

# Supramolekulární komplexy kyseliny gibberellové

Michaela Matejková

---

Bakalářská práce  
2022

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav chemie

Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Michaela Matejková**  
Osobní číslo: **T190049**  
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**  
Specializace: **Chemie a analýza potravin**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Supramolekulární komplexy kyseliny gibberellové**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracovat rešerši na téma: 1) rostlinné hormony; 2) kyselina gibberellová – struktura a funkce; 3) supramolekulární komplexy rostlinných hormonů; 4) příklady využití rostlinných hormonů v zemědělství.
2. Pomocí NMR, MS a ITC otestovat, zda kyselina gibberellová tvoří supramolekulární komplexy s cyklodextriny a cucurbit[n]urily.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

[1] ASAMI, T., NAKAGAWA, Y.: Preface to the Special Issue: Brief review of plant hormones and their utilization in agriculture. *Journal of Pesticide Science* 2018, 43(3), 154-158.

[2] BOUWMEESTER, H. J., FONNE-PFISTER, R., SCREPANTI, C., DE MESMAEKER, A.: Strigolactones: Plant Hormones with Promising Features. *Angewandte Chemie International Edition* 2019, 58(37), 12778-12786.

[3] DODZIUK, H.: *Cyclodextrins and Their Complexes*. 2006, Wiley.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Robert Vícha, Ph.D.**  
Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 28. února 2022

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Kyselina gibberellová je jeden z nejznámějších rostlinných hormonů, který v nízkých koncentracích pozitivně ovlivňuje klíčení semen, růst a jiné fyziologické funkce rostlin. Naproti tomu vyšší koncentrace hormonu mají na rostliny inhibiční účinek. Problém s aplikací vhodné koncentrace hormonu by mohl být vyřešen vytvořením komplexu kyseliny gibberellové s vhodným hostitelem, čímž by bylo zajištěno dlouhodobé uvolňování nízké koncentrace. Cílem této bakalářské práce je ověřit, zda kyselina gibberellová tvoří inkluzní komplexy s  $\alpha$ -cyklodextrinem,  $\beta$ -cyklodextrinem a  $\gamma$ -cyklodextrinem. Průzkum supramolekulárního chování kyseliny gibberellové byl ověřen pomocí nukleární magnetické resonance, isothermální titrační mikrokolorimetrie a elektrosprejové ionizace s hmotnostním detektorem. Získané poznatky byly následně otestovány na klíčení semen *Lunaria rediviva*.

Klíčová slova: rostlinné hormony, kyselina gibberellová, cyklodextriny, supramolekulární komplexy

## ABSTRACT

Gibberellic acid is one of the most popular plant hormones, which positively affects seed germination, growth, and other physiological functions of plants being applied in low concentrations. In contrast, higher concentrations of this hormone have an inhibitory effect on plants. The issue regarding the application of an appropriate concentration of the hormone could be fixed by encapsulation of gibberellic acid with a suitable host to ensure maintenance of a low concentration. This bachelor thesis aims to verify whether gibberellic acid forms inclusion complexes with  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin, and  $\gamma$ -cyclodextrin. Nuclear magnetic resonance, isothermal titration microcalorimetry, and electrospray ionization mass spectrometry were used for the investigation of the supramolecular behaviour of gibberellic acid. The obtained findings were subsequently tested on *Lunaria rediviva* seeds germination.

Keywords: plant hormones, gibberellic acid, cyclodextrines, supramolecular complexes

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. Mgr. Robertu Víchovi, Ph.D. za velkou trpělivost, cenné rady a za odborné vedení. Také bych chtěla poděkovat za poskytnutí semínek, díky kterých bylo možné provést klíčící experiment. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Zdeňce Pruckové, Ph.D. za pomoc při měření na ITC a panu Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D. za pomoc se změřením vzorků na ESI-MS. Za pomoc při provádění klíčícího experimentu děkuji panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí. Mé děkuji patří kolektivu z laboratoří 408 a 409 za vytvoření skvělého pracovního prostředí a ochotu vždy pomoci. Děkuji svým skvělým spolužačkám Kikis a Pajkis za vytvoření skvělé studijní atmosféry. Děkuji mé rodině a mému příteli za podporu a porozumění. A v neposlední řadě děkuji celému Ústavu chemie.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 ROSTLINNÉ HORMONY</b> .....	<b>11</b>
1.1    KLASIFIKACE ROSTLINNÝCH HORMONŮ .....	12
1.1.1    Auxiny.....	12
1.1.2    Gibberelliny.....	14
1.1.3    Cytokininy.....	16
1.1.4    Kyselina abscisová .....	17
1.1.5    Ethen .....	18
1.1.6    Jiné přírodní regulátory růstu .....	18
1.2    VYUŽITÍ V ZEMĚDĚLSTVÍ.....	21
<b>2 CYKLODEXTRINY</b> .....	<b>23</b>
2.1    HISTORIE.....	23
2.2    ROZDĚLENÍ, VLASTNOSTI A STRUKTURA CYKLODEXTRINŮ .....	25
2.3    INKLUZNÍ KOMPLEXY .....	26
2.4    VYUŽITÍ CYKLODEXTRINŮ.....	28
2.4.1    Potravinářský průmysl .....	28
2.4.2    Zemědělství .....	29
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>31</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
3.1    POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	32
3.2    MĚŘENÝ LIGAND A HOSTITELSKÉ MOLEKULY .....	33
3.3    PŘÍPRAVA PUFRU O PH 8,16 .....	33
3.4    PŘÍPRAVA VZORKŮ .....	33
<b>4 DIKUZE A VÝSLEDKY</b> .....	<b>37</b>
4.1    Kyselina gibberellová .....	37
4.2    SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY KYSELINY GIBBERELLOVÉ S CD .....	38
4.2.1    Nukleární magnetická resonance .....	38
4.2.2    Isotermální titrační mikrokalorimetrie .....	44
4.2.3    Elektrosprejová ionizace s hmotnostním detektorem .....	48
4.2.4    Klíčení semen.....	49
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>51</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>53</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>63</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>64</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>66</b>

<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>67</b>
---------------------------	-----------



## ÚVOD

Rostlinné hormony jsou signální molekuly, které regulují širokou škálu růstových a vývojových procesů. Rostlinné hormony zprostředkovávají signální transdukcii, která vede ke genové expresi umožňující rostlinám adaptovat se na měnící se podmínky a prostředí. V rámci regulace biologických procesů působí jednotlivé skupiny fytohormonů sítí vzájemně propojených reakcí, proto je objasnění způsobu jejich působení v živých organismech poměrně náročné. Mezi původní rostlinné hormony, které byly popsány v první polovině 20. století patří auxiny, gibberelliny, cytokininy, kyselina abscisová a ethe. Následně byla rodina rostlinných hormonů rozšířena o brassinosteroidy, kyselinu jasmonovou, kyselinu salicylovou a strigolaktony. Jednou z nejznámějších skupin přírodních hormonů jsou jednoznačně gibberelliny. Gibberelliny jsou diterpenoidní sloučeniny objevené ve 30. letech 20. století při studiu onemocnění bakanae, kterou způsobuje houba *Giberella fujikuroi*. Aktuální počet nalezených gibberellinů činí celkem 130 sloučenin, z nichž biologicky aktivní je pouze malé množství. Mezi bioaktivní gibberelliny lze zařadit kyselinu gibberellovou, která je hojně využívána v zemědělství například na produkci větších hroznů bez pecek.

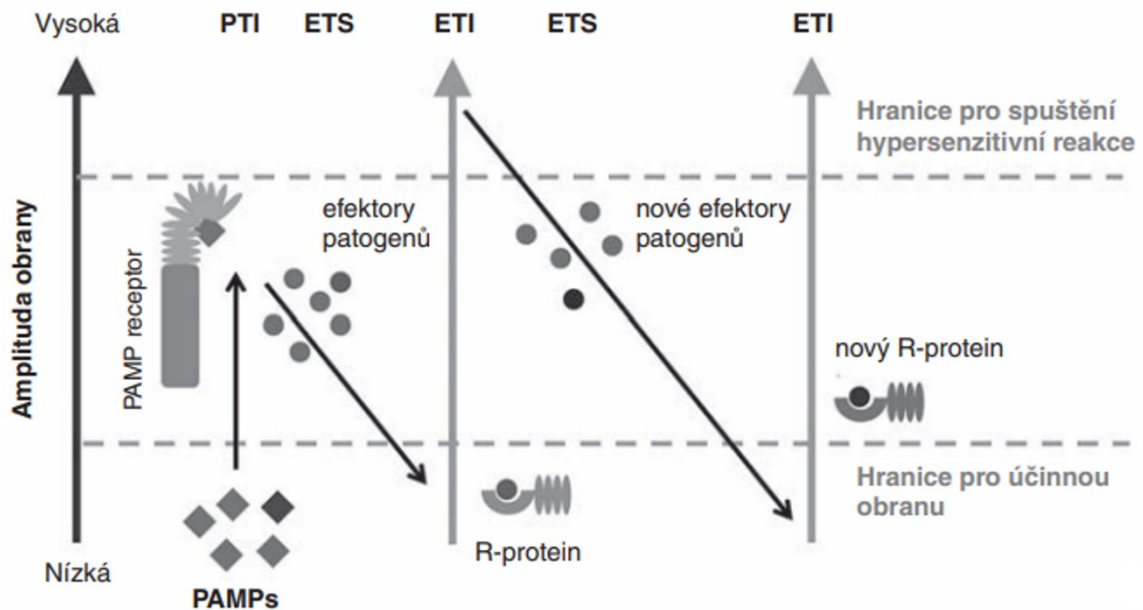
Cyklodextriny jsou makrocyclické oligosacharidy, jejichž první izolace byla provedena Antoinem Viliiersem na konci 19. století při enzymatické degradaci škrobu. Cyklodextriny jsou rozlišovány podle počtu D-glukopyranosových jednotek spojených  $\alpha$ -1,4 glykosidickými vazbami. Nejčastěji se cyklodextriny vyskytují se šesti ( $\alpha$ -CD), sedmi ( $\beta$ -CD) nebo osmi ( $\gamma$ -CD) glukopyranosovými jednotkami. Díky své netoxicitě a schopnosti tvořit inkluzní komplexy mají cyklodextriny široké uplatnění v průmyslu. Nejširší uplatnění lze nalézt v oblasti potravinářství, kde se cyklodextriny využívají k potlačení nepříjemných vůní některých látek. Ve farmacii slouží k vytvoření komplexů se špatně rozpustnými léčivými a v zemědělství tvoří stabilnější komplexy s pesticidy.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 ROSTLINNÉ HORMONY

