanovitelné množství uronových kyselin (Hájek a Urbanová, nepublikovaná data). Doposud jsme uvažovali o sphagnanu v jeho volné formě, ale před jeho uvolněním během dekompozice odumřelých stélek rašeliníků je vázán ve formě kyselých pektinů buněčných stěn, kde by mohl působit obdobně (Painter, 1991). Tyto nejasnosti spolu s potvrzením velkého potenciálu sphagnanu v inhibici enzymů předurčují témata dalšího možného výzkumu.

## 10 Závěr

Experimenty s čistými enzymy potvrdily hypotézu, že rašeliníkový pektin sphagnan inhibuje enzymatickou aktivitu srovnatelně s oligomerní fenolickou látkou kyselinou tříslovou. Míra inhibice fosfatázy sphagnanem dokonce míru inhibice touto kyselinou převyšovala. Inhibice fosfatázy pektinem izolovaným z bělomechu (*Leucobryum glaucum*) však naznačuje, že tyto inhibiční schopnosti sphagnanu nejsou mezi pektiny jedinečné.

Byla potvrzena i hypotéza, že oligomerní fenolická látka kyselina tříslová bude více inhibovat enzymy než monomerní fenolické látky (kyselina sphagnová, kyselina gallová a kyselina 4-hydroxybenzoová). Pouze při nejnižší koncentraci inhibitoru byly míry inhibice čisté fosfatázy těmito látkami srovnatelné. Kyselina tříslová inhibovala více než kyselina sphagnová i enzymy v extraktech z rašelinného prostředí.

Dále bylo předpokládáno, že inhibice kyselinou tříslovou bude vyšší než inhibice polymerními fenolickými látkami, které byly reprezentované rozpuštěnými huminovými látkami z rašelinné vody (LMW a HMW HS) a že inhibiční účinek jejich vysokomolekulární frakce bude malý. Experimenty s čistými enzymy tuto hypotézu vyvrátily, pouze při hladině pH 5 došlo k vyšší inhibici čisté fosfatázy kyselinou tříslovou při koncentraci vyšší než  $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  než LMW HS. Maxima míry inhibice čisté fosfatázy HMW HS přesahovaly 90 %. Naopak inhibice enzymů v extraktech z rašelinného prostředí kyselinou tříslovou byla vyšší než inhibice polymerními fenolickými látkami HMW HS, které jen zanedbatelně inhibovaly fosfatázu.

Experiment s enzymy v extraktu z rašelinného prostředí ukázal, že míra jejich inhibice je výrazně nižší (přecházející až do stimulace enzymatické aktivity) než míra inhibice čistých enzymů, které byly izolovány z jiných zdrojů. Tím se naplnilo očekávání, že enzymatický aparát přirozeného mikrobiálního společenstva rašeliníště bude adaptován na prostředí s vysokou koncentrací fenolických látek, kterému je toto mikrobiální společenstvo dlouhodobě vystaveno. Výsledky naznačily, že tento enzymatický aparát může být rovněž adaptován na přítomnost sphagnanu. Během experimentů s čistými enzymy se sice ukázalo, že sphagnan má velký potenciál jako inhibitor enzymů, ovšem přirozené enzymy téměř neinhiboval. Podle těchto výsledků nemají inhibiční schopnosti sphagnanu zásadní vliv na dekompozici rašeliny. Nebyl však zkoumán vliv sphagnanu na další enzymy a není známa ani jeho přibližná koncentrace v rašeliníšti.

## 11 Literatura

Allison SD, Vitousek PM (2005) Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biology and Biochemistry* 37:937 – 944

Arbeli Z, Fuentes CL (2007) Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. *FEMS Microbiology Letters* 272:269 – 275

Baldrian P (2009) Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant Soil and Environment* 55:370 – 378

Ballance S, Børsheim KY, Inngjerdingen K, Paulsen BS, Christensen BE (2007) A re-examination and partial characterisation of polysaccharides released by mild acid hydrolysis from the chlorite-treated leaves of *Sphagnum papillosum*. *Carbohydrate Polymers* 67:104 – 115

Ballance S, Kristiansen KA, Holt J, Christensen BE (2008) Interactions of polysaccharides extracted by mild acid hydrolysis from the leaves of *Sphagnum papillosum* with either phenylhydrazine, o-phenylenediamine and its oxidation products or collagen. *Carbohydrate Polymers* 71:550 – 558