Rostlinné hormony, také nazývané fytohormony, jsou skupinou přirozeně se vyskytujících organických látek, které v nízkých koncentracích ovlivňují fyziologické procesy, jako je růst a vývoj rostlin. Fytohormony patří do třídy přírodních regulátorů růstu rostlin, které mohou působit inhibičně nebo stimulačně. Nejdůležitější funkce fytohormonů je kontrola buněčného dělení, růstu a diferenciaci.<sup>1</sup> Rostlinné hormony ovlivňují klíčení a dormanci semen.<sup>2</sup> Mechanismus klíčení semen spočívá v aktivaci embrya. Proces klíčení začíná absorpcí vody suchým semenem, čímž dojde k nabobtnání a prodloužení embrya, které se nachází v semenu. Klíčení se považuje za ukončené v momentě, kdy kořínek vyrostl z krycích vrstev semene.<sup>3</sup> U rostlin nejsou přítomny specifické žlázy s vnitřní sekrecí, které by hormony vytvářely jako v případě živočichů. Tyto hormony jsou syntetizovány v jedné části rostliny a dále přemísťovány do jiné části, kde způsobují fyziologickou odpověď.

Fytohormony hrají důležitou roli ve stresových reakcích rostlin na abiotické i biotické faktory. V případě abiotického stresu se jedná o reakci, která je zapříčiněna například nedostatkem světla, vody nebo kyslíku. Biotický stres pak souvisí s živými organismy, patří sem reakce vyvolané patogeny, hmyzem či hlodavci. Patogeny v rostlině mají za následek změny hladiny rostlinných hormonů.<sup>4</sup> Proti mikrobiálním patogenům se rostliny brání prostřednictvím bazálního obranného mechanismu, který je také nazýván jako vrozený imunitní systém. Aktuální pohled na imunitní systém rostlin je interpretován pomocí „cik-cak“ modelu (Obrázek 1). Nejdříve rostliny detekují mikrobiální patogeny, které jsou spojeny molekulárními vzory PAMP prostřednictvím receptorů a ty pak vedou k imunitě spouštěné PAMP (PTI). Rostliny napadené patogeny vylučují efektoři, které potlačují PTI, a tak poukazují na onemocnění vedoucí k efektoři spouštěné citlivosti (ETS). Rostliny rozpoznávají daný efektoři přímo či nepřímo a efektoři aktivují spouštěnou imunitu (ETI), což dělá rostliny odolné vůči chorobám.<sup>5,6</sup>



Obrázek 1 „Cik–cak“ model rostlinné imunity<sup>7</sup>

## 1.1 Klasifikace rostlinných hormonů

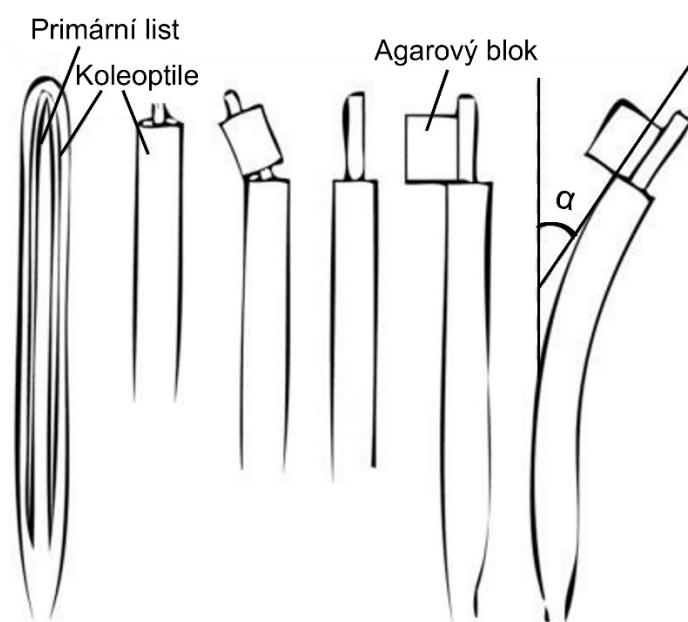
V průběhu 20. století byly objeveny fyziologicky aktivní sloučeniny, které byly klasifikovány jako rostlinné hormony. Fytohormony byly rozděleny podle chemické struktury a fyziologického účinku. Mezi nejvýznamnější skupiny fytohormonů patří auxiny, gibberelliny, kyselina abscisová, cytokininy, kyselina salicylová, etheny, kyselina jasmonová a brassinosteroidy. V posledních letech byla identifikována nová třída rostlinných hormonů, která se nazývá strigolaktony.<sup>8</sup>

### 1.1.1 Auxiny

Fytohormony ze skupiny auxinů jsou první objevené, a tudíž nejlépe prozkoumané rostlinné hormony. Termín auxin pochází z řeckého slova „auxein“, což v překladu znamená „růst“. Pravděpodobně první zmínka o auxinech pochází z konce 19. století, kdy Charles Darwin se svým synem Francisem Darwinem zkoumali příčinu ohybu koleoptile směrem ke světlu (fototropismus).<sup>9</sup> Podstatu fototropismů se podařilo objasnit až v letech 1926 biologem Fritsem Warmoltem Wentem, který objevil že špička koleoptile produkuje látku, která proniká do agaru a stimuluje prodlužování. Později bylo zjištěno, že prodlužování je zapříčiněno auxiny.<sup>10</sup>

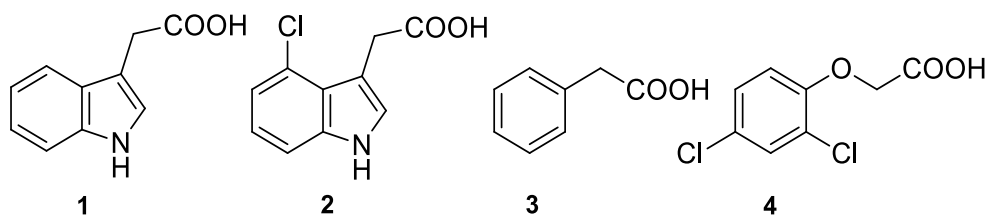
Základním zástupcem auxinů je přirozeně se vyskytující slabá kyselina indol-3-ylactová (IAA), která je syntetizovaná v dělicím pletivu na vrcholu výhonku a transportována ke

kořenové špičce.<sup>11</sup> Kyselina IAA byla poprvé izolovaná ve 30. letech 20. století z lidské moči,<sup>12</sup> kvasinek<sup>13</sup> a houby *Rhizopus suinus*<sup>14</sup> pomocí testu *Avena*. Test s názvem *Avena* (Obrázek 2) pomohl k objevu jak přirozeně se vyskytujících, tak syntetických auxinů. V testu *Avena* se sloučeniny testují na aktivitu auxinu v semenáčcích *Avena sativa* (oves setý). Na začátku testu se odstraní krajní část koleoptile a po určité době růstu se odstraní větší část koleoptile a zároveň i primární list. Na odříznutou část semenáčku se umístí agarový blok, který obsahuje fytohormon auxin. Po inkubaci se měří zakřivení vyvolané difúzí a transportem auxinu z agarového bloku do koleoptile sazenice.<sup>15</sup>



**Obrázek 2** Test auxinové odezvy *Avena*<sup>16</sup>

Biosyntéza IAA může být zprostředkována metabolickými cestami, které jsou závislé nebo nezávislé na aminokyselině tryptofanu.<sup>17</sup> Existuje celkem pět biosyntetických drah IAA z tryptofanu, které jsou navzájem propojeny. Biosyntetické dráhy jsou pojmenovány podle meziproductů, které syntézou vznikají. Tyto prekurzory, a tedy i jednotlivé biosyntetické dráhy, se nazývají kyselina indol-3-ylpyrohroznová (IPyA), indol-3yl-acetaldoxim (IAOx), indol-3-ylacetonitril (IAN), indol-3-ylacetamid (IAM) a indol-3-ylacetaldehyd (IAAld).<sup>17</sup> Mezi další aktivní a přirozeně se vyskytující auxiny (Obrázek 3) patří kyselina 4-chlorindol-3-ylactová (4-Cl-IAA) a kyselina fenyloctová (PAA).<sup>18</sup> Syntetickým zástupcem je 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D).<sup>19</sup>



**Obrázek 3** Chemická struktura některých auxinů: indol-3-ylacetic kyselina (1), 4-chlorindol-3-ylacetic kyselina (2), fenylacetic kyselina (3) a 2,4-dichlorofenoxyacetic kyselina (4)

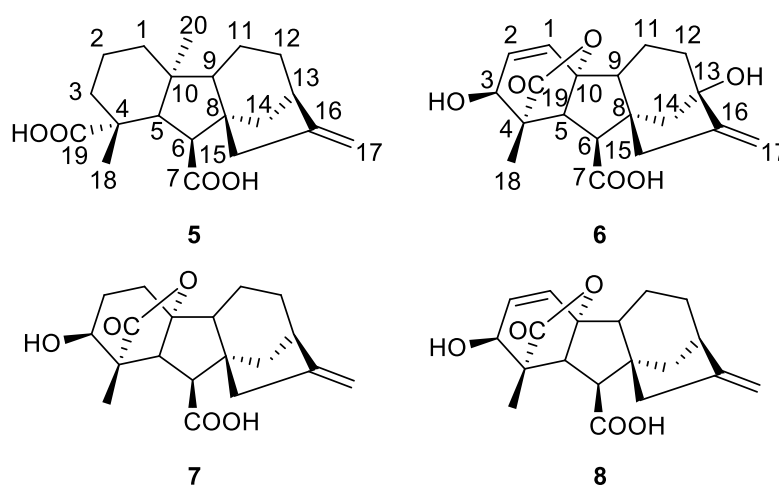
Transport auxinu je zprostředkován transmembránovými proteiny PIN-FORMED (PIN) a ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B (ABCB), které v buňce slouží k vyplavení IAA. Známých je celkem osm druhů PIN proteinů, které se dále rozdělují na dvě skupiny. První skupinou jsou krátké PIN, mezi něž patří PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 a nacházejí se na plazmatické membráně.<sup>20</sup> Každý ze zmíněných PIN je umístěn na různých místech v kořenových tkáních. Například PIN3 je lokalizován v kořenovém pericyklu,<sup>21</sup> PIN4 je umístěn v kořenovém meristému.<sup>22</sup> Druhou skupinou jsou dlouhé proteiny PIN, konkrétně PIN5, PIN6 a PIN8, které zprostředkovávají transport IAA z cytoplazmy do endoplazmatického retikula.<sup>23</sup> Do skupiny ABCB proteinů lze zařadit ABCB1, ABCB4, ABCB19 a ABCB21.<sup>24</sup> Transportní proteiny usnadňující příjem IAA z apoplastu do cytoplazmy se nazývají AUXIN RESISTANT1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX).<sup>25</sup>