Børsheim KY, Christensen BE, Painter TJ (2001) Preservation of fish by embedment in *Sphagnum* moss, peat or holocellulose: experimental proof of the oxopolysaccharidic nature of the preservative substance and of its antimicrobial and tanning action. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2:63 – 74

Box JD (1983) Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research* 17:511 – 525

van Breemen N (1995) How *Sphagnum* bogs down other plants. *Trends in Ecology and Evolution* 10:270 – 275

Cheyrier V (2012) Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews* 11:153 – 177

Chrost RJ, Krambeck HJ (1986) Fluorescence correction for measurements of enzyme activity in natural waters using methylumbelliferyl-substrates. *Archiv für Hydrobiologie* 106:79 – 90

Clymo RS, Hayward PM (1982) The Ecology of *Sphagnum*. In: Smith AJE (ed.) Bryophyte Ecology. Springer, Dordrecht

Deng S, Kang H, Freeman C (2011) Microplate Fluorimetric Assay of Soil Enzymes. In: Dick RP (ed.) Methods of Soil Enzymology. Soil Science Society of America, Madison

Deng S, Popova I (2011) Carbohydrate Hydrolases. In: Dick RP (ed.) Methods of Soil Enzymology. Soil Science Society of America, Madison

Dunn C, Jones TG, Girard A, Freeman C (2014) Methodologies for Extracellular Enzyme Assays from Wetland Soils. Wetlands 34:9 – 17

Dobrovol'skaya TG, Golovchenko AV, Zvyagintsev DG (2014) Analysis of Ecological Factors Limiting the Destruction of High-Moor Peat. Eurasian Soil Science 47:182 – 193

Field JA, Lettinga G (1992) Toxicity of tannic compounds to microorganisms. In: Hemingway RW, Laks PE (ed.) Plant Polyphenols. Plenum Press, New York

Freeman C, Liska G, Ostle NJ, Jones SE, Lock MA (1995) The use of fluorogenic substrates for measuring enzyme activity in peatlands. Plant and Soil 175:147 – 152

Freeman C, Ostle N, Kang H (2001) An enzymic 'latch' on a global carbon store. Nature 409:149

Freeman C, Ostle NJ, Fenner N, Kang H (2004) A regulatory role for phenol oxidase during decomposition in peatlands. Soil Biology and Biochemistry 36:1663 – 1667

Frolking S, Roulet NT, Moore TR, Richard PJH, Lavoie M, Muller SD (2001) Modeling Northern Peatland Decomposition and Peat Accumulation. Ecosystems 4:479 – 498

Gerritse RG, van Dijk H (1978) Determination of phosphatase activities of soils and animal wastes. Soil Biology and Biochemistry 10:545 – 551

Gianfreda L, Ruggiero P (2006) Enzyme Activities in Soil. In: Nannipieri P, Smalla K (ed.) Nucleic Acids and Proteins in Soil. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Gonçalves S, Romano A (2017) Inhibitory Properties of Phenolic Compounds Against Enzymes Linked with Human Diseases. In: Soto-Hernandez M, Palma-Tenango M, Garcia-Mateos MR (ed.) Phenolic Compounds - Biological Activity. InTech, Rijeka

Hall SJ, Treffkorn J, Silver WL (2014) Breaking the enzymatic latch: impact of reducing conditions on hydrolytic enzyme activity in tropical forest soils. *Ecology* 95:2964 – 2973

Hájek T, Ballance S, Limpens J, Zijlstra M, Verhoeven JTA (2011) Cell-wall polysaccharides play an important role in decay resistance of *Sphagnum* and actively depressed decomposition in vitro. *Biogeochemistry* 103:45–57

Hendel B, Marxsen J (2005) Fluorometric determination of the activity of  $\beta$ -glucosidase and other extracellular hydrolytic enzymes. In: Graça MAS, Bärlocher F, Gessner MO (ed.) *Methods to study litter decomposition: a practical guide*. Springer, Dordrecht

Hogg EH (1993) Decay potential of hummock and hollow *Sphagnum* peats at different depths in a Swedish raised bog. *Oikos* 66:269 – 278