### 1.1.2 Gibberelliny

Rostlinné hormony gibberelliny (GA) byly objeveny ve 30. letech 20. století v Japonsku při studiu choroby rýže, která se nazývá bakanae. Toto onemocnění způsobuje houba *Gibberella fujikuroi*, podle které byla skupina těchto fytohormonů pojmenována. Onemocnění bakanae je typické nadměrným růstem stonků a nízkou produkcí semen.<sup>26</sup>

GA jsou důležité pro vývoj rostliny, a to zejména pro klíčení semen, prodloužení stonku, expanzi listů, vývoj trichomů a indukci kvetení.<sup>27</sup> V rostlinách, houbách a bakteriích je nyní identifikováno více jak 130 GA, ale ne všechny jsou biologicky aktivní.<sup>28</sup> Skelet biologicky neaktivních GA obsahuje dvacet uhlíků (Obrázek 4). Biologicky neaktivní GA slouží v rostlinách jako prekurzory pro biologicky aktivní formy nebo v rostlině představují formu deaktivovaných metabolitů. Bioaktivní GA mají strukturu složenou z devatenácti uhlíků, přičemž dvacátý uhlík je nahrazen pětičlenným laktonovým můstkem, který spojuje čtvrtý a

desátý uhlík. Mezi biologicky aktivní GA patří například GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> a GA<sub>7</sub> (Obrázek 4).<sup>29, 30</sup>



**Obrázek 4** Chemická struktura gibberellinu 12 (5), kyseliny gibberellové (6), gibberellinu 4 (7) a gibberellinu 7 (8)

GA jsou diterpenoidní kyseliny, které jsou syntetizovány z geranylgeranyl-difosfátu (GGDP) terpenovou cestou, kde je tvořen meziprodukt tetracyklický diterpen *ent*-kauren. GGDP se díky enzymu *ent*-kopalyldifosfátsyntáza (CPS) přemění na *ent*-kopalyldifosfát (*ent*-CPD), a poté na *ent*-kauren pomocí *ent*-kaurensyntázy (KS). Za účasti enzymu *ent*-kaurenoxidázy (KO) se získá *ent*-kaurenol, který se přemění na *ent*-kaurenal, a poté na *ent*-kaurenovou kyselinu, z které za pomoci oxidázy *ent*-kaurenové kyseliny (KAO) vznikne *ent*-7 $\alpha$ -hydroxykaurenová kyselina a z té se vytvoří aldehyd GA<sub>12</sub>, který se metabolizuje na nebioaktivní GA<sub>12</sub>. GA<sub>12</sub> může být následně přeměněn pomocí C<sub>20</sub>-oxidázy na jiné GA.<sup>28</sup> Syntézy se uskutečňují v různých částech buňky. Například GGDP a *ent*-kauren jsou syntetizovány v plastidu, kdežto enzym KAO v endoplazmatickém retikulu. Oxidázy, které přeměňují GA<sub>12</sub> na další GA jsou syntetizovány v cytosolu.<sup>31,32</sup>

### 1.1.2.1 Kyselina gibberellová

Kyselina gibberellová (GA<sub>3</sub>) je tetracyklická dihydroxy- $\gamma$ -laktonová kyselina. GA<sub>3</sub> má formu bílého krystalického prášku, který má bod tání v rozmezí 233 až 235 °C. Rozpustnost GA<sub>3</sub> ve vodě je 5 g·dm<sup>-3</sup>, lépe se rozpouští v alkoholu, acetonu nebo ethyl-acetátu. Poločas rozpadu GA<sub>3</sub> ve vodných roztocích je při teplotě 20 °C 14 dní a při 50 °C 2 dny.<sup>33,34</sup>

Fyttohormon lze z rostliny izolovat pouze v nízkém množství, proto je od 30. let 20. století GA<sub>3</sub> získávána převážně fermentací. K produkci GA<sub>3</sub> se využívá nejčastěji fermentace

v pevné fázi (SSF) a submerzní fermentace (SmF). Při SSF fermentaci mikroorganismus roste na pevné matrici bez přítomnosti volné vody. Výhody SSF jsou vysoké výtěžky produktů, nízká tvorba odpadních vod a vzniklé vedlejší produkty, které lze dále využít jako substráty.<sup>35,36</sup> Při SmF fermentaci je mikroorganismus kultivován v kapalném médiu, který vyžaduje více vody, energie a prostoru.<sup>37</sup> V případě průmyslové výroby GA<sub>3</sub> se nejvíce uplatňuje fermentace SmF s houbou *Fusarium fujikuroi*.

Mezi nejdůležitější živiny pro produkci GA<sub>3</sub> patří prvky uhlík a dusík. Syntéza GA<sub>3</sub> začíná v momentě, kdy mikroorganismy spotřebují veškerý dusík v médiu, který je přítomen nejčastěji ve formě síranu amonného, chloridu amonného nebo glycinu. K dosažení lepších výtěžků GA<sub>3</sub> rozhoduje poměr uhlíku k dusíku. Nejběžnější je poměr mezi 6:1 a 45:1.<sup>38</sup>

Produkci GA<sub>3</sub> ovlivňují fyzikální faktory, a to především teplota, která by se měla pohybovat v závislosti na použitém kmeni od 25 °C do 32 °C. Pro produkci GA<sub>3</sub> se optimální pH nachází v rozmezí hodnot 3,5 až 5,8.<sup>34</sup>

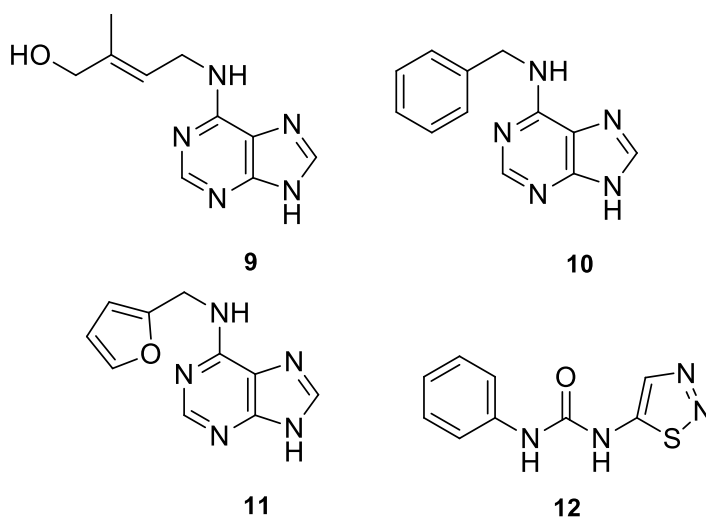
Pro následnou izolaci GA<sub>3</sub> se nejčastěji využívají adsorpční kolony. Adsorpční kolony jsou naplněny pevnou pryskyřicí, která je afinitní k rozpuštěné látce.<sup>39</sup> Další metody, které lze aplikovat pro izolaci GA<sub>3</sub> jsou extrakce kapalina-kapalina, separace přes membrány<sup>40</sup> a chromatografické metody.<sup>37</sup>

### 1.1.3 Cytokininy

Cytokininy (CK) jsou rostlinné hormony, které se podílí na růstu a vývoji rostlin včetně dělení rostlinných buněk (cytokinezi), tvorby orgánů, mobility živin a stárnutí.<sup>41</sup> Většina přirozeně se vyskytujících CK má strukturu adeninu s různou substitucí na atomu dusíku v poloze šest. Nejběžnější cytokinin se nazývá *trans*-zeatin (Obrázek 5). Zeatin má ve své struktuře isoprenoidní postranní řetězec. *Trans*-zeatin je syntetizován z dimethylallyl-difosfátu a ADP/ATP pomocí enzymu isopentenyltransferázy, který produkuje isopentenyladeninový nukleotid a ten je následně metabolizován cytochromem P450.<sup>42</sup> Kromě *trans*-zeatinu se ve vyšších rostlinách může zeatin vyskytovat i v konfiguraci *cis*, a to díky vzájemné přeměně pomocí enzymu zeatin-izomeráza.<sup>43</sup> Mezi další přirozeně se vyskytující CK patří 6-benzylaminopurin (Obrázek 5), který nese aromatický postranní řetězec. Příkladem umělého CK odvozeného od adeninu je kinetin (Obrázek 5). Kromě adeninového skeletu mohou mít syntetické CK strukturu fenylmočoviny, které v rostlinách nebyly doposud nalezeny. Zástupce CK fenylmočovinného typu je thidiazuron (Obrázek 5).<sup>42</sup>



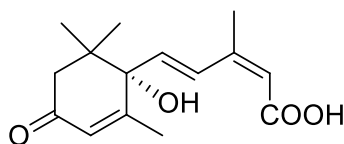
K biosyntéze CK dochází v kořenové špičce, kde je fytohormon dále transportován do nadzemní části rostliny.<sup>44</sup>



**Obrázek 5** Chemická struktura *trans*-zeatinu (9), 6-benzylaminopurininu (10), kinetinu (11) a thidiazuronu (12)

#### 1.1.4 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je fytohormon který se hromadí v plodu bavlníku a listech platanů. Fytohormon byl objeven v 60. letech 20. století.<sup>45</sup> ABA v rostlině ovlivňuje zrání embryí, dormanci semen, klíčení, buněčné dělení a indukci květu. ABA jakožto rostlinný hormon je velice významný v reakcích na abiotický stres, jako je sucho, zasolení půdy a na nízkou nebo vysokou teplotu.<sup>42</sup> Hormon ABA (Obrázek 6) má strukturu seskviterpenoidu s jedním stereogenním centrem na atomu uhlíku. Přirozeně se vyskytuje v konfiguraci *S*, ale může se vyskytovat i v enantiomerní *R* formě. ABA v konfiguraci *R* může být produktem racemizace přes katabolit ABA *trans*-diol.<sup>46</sup>



13

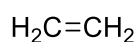
**Obrázek 6** Chemická struktura kyseliny abscisové (13)

ABA se nachází ve všech částech rostliny. Kromě rostlin ji mohou produkovat fytopatogenní houby, bakterie, mořské houby nebo člověk.<sup>47,42</sup> Houby syntetizují ABA přímo z farnesyl-

pyrofosfátu, zatímco biosyntetická cesta v rostlinách je uskutečněna nepřímo z karotenoidů.<sup>48</sup>

### 1.1.5 Ethen

Ethen (Obrázek 7) je nejjednodušším zástupcem alkenů a zároveň důležitým hormonem ve vyšších rostlinách, který je za normálního tlaku a teploty v plynném skupenství. V 19. století, byl objeven účinek ethenu na rostliny při úniku plynu z pouličního osvětlení. Osvětlovací plyn způsoboval žloutnutí a odumírání listů.<sup>49</sup> Na konci 19. století fyziolog Dimitry Neljubow poprvé prokázal biologický účinek ethenu, který ovlivňuje rostliny. Neljubow pozoroval zvláštní růst u etiolovaných sazenic hrachu, za který mohl únik osvětlovacího plynu v jeho laboratoři.<sup>50</sup> V roce 1934 Richard Gane pomocí kvantitativní chemické metody potvrdil své tvrzení, že rostliny syntetizují ethen.<sup>51</sup> Ethen v rostlině difunduje do blízkých buněk přes membrány, tudíž není potřeba transportních proteinů, které by ethen distribuovaly.<sup>52</sup>



14

**Obrázek 7** Chemický vzorec ethenu (14)

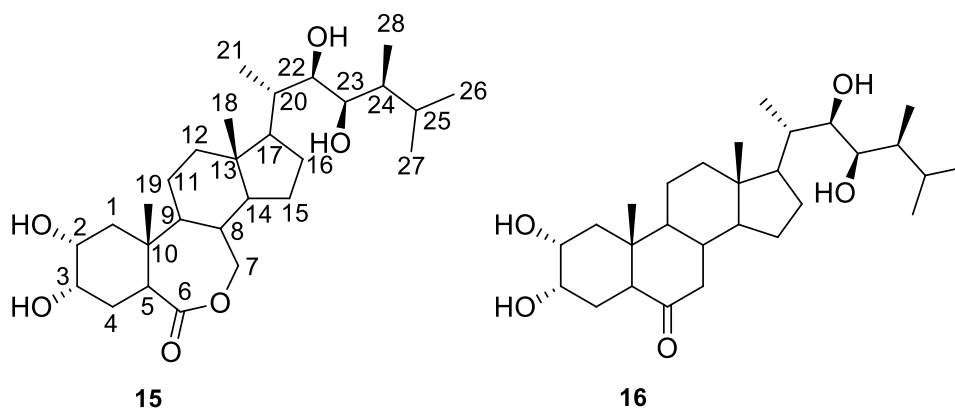
Metabolická dráha biosyntézy ethenu v rostlinách je složena ze dvou kroků. V prvním kroku dochází k přeměně *S*-adenosyl-L-methioninu na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) pomocí enzymu ACC syntázy. V druhém kroku se ACC metabolizuje na ethen díky ACC oxidáze.<sup>53</sup>

### 1.1.6 Jiné přírodní regulátory růstu

#### 1.1.6.1 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BR) jsou polyhydroxylované fytosteroly, které nesou minimálně jeden atom kyslíku na uhlíku v poloze tři. Molekula BR může nést i více atomů kyslíku, které se budou nacházet na uhlících v polohách dva, šest, dvacet dva nebo dvacet tři. BR se vyskytují v rostlinách přirozrně a současně je identifikováno více než 70 druhů BR.<sup>54</sup> V 70. letech 20 století byl poprvé izolován nejaktivnější BR s názvem brassinolid (BL) z pylových zrn *Brassica napus* (brukev řepka).<sup>55</sup> Pro optimální růst a vývoj rostlin je důležité udržovat optimální hladinu BR. V nadměrném množství BR působí jako inhibitor, kdežto v malém

množství působí jako aktivátor.<sup>56</sup> Nejhojněji se vyskytují dvacetí osmi uhlíkaté BR castasteron (CS) a BL (Obrázek 8).<sup>57</sup>

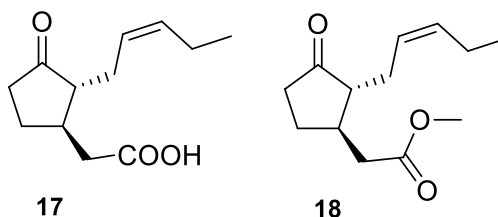


**Obrázek 8** Chemická struktura brassinolidu (15) a castasteronu (16)

BR jsou syntetizovány na endoplazmatickém retikulu a dále jsou transportovány do apoplastu.<sup>58</sup> Syntéza BR je uskutečněna z kampesterolu díky enzymu cytochrom P450.<sup>42</sup>

### 1.1.6.2 Kyselina jasmonová

Kyselina jasmonová (JA) se řadí mezi oxylipiny, což jsou oxidované deriváty mastných kyselin. Mezi důležité funkce JA patří vývoj květů, embryogeneze a klíčení.<sup>59</sup> Fytohormon JA dokáže eliminovat biotické a abiotické stresy, například když jsou rostliny vystavené UV záření<sup>60</sup> nebo zvýšené teplotě.<sup>61</sup> Hromadění JA v buněčných kulturách *Petroselinum hortense* je podporováno houbovými patogeny.<sup>62</sup> Nejvyšší hladina JA se nachází v reprodukčních orgánech a v květech, kdežto nejnižší hladina je v kořenech a zralých listech.<sup>63</sup> Mezi významné deriváty JA patří methyl-jasmonát (Obrázek 9). Methyl-jasmonát je významný svou ochrannou funkcí, kterou působí na povrch rostlin. Tento derivát JA indukuje syntézu obranných inhibitorů proteináz nejen v ošetřených rostlinách, ale také v jejich okolí.<sup>64</sup>

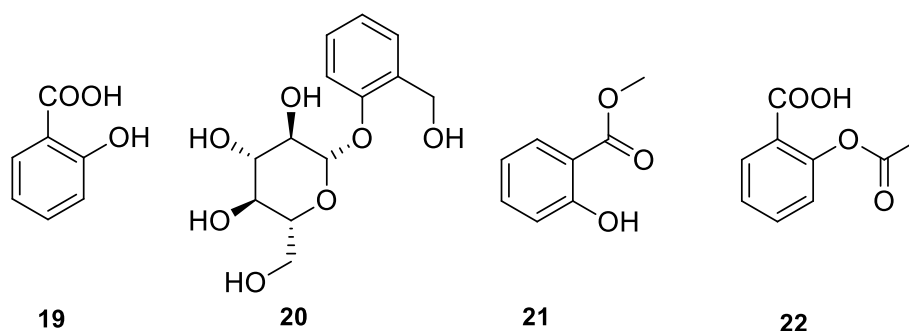


**Obrázek 9** Chemická struktura kyseliny jasmonové (17) a methyl-jasmonátu (18)

Syntéza JA začíná v momentě, kdy se pomocí fosfolipázy oddělí kyselina linolenová z membrán chloroplastu.<sup>65</sup>

### 1.1.6.3 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová (SA) je fenolický hormon, díky kterému rostlina může odvádět vodu povrchem listu či přijímat ionty.<sup>66</sup> Deriváty SA se souhrnně nazývají salicyláty. Znáмым derivátem SA je salicin (Obrázek 10), který se nachází ve vrbové kůře. Dalším významným salicylátem je methyl-salicylát (Obrázek 10), který se nachází v keři libavka.<sup>67,68</sup> Nejznámějším derivátem SA je kyselina acetylsalicylová (Obrázek 10), která se skrývá pod obchodním názvem aspirin (případně anopyrin či acylpyrin). Název aspirinu, léku proti bolesti, je odvozeny od *Poa pratensis* (lipnice luční). Acetyl SA byl poprvé izolován na konci 19. století slavnou německou firmou Bayer.<sup>42</sup>



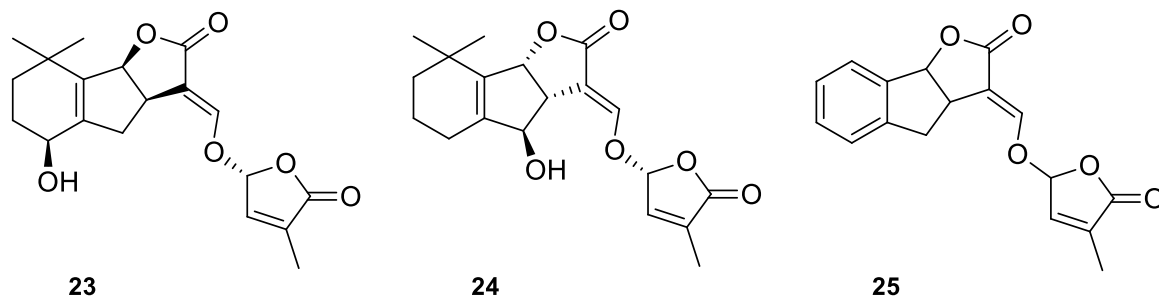
**Obrázek 10** Chemická struktura kyseliny salicylové (19), salicinu (20), methyl-salicylátu (21) a kyseliny acetylsalicylové (22)