Holden J (2005) Peatland hydrology and carbon release: why small-scale process matters. *Philosophical Transactions: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 363:2891 – 2913

Kandeler E, Tschirko D, Spiegel H (1999) Long-term monitoring of microbial biomass, N mineralisation and enzyme activities of a Chernozem under different tillage management. *Biology and Fertility of Soils* 28:343 – 351

Kiss S, Drăgan-Bularda M, Rădulescu D (1975) Biological Significance of Enzymes Accumulated in Soil. *Advances in Agronomy* 27:25 – 87

Kodíček M, Valentová O, Hynek R (2015) *Biochemie – chemický pohled na biologický svět*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha

Lattanzio V (2013) Phenolic Compounds: Introduction. In: Ramawat KG, Mérillon JM (ed.) *Natural Products*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Lavelle P, Spain AV (2001) *Soil ecology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht

Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66:506 – 577

Martin KR, Appel CL (2010) Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements* 2:1–12

Marx MC, Wood M, Jarvis SC (2001) A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33:1633 – 1640

Mellegård H, Stalheim T, Hormazabal V, Granum PE, Hardy SP (2009) Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against food-borne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 49:85 – 90

Míka V a kolektiv (2001) Fenolické látky v lučních rostlinách. Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha

Min K, Freeman C, Kang H, Choi SU (2015) The Regulation by Phenolic Compounds of Soil Organic Matter Dynamics under a Changing Environment. *BioMed Research International* 2015:Article ID 825098

Nichols JE, Peteet DM (2019) Rapid expansion of northern peatlands and doubled estimate of carbon storage. *Nature Geoscience* 12:917 – 921

Painter TJ (1983a) Residues of D-lyxo-5-hexosulopyranuronic acid in *Sphagnum* holocellulose, and their role in cross-linking. *Carbohydrate Research* 124:C18 – C21

Painter TJ (1983b) Carbohydrate origin of aquatic humus from peat. *Carbohydrate Research* 124:C22 – C26

Painter TJ (1991) Lindow Man, Tollund Man and Other Peat-Bog Bodies: The Preservative and Antimicrobial Action of Sphagnan, a Reactive Glycuronoglycan with Tanning and Sequestering Properties. *Carbohydrate Polymers* 15:123 – 142

Parvin S, Blagodatskaya E, Becker JN, Kuzyakov Y, Uddin S, Dorodnikov M (2018) Depth rather than microrelief controls microbial biomass and kinetics of C-, N-, P- and S-cycle enzymes in peatland. *Geoderma* 324:67 – 76

Price NC, Stevens L (1999) *Fundamentals of enzymology: The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins*. Oxford University Press, Oxford

Rao MA, Violante A, Gianfreda L (1998) Interactions between tannic acid and acid phosphatase. *Soil Biology and Biochemistry* 30:111 – 112

Robinson PK (2015) Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry* 59:1 – 41

Rydin H, Jeglum JK (2013) *The biology of peatlands*. Oxford University Press, Oxford

Saraswati S, Parsons CT, Strack M (2019) Access roads impact enzyme activities in boreal forested peatlands. *Science of the Total Environment* 651:1405 – 1415

Sinsabaugh RL, Lauber CL, Weintraub MN, Ahmed B, Allison SD, Crenshaw C, Contosta AR, Cusack D, Frey S, Gallo ME, Gartner TB, Hobbie SE, Holland K, Keeler BL, Powers JS, Stursova M, Takacs-Vesbach C, Waldrop MP, Wallenstein MD, Zak DR, Zeglin LH (2008) Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters* 11:1252 – 1264

Sinsabaugh RL (2010) Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamic of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42:391 – 404

Smidsrød O, Painter TJ (1984) Contribution of carbohydrates to the cation-exchange selectivity of aquatic humus from peat-bog water. *Carbohydrate Research* 127:267 – 281

Souto C, Chiapusio G, Pellissier F (2000) Relationships between phenolics and soil microorganisms in spruce forests: significance for natural regeneration. *Journal of Chemical Ecology* 26:2025 – 2034

Stalheim T, Ballance S, Christensen BE, Granum PE (2009) Sphagnum - a pectin-like polymer isolated from *Sphagnum* moss can inhibit the growth of some typical food spoilage and food poisoning bacteria by lowering the pH. *Journal of Applied Microbiology* 106:967 – 976

Strack M, Waddington JM, Turetsky M, Roulet NT, Byrne KA (2008) Northern peatlands, greenhouse gas exchange and climate change. In: Strack M (ed.) *Peatlands and climate change*. International Peat Society, Jyväskylä

Šantrůčková H, Kaštovská E, Bárta J, Miko L, Tajovský K (2018) *Ekologie půdy*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice

Tejirian A, Xu F (2011) Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology* 48:239 – 247

Toberman H, Freeman C, Artz RRE, Evans CD, Fenner N (2008) Impeded drainage stimulates extracellular phenol oxidase activity in riparian peat cores. *Soil Use and Management* 24:357 – 365

Triebwasser DJ, Tharayil N, Preston CM, Gerard PD (2012) The susceptibility of soil enzymes to inhibition by leaf litter tannins is dependent on the tannin chemistry, enzyme class and vegetation history. *New Phytologist* 196:1122 – 1132

Turetsky MR (2003) The Role of Bryophytes in Carbon and Nitrogen Cycling. *The Bryologist* 106:395 – 409

Urbanová Z, Hájek T (2021) Revisiting the concept of ‘enzymic latch’ on carbon in peatlands. *Science of The Total Environment*. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146384

Velíšek J, Cejpek K (2008) *Biosynthesis of Food Components*. OSSIS, Tábor

Verhoeven JTA, Liefveld WM (1997) The ecological significance of organochemical compounds in *Sphagnum*. *Acta botanica neerlandica* 46:117 – 130

Verhoeven JTA, Toth E (1995) Decomposition of *Carex* and *Sphagnum* litter in fens: Effect of litter quality and inhibition by living tissue homogenates. *Soil Biology and Biochemistry* 27:271 – 275

Vermerris W, Nicholson R (2006) *Phenolic Compound Biochemistry*. Springer, Dordrecht

Vodrážka Z (2002) *Biochemie*. Academia, Praha

Voet D, Voetová JG (1995) *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha

Votava M (2005) *Lékařská mikrobiologie obecná*. Neptun, Brno

Vuorinen AH, Saharinen MH (1996) Effects of soil organic matter extracted from soil on acid phosphomonoesterase. *Soil Biology and Biochemistry* 28:1477 – 1481

Wall DH (2012) *Soil ecology and ecosystem services*. Oxford University Press, Oxford