V metabolismu SA existují stále nejasnosti. Výchozí látkou syntézy SA je aminokyselina fenylalanin, která je přeměněna pomocí enzymu fenylalanin amoniak-lyázy na kyselinu *trans*-skořicovou. Kyselina *trans*-skořicová je následně dekarboxylována na kyselinu benzoovou, která je hydroxylována díky enzymu 2-hydroxyláza kyseliny benzoové na SA.<sup>69</sup>

### 1.1.6.4 Strigolaktony

Rostlinné hormony strigolaktony (SL) jsou seskviterpenové laktony odvozené od karotenoidu.<sup>70</sup> SL jsou výborným inhibítozem větvení rostlin.<sup>71</sup> V roce 1966 byl izolován první SL, strigol (Obrázek 11), který byl získán z kořenového výměšku parazitického plevelu *Striga lutea*.<sup>72</sup> Parazitický plevel představuje v zemědělství velký problém, roste na kořenech napadené rostliny, kde se dále rozmnožuje. Svého hostitele parazitický plevel obírá o živiny, neboť není schopný fotosyntetické asimilace.<sup>73</sup> Z pozdějších studií na mutantech,

kterí trpěli deficitem SL bylo zjištěno, že fytohormon potlačuje větvení výhonků. Díky těmto studiím byly SL v roce 2008 zařazeny na seznam rostlinných regulátorů.<sup>74</sup> Vedle strigolu je dalším příkladem přirozeně se vyskytujícího SL jeho diastereomer orbanchol (Obrázek 11). Zástupcem syntetických analogů je například látka GR24 (Obrázek 11).<sup>75</sup>



**Obrázek 11** Chemická struktura strigolu (23), orbancholu (24) a GR24 (25)

Biosyntéza SL zahrnuje celkem tři enzymy, jednu izomerázu a dvě dioxygenázy, které se nachází v plastidech a štěpí karotenoidy. Enzymy mají za úkol přeměnit  $\beta$ -karoten na lakton, čímž vzniká karlakton, který je dále oxidován v cytosolu buňky, kde vzniká SL.<sup>76</sup>

## 1.2 Využití v zemědělství

IAA jsou ve vyšších koncentracích pro rostlinu toxické, a proto jsou v zemědělství hojně využívány auxinové herbicidy, které slouží k hubení dvouděložných plevelů. Auxinové herbicidy jsou ve srovnání s IAA stabilnější, a proto je jejich účinek dlouhotrvající. Mezi takové herbicidy patří deriváty kyseliny fenoxycetové obsahující atomy chloru, kdy mezi nejznámější derivát patří kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D).<sup>77,78</sup>

Aplikace GA pomocí postřiku vede k větší velikosti, hmotnosti, pevnosti plodů třešní<sup>79</sup> a hroznů bez pecek.<sup>80</sup> GA<sub>3</sub> se využívá ke zvýšení aktivity hydrolytických enzymů ve sladovnickém ječmeni<sup>81</sup> a k urychlení klíčení semen *Trichocereus terscheckii*.<sup>82</sup> Při produkci sóji zmírňuje GA<sub>3</sub> stres ze zasoleného prostředí a obnovuje normální vývoj sójových bobů.<sup>83</sup> V případě kukuřice dokáže GA<sub>3</sub> zmírnit účinky sucha v době, kdy se kukuřice nachází ve vegetativní fázi<sup>84</sup> a v kombinaci s křemíkem chrání plodinu před červy *Spodoptera frugiperda*.<sup>85</sup> GA<sub>4</sub> a GA<sub>7</sub> mohou chránit slupky jablek před rzivostí, která je často způsobena mrazem.<sup>86</sup>

Fytohormon cytokinin patří mezi hlavní regulátory výnosu semen. Exogenní aplikace na bavlník vede ke zvýšení výnosu semen bavlny, která jsou důležitým zdrojem oleje a

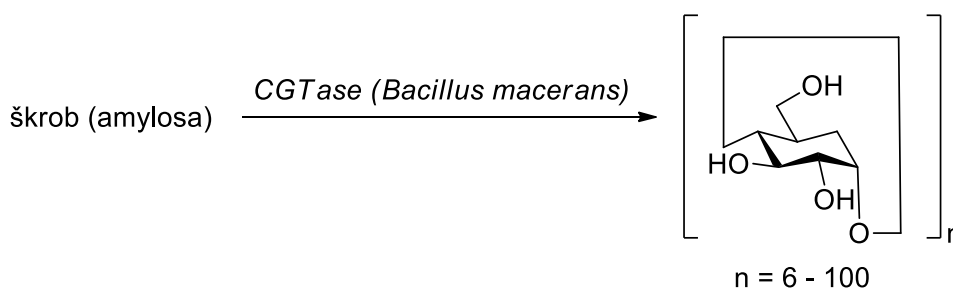
bílkovin.<sup>87</sup> Zástupce CK benzyladenin je v zemědělství využíván k produkci zdravých sazenic rýže.<sup>42</sup>

Exogenní aplikace ABA oddaluje vadnutí květín a umožňuje rostlině přežít krátké období v suchém prostředí, čehož se využívá při přepravě rostlin na dlouhé vzdálenosti. Při přepravě rostlin do prodejen mohou být rostliny vystaveny stresu jako je vysoká teplota nebo nepravidelný přísun vody, což způsobí vyschnutí substrátu, a nakonec zvadnutí rostliny.<sup>88</sup>

Ethen je hojně využíván k dozrávání banánů. Banány se sklízí zelené, aby nedošlo ke zkažení během dlouhé přepravy. Než se banány dopraví do prodejen, tak se nechávají dozrát ve speciálních skladech, kde se do vzduchu přidá ethen. Ethen působí jako inhibitor klíčení hlíz v bramborech, kde dochází k dočasnému zastavení klíčení.<sup>42</sup> Ethefon (kyselina 2-chlorethylfosfonová), který je v rostlinách metabolizován na ethen se využívá k předsklizňovému a posklizňovému zrání ovoce, zeleniny a obilovin.<sup>89</sup>

## 2 CYKLODEXTRINY

Cyklodextriny (CD) jsou makrocyklické oligosacharidy skládající se z různých počtů D-glukopyranosových jednotek spojených  $\alpha$ -1,4 glykosidickými vazbami. Jejich velmi důležitou vlastností je minimální toxicita, což umožňuje hojně využití v potravinářství či farmacii. Pozornost si zasloužily především svými schopnostmi inkluovat jiné molekuly do svých lipofilních kavit. CD jsou připravovány enzymatickou degradací polysacharidu škrobu (Obrázek 12).<sup>90,91</sup>



**Obrázek 12** Příprava CD enzymatickou degradací škrobu

### 2.1 Historie

Poprvé byly CD popsány v roce 1891 francouzským vědcem Antoinem Villiersem, který studoval působení máselné fermentace mikroorganismu *Bacillus amylobacter* na bramborovém škrobu.<sup>92,93</sup> Pozoroval tvorbu nežádoucích krystalů tehdy neznámé látky se zvláštními vlastnostmi. Tyto krystaly nazval celulosin, kvůli jejich podobnosti s celulosou. Mezi jejich společné vlastnosti patří odolnost vůči kyselé hydrolyze, absence redukujících funkčních skupin, špatná rozpustnost ve vodě a nestravitelnost mnohými mikroorganismy.

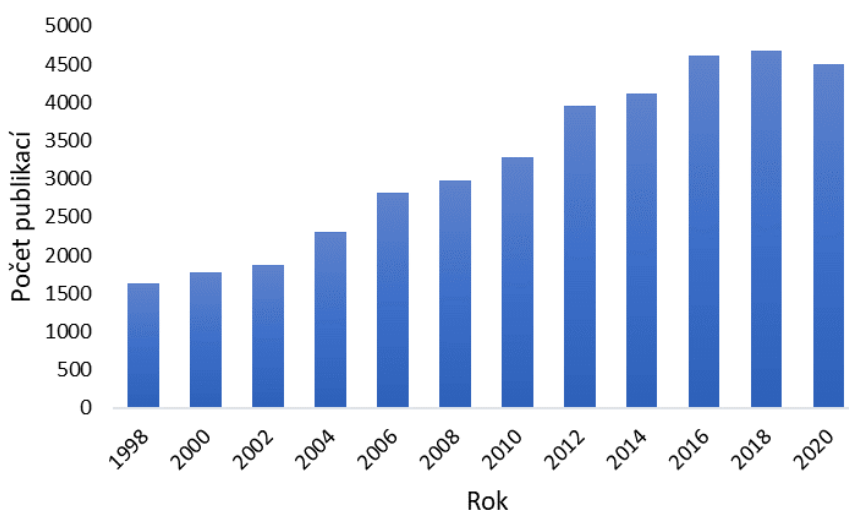
První, kdo popsal přípravu, izolaci a vlastnosti CD byl rakouský vědec Franz Schardinger.<sup>94</sup> Zabýval se výzkumem mikroorganismů, které mohou vést k otravě jídlem. V roce 1903 díky tomuto výzkumu objevil, že typ vysoce tepelně odolných mikroorganismů byl schopen rozpouštět škrob a vytvářet vedlejší krystalické produkty podobné celulosinu. Z jodové reakce zjistil, že se jedná o dva produkty, které pojmenoval krystalický dextrin- $\alpha$  a krystalický dextrin- $\beta$  (někdy také nazývané Schardingerovy dextriny). V roce 1904 izoloval nový mikroorganismus *Bacillus macerans*, který byl schopný poskytnout stejné krystalické dextriny jako předtím, ale s vyšším výtěžkem.<sup>95</sup>

Od počátku 20. století začali vytvářet historii CD další významní badatelé, kterými byli Pringsheim, Karrer, Feudenberg, French, Cramer, Casu, Bender, Saenger, Nagai, Szejtli a Pitha.