Weil RR, Brady NC (2017) *The Nature and Properties of Soils*. Pearson, Harlow



## 12 Přílohy

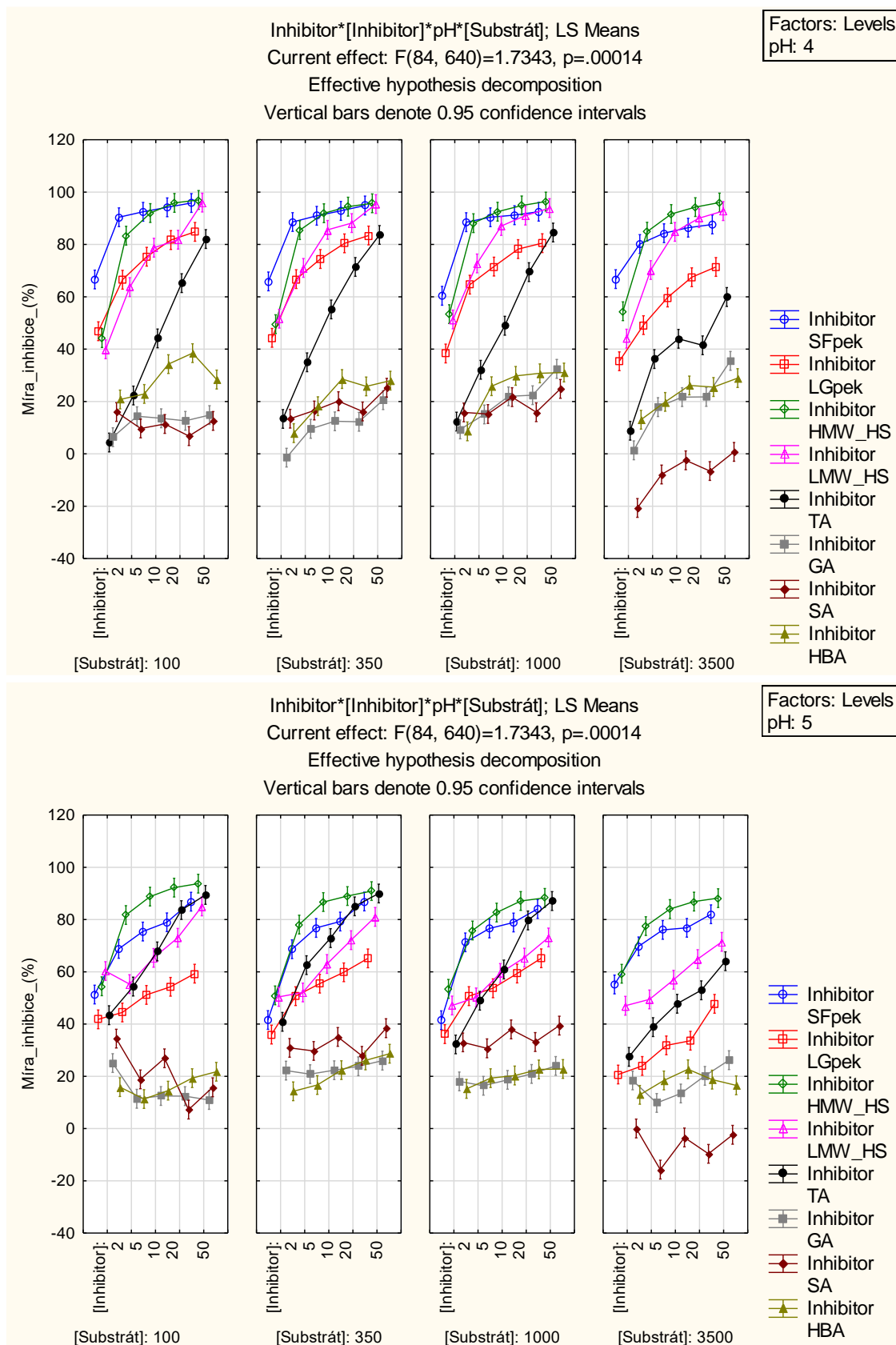
Tab. P 1 Míra inhibice čisté fosfatázy (%) použitými inhibitory v 1. pokusu pro jednotlivé koncentrace inhibitoru při hladině pH 4 (průměr ± S.D.).

Koncentrace inhibitoru (mg·l <sup>-1</sup> )	2	5	10	20	50
Sphagnan	64 ± 3,1	89 ± 1	91 ± 1	93 ± 1,3	94 ± 1,5
Pektin izolovaný z <i>Leucobryum glaucum</i>	43 ± 5,1	66 ± 1,6	74 ± 1,9	80 ± 1,6	83 ± 2
HMW HS	49 ± 4,3	86 ± 2,2	92 ± 0,4	95 ± 0,7	96 ± 0,7
LMW HS	48 ± 6	69 ± 4,2	84 ± 3,9	87 ± 4,2	95 ± 1
Kyselina třísllová	10 ± 5,1	30 ± 6,1	49 ± 5,1	69 ± 3	83 ± 1,2
Kyselina gallová	5 ± 6,4	13 ± 4,5	16 ± 5,4	16 ± 5,9	23 ± 8,6
Kyselina sphagnová	15 ± 4,3	14 ± 3,2	18 ± 5,3	13 ± 5,2	21 ± 6,8
Kyselina 4-hydroxybenzoová	12 ± 6,7	22 ± 3,7	31 ± 3,7	32 ± 6,4	29 ± 1,7

Tab. P 2 Míra inhibice čisté fosfatázy (%) použitými inhibitory v 1. pokusu pro jednotlivé koncentrace inhibitoru při hladině pH 5 (průměr ± S.D.).

Koncentrace inhibitoru (mg·l <sup>-1</sup> )	2	5	10	20	50
Sphagnan	45 ± 5,9	70 ± 4,2	76 ± 2,5	79 ± 2,8	86 ± 2
Pektin izolovaný z <i>Leucobryum glaucum</i>	38 ± 5,1	49 ± 6	53 ± 4,9	58 ± 4,1	63 ± 4,7
HMW HS	53 ± 4,2	79 ± 2,9	86 ± 2,9	89 ± 2,5	91 ± 2,5
LMW HS	53 ± 6,5	53 ± 3,6	63 ± 2,8	70 ± 3,7	80 ± 5,3
Kyselina třísllová	39 ± 5,9	55 ± 6,6	67 ± 5,5	83 ± 2,6	89 ± 1,6
Kyselina gallová	22 ± 3,5	16 ± 5	18 ± 4,7	19 ± 5,3	20 ± 8,1
Kyselina sphagnová	33 ± 4	26 ± 9,3	33 ± 7,9	23 ± 12,9	31 ± 12,9
Kyselina 4-hydroxybenzoová	15 ± 3,2	16 ± 7,3	19 ± 6,9	23 ± 6,3	24 ± 7

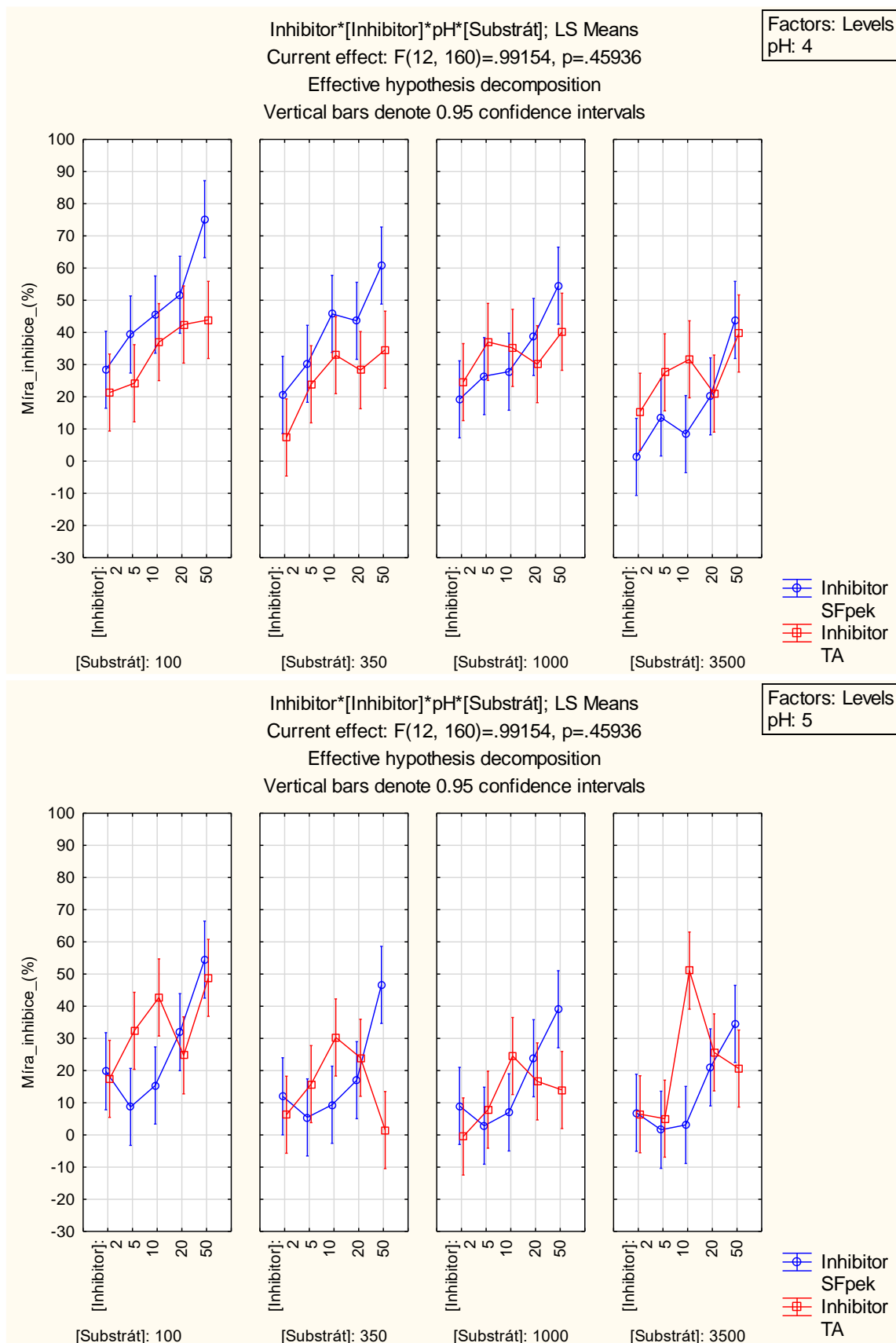
Obr. P 1 Míra inhibice čisté fosfatázy v 1. pokusu v závislosti na inhibitoru, jeho koncentraci, koncentraci substrátu a pH. Grafický výstup čtyřcestné analýzy variance programu Statistica.