Po objevení CD nastalo v letech 1911 až 1935 období pochybností a neshod. Stále nebyla popsána struktura CD. Po této fázi od roku 1935 do roku 1950 nastalo období výzkumu, kdy bylo publikováno velké množství prací zejména dvou výzkumných skupin. První skupina pod vedením amerického chemika Dextera Frenche odhalila molekulovou hmotnost  $\alpha$ -CD a  $\beta$ -CD, kterou určili z rentgenové difrakce a z měření hustoty krystalů. French a jeho skupina dokázali správně přiřadit k  $\alpha$ -CD šest glukopyranosových jednotek, k  $\beta$ -CD sedm a ke  $\gamma$ -CD osm glukopyranosových jednotek.<sup>96</sup> Druhá skupina pod vedením německého vědce Karla Johanna Freudenberga dokázala jako první popsat cyklickou strukturu CD.<sup>97</sup> Poté v roce 1949 Friedrich Cramer zavedl nomenklaturu CD.<sup>98</sup>

Výzkum mezi lety 1950 a 1970, byl zaměřen na zjišťování konformace a analýzu spektroskopických dat CD a jejich inkluzních komplexů, které se mohou uplatnit v katalýze a dále využít jako enzymové modely.

Od roku 1970 se začínají CD hojně využívat v komerční sféře. Zpočátku našly své uplatnění ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, poté se jejich využití rozšířilo do dalších průmyslových odvětví. Bylo vyvinuto mnoho katalyzátorů na bázi CD pro různé syntézy.<sup>99,100</sup> V současnosti vychází každým rokem více než 4000 publikací na téma CD a jejich komplexů.<sup>101</sup>

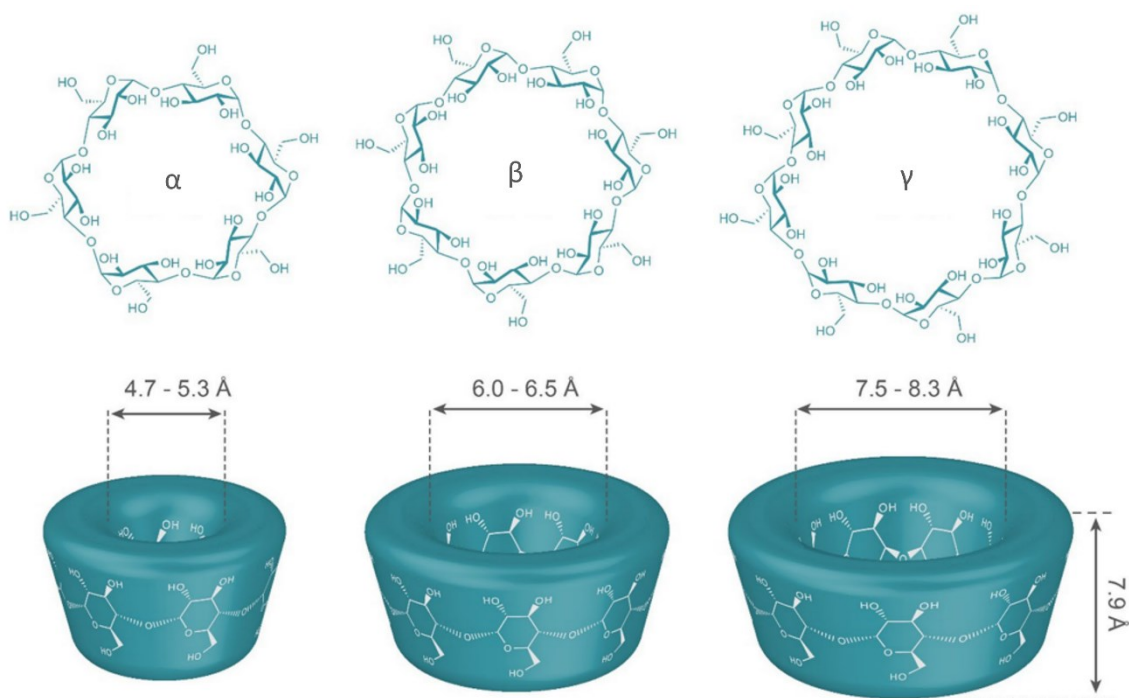


**Obrázek 13** Počet publikací o CD vydaných v letech 1998 až 2020 dle Chemical Abstracts, SciFinder Scholar<sup>TM</sup>



## 2.2 Rozdělení, vlastnosti a struktura cyklodextrinů

Přírodní CD jsou děleny podle počtu glukopyranosových jednotek. Nejčastěji se vyskytují CD se šesti ( $\alpha$ -CD), sedmi ( $\beta$ -CD) nebo osmi ( $\gamma$ -CD) glukopyranosovými jednotkami. Glukopyranosové jednotky v prostoru zaujímají  ${}^4C_1$  židličkovou konformaci. Přírodní CD mají tvar komolého kužele (Obrázek 14) s primárními a sekundárními hydroxylovými skupinami, které jsou umístěny na užších a širších okrajích struktury. Cyklická struktura CD vytváří vnitřní část makrocyklu (kavitu), která je hydrofobní a vnější hydrofilní část, což umožňuje interakci s velkým množstvím molekul.<sup>102</sup> CD se získávají ze směsi selektivní precipitací organickými látkami, mezi které patří například hexan nebo fluorbenzen, se kterými tvoří CD málo rozpustné inkluzní komplexy.<sup>91</sup>



**Obrázek 14** Chemické struktury a rozměry pro  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD<sup>103</sup>

Kvůli zlepšení fyzikálně-chemických vlastností (Tabulka 1), se začaly přírodní CD modifikovat. Cíleně vznikly deriváty, které vykazují lepší rozpustnost, také byla přizpůsobena velikost a tvar kavity pro inkludovanou molekulu.

Tabulka 1 Vybrané vlastnosti jednotlivých CD

Vlastnosti	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Počet glukopyranosových jednotek	6	7	8
Molekulová hmotnost [g·mol <sup>-1</sup> ]	973	1135	1297
Rozpustnost ve vodě při 25 °C [%, w/v ]	14,5	1,9	23,2
Výška kavity [Å]	7,9	7,9	7,9
Průměr kavity [Å]	4,7–5,3	6,0–6,5	7,5–8,3
Objem kavity [Å <sup>3</sup> ]	174	262	427

### 2.3 Inkluzní komplexy

CD mají schopnost tvořit relativně stabilní inkluzní komplexy se širokým spektrem různých pevných, kapalných a plynných látek. V těchto komplexech je hostující molekula držena v dutině hostitelské molekuly CD pomocí nekovalentních interakcí, jako jsou například van der Waalsovy síly, disperzní interakce nebo vodíkové vazby.<sup>104</sup> Hydrofobní kavita CD je vhodným hostitelem pro značné množství organických látek převážně lipofilního charakteru. Vzniklé inkluzní komplexy lze v některých případech izolovat jako stabilní krystalické látky.<sup>105</sup> Začlenění ligandu do CD má významný vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti ligandu.<sup>91</sup>

Důležitá charakteristika inkluzních komplexů je jejich stechiometrie, která závisí na velikosti kavity a charakteru hosta. Komplexy s různou stechiometrií se zpravidla vyskytují v roztoku vedle sebe v rovnováze. Termodynamické parametry a asociační konstanty ( $K_a$ ), někdy také označovány jako konstanty stability, se mohou stanovit různými fyzikálně-chemickými metodami.<sup>91</sup> Příkladem je isothermální titrační mikrokolorimetrie (ITC) nebo nukleární magnetická resonance (NMR), pomocí kterých lze určit stechiometrii titračními experimenty<sup>106</sup> nebo metodou Jobova grafu.<sup>107</sup> V průběhu titrace se do roztoku hosta přidává alikvotní podíl hostitele nebo v některých případech do roztoku hostitele určitý podíl hosta. Důležité je udržování konstantní koncentrace jedné z komponent. V režimu rychlé výměny na časové škále NMR závisí chemický posun na molárních zlomcích čisté komponenty podle rovnice (1).

$$\delta = \delta_{pure} \cdot x_i \quad (1)$$

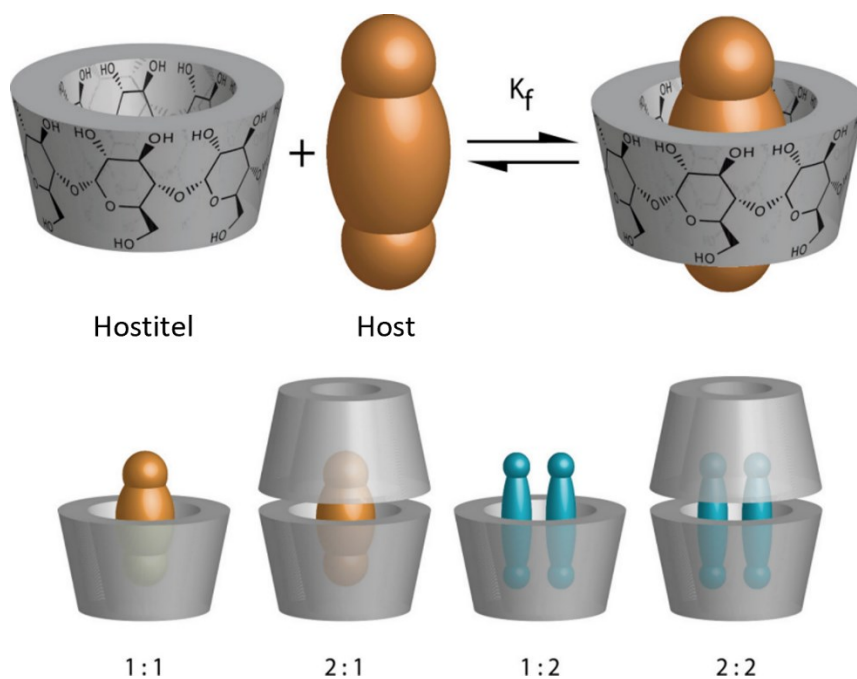
Další užitečnou NMR metodou pro určování stechiometrie komplexů je konstrukce Jobova grafu, která bývá často označována jako metoda kontinuálních variací.<sup>107</sup> Při této metodě se

udržuje konstantní součet koncentrací obou komponent a mění se jejich molární podíly. Další metoda, kterou lze určit stechiometrii a odhadnout stabilitu komplexu, je hmotnostní spektrometrie v kombinaci s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS). ESI patří mezi měkké ionizační techniky, při nichž dochází k fragmentaci původních molekul jen v malé míře. Pro studie ESI-MS jsou ideálními analyty nabitě koordinací komplexy, které jsou snadno ionizovány zpravidla pouze odstraněním protiontu, čehož lze snadno dosáhnout v polárních rozpouštědlech.<sup>108</sup>

V řadě případů interaguje host (G) s hostitelem (H) ve stechiometrickém poměru 1:1. Existují také příklady supramolekulárních systémů s vyšší stechiometrií, z nichž se nejběžněji vyskytují poměry 2:1 ( $G_2H$ ) a 1:2 ( $GH_2$ ) (Obrázek 15).<sup>109</sup> Vznik komplexu GH v poměru 1:1 vyjadřuje rovnice (2) a příslušnou rovnovážnou neboli asociační konstantu, vypočtenou pomocí koncentrací jednotlivých molekul vyjadřuje rovnice (3).