Factors: Levels  
pH: 5

Tab. P 3 Míra inhibice čisté celobiohydrolázy (%) použitými inhibitory v 1. pokusu pro jednotlivé koncentrace inhibitoru při hladině pH 4 a pH 5 (průměr ± S.D.).

Koncentrace inhibitoru (mg·l <sup>-1</sup> )		2	5	10	20	50
pH 4	Sphagnan	17 ± 11,6	27 ± 10,5	32 ± 17,6	39 ± 14,3	59 ± 12,7
	Kyselina třísllová	17 ± 14,4	28 ± 12,2	34 ± 11,9	30 ± 16	40 ± 9,9
pH 5	Sphagnan	12 ± 8,3	5 ± 7,3	9 ± 9	23 ± 7,9	44 ± 8,7
	Kyselina třísllová	7 ± 10,6	15 ± 13,4	37 ± 11,8	23 ± 8,3	21 ± 26

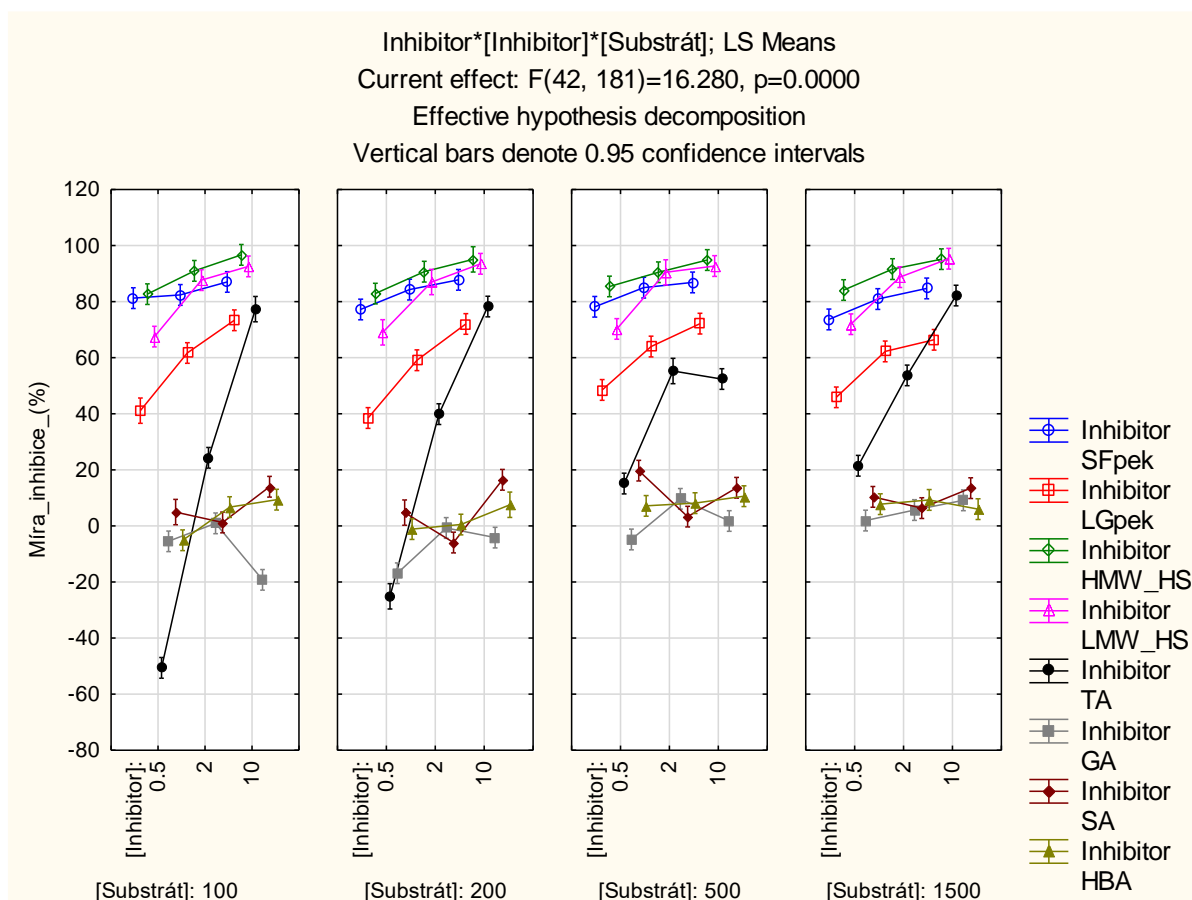
Obr. P 2 Míra inhibice čisté celobiohydrolázy v závislosti na inhibitoru, jeho koncentraci, koncentraci substrátu a pH. Grafický výstup čtyřcestné analýzy variance programu Statistica.



Tab. P 4 Míra inhibice čisté fosfatázy (%), jejíž neinhibovaná aktivita byla srovnatelná s environmentálními vzorky, použitými inhibitory ve 2. pokusu pro jednotlivé koncentrace inhibitoru (průměr ± S.D.).

Koncentrace inhibitoru (mg·l <sup>-1</sup> )	0,5	2	10
Sphagnan	78 ± 3,3	83 ± 3,1	87 ± 1,6
Pektin izolovaný z <i>Leucobryum glaucum</i>	44 ± 4,8	62 ± 2,8	71 ± 3,3
HMW HS	84 ± 1,4	91 ± 0,8	95 ± 1,1
LMW HS	70 ± 2,4	88 ± 1,6	94 ± 1,6
Kyselina třísllová	-8 ± 32,2	42 ± 13,2	72 ± 12
Kyselina gallová	-6 ± 9	4 ± 5,3	-3 ± 11,4
Kyselina sphagnová	11 ± 6,9	1 ± 6,5	14 ± 3,4
Kyselina 4-hydroxybenzoová	2 ± 7,2	6 ± 5	8 ± 3,7

Obr. P 3 Míra inhibice čisté fosfatázy v 2. pokusu v závislosti na inhibitoru, jeho koncentraci a koncentraci substrátu. Grafický výstup třicestné analýzy variance programu Statistica.



Tab. P 5 Míra inhibice fosfatázy v extraktu z rašelinného prostředí (%) použitými inhibitory ve 3. pokusu pro jednotlivé extrakty (průměr ± S.D).

Extrakt	Ex1	Ex2	PVP-Ex1	PVP-Ex2
Sphagnan	-16 ± 16,2	-1 ± 4,9	0 ± 15	-1 ± 18,7
HMW HS	-2 ± 16,2	-4 ± 5,2	-32 ± 26,1	6 ± 11,7
Kyselina třísllová	6 ± 8	10 ± 1,8	6 ± 10	15 ± 2,7
Kyselina sphagnová	-13 ± 9	-4 ± 2,7	-57 ± 18,9	7 ± 2,2

Tab. P 6 Míra inhibice beta-glukosidázy v extraktu z rašelinného prostředí (%) inhibitory použitými ve 3. pokusu pro jednotlivé extrakty (průměr ± S.D.).

Extrakt	Ex1	Ex2	PVP-Ex1	PVP-Ex2
Sphagnan	-16 ± 13,8	-3 ± 1,7	-4 ± 21,5	1 ± 1,6
HMW HS	-6 ± 56,5	-8 ± 9,6	-49 ± 71,8	-9 ± 12
Kyselina třísllová	15 ± 10,8	17 ± 9	17 ± 7,6	19 ± 8
Kyselina sphagnová	5 ± 17,1	7 ± 3,5	12 ± 7,7	1 ± 3



Obr. P 4 Míra inhibice fosfatázy a beta-glukosidázy v extraktech z rašeliny v závislosti na enzymu, inhibitoru, extraktu a koncentraci substrátu. Grafický výstup čtyřcestné analýzy variance programu Statistica.