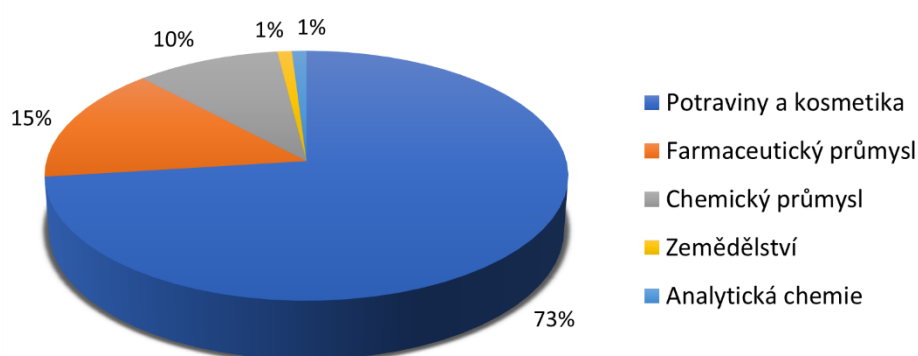
$$K_a^{1:1} = \frac{[GH]}{[G] \cdot [H]} \quad (3)$$



**Obrázek 15** Možné stechiometrie CD komplexů<sup>110</sup>

## 2.4 Využití cyklodextrinů

CD jsou netoxické látky, které mají v dnešní době velmi široké využití v různých odvětvích průmyslu. Kromě potravinářství se CD široce uplatňují ve farmacii, kde slouží k zakomplexování špatně rozpustných léčiv, aby došlo ke zvýšení jejich biologické dostupnosti.<sup>111</sup> Další uplatnění CD a jejich derivátů je kupříkladu v chemickém průmyslu, kde se tyto molekuly využívají jako katalyzátory pro zlepšení selektivity reakcí a pro separaci a čištění produktů.<sup>112</sup> Aplikace CD v oblasti analytické chemie, se konkrétně nachází v chromatografii, kde se hojně využívají pro separaci enantiomerů.<sup>113</sup>



**Obrázek 16** Procentuální zastoupení CD v jednotlivých odvětvích průmyslu<sup>114</sup>

### 2.4.1 Potravinářský průmysl

Komplexace těkavých látek před použitím v potravinách je výhodné kvůli zamezení degradace nebo ztráty aroma během zpracování potraviny. K zakomplexování komponent se využívá stabilizace takzvaně „by powdering“, která je typická pro různá ochucovadla a koření. V potravinářství mají komplexy CD velmi dobrou pověst pro jejich vysokou stabilitu během tepelného zpracování. Takovým příkladem je výroba bonbónů, sušenek a žvýkaček, kde je nutné použití většího množství ochucovadla, než jaké zůstává v konečném produktu. Při použití aditiva v podobě inkluzního komplexu s CD lze snížit množství použitých ochucovadel než při použití samotného ochucovadla. Navíc tyto komplexy vydrží déle sensoricky aktivní než tekuté esence nebo složky samotné.<sup>115,116</sup> Komplex s CD se využívá i u nepříjemně zapáchající a nestabilní kyseliny dokosaheptaenové (DHA), která se řadí mezi zdraví prospěšné omega tři nenasycené mastné kyseliny. Komplex DHA@CD dokáže snížit nepříjemný zápach a zlepšit stabilitu DHA.<sup>117</sup>

Dále se CD využívá ke zlepšení chuti nápojů a bylinných sirupů. Snižují hořkou chuť zelených čajů a čajových extraktů, která je zapříčiněna obsahem katechinů. Přidáním  $\beta$ -CD do nápojů, které obsahují katechiny dojde ke snížení nepříjemné hořké chuti, čehož se hojně využívá při výrobě čajových nápojů. Do ženšenového extraktu se přidává konkrétně  $\gamma$ -CD. Vzniklé komplexy potlačují nejen hořkou chuť, ale snižují i hygroskopické vlastnosti.<sup>118</sup>

CD v potravinách chrání lipofilní složky potravin, jako jsou vitamíny a mastné kyseliny, které jsou citlivé na kyslík, světlo nebo teplo. Takovým příkladem je vitamín E (tokoferol), jenž vykazuje nízkou rozpustnost ve vodě a vysokou citlivost na světlo. V komplexu s CD je vitamín E stabilnější než při použití samotného tokoferolu.<sup>119</sup>

#### 2.4.2 Zemědělství

CD tvoří komplexy se širokou škálou látek využívaných v zemědělství. Takovými látkami jsou syntetické pesticidy, mezi které patří herbicidy, insekticidy nebo fungicidy. Komplexace pesticidů s CD vede ke zlepšení jejich vlastností a zpravidla ke zvýšení účinnosti. Těkavé kapaliny lze díky komplexaci přeměnit na stabilní pevné prášky a dosáhnout tak ztráty jejich těkavosti. Některé účinné látky nejsou využívány kvůli jejich nesnesitelnému zápachu. V komplexu s CD lze dosáhnout snížení této nepříjemné vlastnosti, a to bez změny biologického účinku. Komplexace CD může zpomalovat uvolňování biologicky aktivních látek.<sup>120</sup>

Syntéza inkluzních komplexů hydroxypropyl- $\beta$ -CD a  $\beta$ -CD s nízkotoxickým fungicidem 2,4,5,6-tetrachlor-1,3-ftalonitrilem (také nazývaným chlorothalonil) vede ke zvýšení rozpustnosti ve vodě, tepelně stabilitě a zachování fungicidní aktivity.<sup>121</sup> Insekticid imidakloprid (IMI) patří mezi účinnou látku, která se využívá k hubení savého hmyzu a termitů. U komplexu  $\beta$ -CD s IMI došlo ke zlepšení rozpustnosti a ke zvýšení účinnosti pesticidů.<sup>122</sup> Komplex IMI@ $\beta$ -CD byl pro svou vlastnost řízeného uvolňování účinné látky aplikován v textilním odvětví, zemědělství nebo pro výrobu polypropylenových a filamentových přízí.<sup>123</sup>

Některé pesticidy relativně rychle degradují a jejich degradace začíná už během jejich syntézy a zvyšuje se aplikací do prostředí. Výsledné degradační produkty se liší od původních pesticidů fyzikálně-chemickými vlastnostmi, zejména mohou být toxičtější a mít delší perzistenci v prostředí. Takový případ byl zaznamenán u herbicidu, který se nazývá alloxidim. Degradační produkty alloxidimu vykazují vyšší rozpustnost ve vodě, mobilitu či tepelnou stabilitu, ale z výzkumu byla také zjištěna jejich zvýšená toxicita než u původní

sloučeniny.<sup>124</sup> Obecně platí, že vytvoření inkluzního komplexu CD s pesticidem, může zabránit jeho degradaci a tím zamezit zvýšení toxicity.<sup>125</sup>

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité přístroje

Měření spekter nukleární magnetická resonance byla prováděna na přístroji JEOL JNM-ECZ 400R/S3 pracujícím při frekvenci 399,78 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 100,53 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Chemické posuny v  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech jsou uváděny v jednotkách ppm. Jako interní standardy byla používána rozpouštědla  $^{13}\text{C}$   $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 39,59$  ppm,  $^1\text{H}$ :  $\delta(\text{DMSO-}d_5) = 2,50$  ppm a  $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4,75$  ppm. Použitá rozpouštědla byla získána z komerčních zdrojů a byla používána bez další úpravy.

K měření na ITC přístroji byl použit isothermální titrační mikrokalořimetr VP-ITC, firmy MicroCal. Mikrokalořimetr a jeho měřicí část zahrnuje automatickou mikropipetu o objemu 295  $\mu\text{l}$ . Dalšími dvěma částmi jsou referenční (srovnávací) a reakční (měřicí) cely ve tvaru mince o objemu 1,4438 ml. Teplota obou cel byla po celou dobu experimentu počítačově udržována na 30 °C. Experiment byl vyhodnocen v programu ORIGIN 7.0 s matematickým modelem („One set of Sites“) pro vyhodnocení reakční stechiometrie ( $n$ ), vazebnou konstantu ( $K$ ), enthalpii ( $\Delta H$ ) a entropii ( $\Delta S$ ). Vzorky byly před měřením odplyněny na odplyňovacím přístroji ThermoVac od firmy MicroCal.

ESI-MS experimenty byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics) za použití elektrospreje jako iontového zdroje. Měření byla prováděna v negativním skenovacím módu. Do iontového zdroje byly vzorky přiváděny kovovou kapilárou při konstantním průtoku 3  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Podmínky měření samotné  $\text{GA}_3$  a jejich směsí s hostujícími molekulami se lišily, proto jsou uvedeny separátně.  $\text{GA}_3$ : koncentrace 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , rozpouštědlo  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:1 (v:v), napětí na kapiláře 4,2 kV, napětí na konci kapiláry 140 V, teplota sušícího plynu 220 °C, průtok sušícího plynu 6  $\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ , tlak rozprašovacího plynu 55,16 kPa. Komplexy hostitel host: koncentrace hosta 12,5  $\mu\text{M}$ , koncentrace hostitele 12,5 nebo 37,5  $\mu\text{M}$ , rozpouštědlo  $\text{H}_2\text{O}$ , napětí na kapiláře 4,0 kV, napětí na konci kapiláry 20 V, teplota sušícího plynu 300 °C, průtok sušícího plynu 6  $\text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ , tlak rozprašovacího plynu 206,84 kPa. Jako sušící a rozprašovací plyn byl použit dusík. Tandemová hmotnostní spektra byla, po izolaci vybraného iontu, měřena za pomoci kolizní indukované disociace (CID), přičemž jako kolizní plyn bylo použito helium.



### 3.2 Měřený ligand a hostitelské molekuly

V experimentu byl měřen ligand GA<sub>3</sub> (Obrázek 4), jehož molární hmotnost je 346,38 g·mol<sup>-1</sup>. Ligand byl získán od firmy Merck (Sigma–Aldrich).

Jako hostitelské molekuly byly použity α-CD, β-CD a γ-CD (Obrázek 14). Molární hmotnost α-CD činí 972,86 g·mol<sup>-1</sup>, v případě γ-CD je uváděna hodnota 1297,12 g·mol<sup>-1</sup>. Oba makrocykly byly získány od firmy Glentham life sciences. Posledním makrocyklem, jenž byl při měření využit je β-CD, který byl získán od firmy Acros Organics a před samotným měřením byl standardizován pomocí CHNS elementární analýzy. Experimentální molární hmotnost používaného β-CD byla 1224,55 g·mol<sup>-1</sup>.

### 3.3 Příprava pufru o pH 8,16

Pro NMR měření byl připraven pufr o pH 8,16. Pufr byl připraven ze 14,26 mg, 16,57 mg KCl a 0,92 mg NaOH. Jednotlivé navážky byly rozpuštěny ve 4,5 ml D<sub>2</sub>O.

Pufr pro ITC měření byl připraven v odměrné baňce o objemu 500 ml, kde bylo kvantitativně převedeno 1,5511 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,8598 g KCl a 0,0857 g NaOH. Odměrná baňka byla doplněná po rysku destilovanou vodou. pH takto připraveného pufru bylo změřeno na pH metru HI 2221 Bench a hodnota byla stanovena na 8,16.

### 3.4 Příprava vzorků

Navážky byly stanoveny na mikrovahách značky Mettler Toledo, které měří s přesností na ±1 μg a na analytických vahách Boeco s přesností na ±0,1 mg. K pipetování byly použity automatické pipety Transferpette S v rozsahu objemu 100–1000 μl a Eppendorf Research Plus 20–200 μl.

Vzorek na NMR měření byl vytvořen rozpuštěním navážky 5,5 mg GA<sub>3</sub> v 600 μl DMSO-*d*<sub>5</sub>. Do NMR kyvety bylo odpipetováno 500 μl.

Navážka s obsahem 5,8 mg GA<sub>3</sub> byla rozpuštěna v 600 μl D<sub>2</sub>O. Do NMR kyvety bylo odebráno 500 μl nasyceného roztoku.

Ke zbytku asi 100 μl roztoku, bylo přidáno 60 mg 10 % K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a dalších 500 μl D<sub>2</sub>O, poté bylo do kyvety odebráno 500 μl roztoku do NMR kyvety.

Jako vnitřní standard pro NMR byla použita navážka 9,71 mg kyseliny maleinové, která byla rozpuštěná v 1 ml D<sub>2</sub>O. 100 µl tohoto roztoku bylo přidáno do kyvety s 500 µl nasyceného roztoku GA<sub>3</sub>.

Pro měření stability GA<sub>3</sub> v alkalickém prostředí byl připraven vzorek z 5,09 mg GA<sub>3</sub> rozpuštěné v 600 µl D<sub>2</sub>O. Do NMR kyvety bylo odpipetováno 500 µl vzorku. Navážka 45,9 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> byla rozpuštěna v 600 µl D<sub>2</sub>O. 500 µl roztoku s K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bylo odebráno do kyvety ke GA<sub>3</sub>.

Na přípravu vzorku pro ověření stability GA<sub>3</sub> v pufru byla použita navážka 0,76 mg GA<sub>3</sub>, která byla rozpuštěna v 1 ml pufru.

Pro NMR titraci byly vzorky připravené rozpuštěním navážky GA<sub>3</sub> v 600 µl D<sub>2</sub>O nebo v pufru o pH 8,16 (Tabulka 2 a 3). Poté bylo odebráno Do NMR kyvety 500 µl roztoku. Obdobně byl připraven i roztok s CD s rozdílem, že makrocyklus byl rozpuštěn v objemu 750 µl D<sub>2</sub>O nebo pufru o pH 8,16 (Tabulka 2 a 3). Do kyvety obsahující ligand byly postupně pipetovány celkem tři ekvivalenty CD.

**Tabulka 2** Navážky GA<sub>3</sub> a CD rozpuštěných v D<sub>2</sub>O

Prostředí	Vzorek	m [mg]
D <sub>2</sub> O	GA <sub>3</sub>	0,78
	α-CD	6,41
	GA <sub>3</sub>	0,80
	β-CD	7,46
	GA <sub>3</sub>	0,78
	γ-CD	8,52

**Tabulka 3** Navážky GA<sub>3</sub> a CD rozpuštěných v pufru

Prostředí	Vzorek	m [mg]
Puf. pH 8,16	GA <sub>3</sub>	0,76
	α-CD	6,41
	GA <sub>3</sub>	0,76
	β-CD	8,05
	GA <sub>3</sub>	0,79
	γ-CD	8,44

Jednotlivé navážky ligandu a makrocyklu (Tabulka 4 a 5) použitých na konstrukci Jobova grafu byly rozpuštěny ve 3,3 ml D<sub>2</sub>O. Do 11 NMR kyvet byly postupně pipetovány alikvotní objemy obou komponent, v rozsahu molárního zlomku každé z komponent  $x_i=0-1$ .

Tabulka 4 Navážky GA<sub>3</sub> a CD pro Jobův graf

Vzorek	m [mg]
GA <sub>3</sub>	2,53
α-CD	6,81
GA <sub>3</sub>	2,43
β-CD	7,91
GA <sub>3</sub>	2,43
γ-CD	9,09

Tabulka 5 Pipetované objemy roztoků do jednotlivých NMR kyvet

Kyveta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
V <sub>GA<sub>3</sub></sub> [μl]	600	540	480	420	360	300	240	180	120	60	0
V <sub>CD</sub> [μl]	0	60	120	180	240	300	360	420	480	540	600

Vzorky pro ROESY experiment byly připraveny rozpuštěním navážek GA<sub>3</sub> (Tabulka 6) v 700 μl D<sub>2</sub>O. Následně bylo odpipetováno 600 μl vzniklých nasycených roztoků, které byly přidány k navážce β-CD nebo γ-CD (Tabulka 6). Poté bylo napipetováno 500 μl jednotlivého roztoku do kyvety.

Tabulka 6 Navážky GA<sub>3</sub> a CD pro měření ROESY

Vzorek	GA <sub>3</sub>	β-CD	GA <sub>3</sub>	γ-CD
m [mg]	0,71	4,66	0,79	5,32

Na ITC měření byly vzorky připraveny podle (Tabulky 7 a 8).

Tabulka 7 Navážky GA<sub>3</sub> a CD rozpuštěných v H<sub>2</sub>O pro měření na ITC

Prostředí	Vzorek	m [mg]	V [ml]
H <sub>2</sub> O	GA <sub>3</sub>	1,91	10
	α-CD	7,28	1,5
	GA <sub>3</sub>	1,67	10
	β-CD	5,62	1
	GA <sub>3</sub>	1,88	10
	γ-CD	9,89	1,5

**Tabulka 8** Navážky GA<sub>3</sub> a CD rozpuštěných v pufru pro měření na ITC

Prostředí	Vzorek	m [mg]	V [ml]
Pufř pH 8,16	GA <sub>3</sub>	1,74	10
	α-CD	4,95	1
	GA <sub>3</sub>	1,74	10
	β-CD	6,09	1
	GA <sub>3</sub>	1,76	10
	γ-CD	6,57	1

Na klíčící experiment byly připraveny celkem tři roztoky. První roztok byl připraven z 5,2 mg GA<sub>3</sub>, navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 500 ml, která byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Další roztok byl připraven z navážky 9,8 mg β-CD, kde byl CD kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněn po rysku předchozím roztokem GA<sub>3</sub>. Roztok s β-CD byl připraven z navážky 9,7 mg a převeden do 250 ml odměrné baňky. Odměrná baňka byla po rysku doplněna destilovanou vodou. Experiment byl sestaven z celkem 22 misek, které vcelku obsahovaly 220 semen z rostliny *Lunaria rediviva* (měsíčnice vytrvalá), z nichž 100 bylo po dobu 14 dní zamrazeno na teplotu -5 °C a zbylých 120 bylo uchovávaných při laboratorní teplotě. Do každé misky bylo na vatový tampon uloženo 10 semen, které byly zality 15 ml roztoky (Tabulka 9). Aplikace roztoků probíhala v uzavřeném laminárním boxu. Misky, semena a vatové tampony byly před použitím dezinfikovány ponořením do 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Tabulka 9** Počet misek s jednotlivými roztoky použitých na klíčící experiment

Vzorek	H <sub>2</sub> O	GA <sub>3</sub>	β-CD	β-CD s GA <sub>3</sub>
Laboratorní teplota	3	3	3	3
Teplota -5 °C	3	3	3	1

## 4 DIKUZE A VÝSLEDKY

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda  $GA_3$  tvoří komplex s  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD či  $\gamma$ -CD. Vzniklý komplex  $GA_3@CD$  by mohl vyřešit problém s aplikací vhodné koncentrace hormonu, čímž by bylo zajištěno dlouhodobé uvolňování nízké koncentrace a tím prodloužit působení rostlinného hormonu.

### 4.1 Kyselina gibberellová

V první části experimentu bylo hledáno rozpouštědlo vhodné pro NMR měření, ve kterém by byla zkoumaná kyselina dobře rozpustná. Pro ověření identity komerční  $GA_3$  byl jako rozpouštědlo použito DMSO- $d_6$ , ve kterém došlo k rozpuštění  $GA_3$ . U tohoto roztoku byla změřena  $^{13}C$ , DEPT-135, 2D COSY a 2D HSQC spektra, pomocí kterých byly přiřazeny signály uhlíků (Příloha 1) a vodíků (Příloha 2) zkoumané kyseliny.  $^1H$  NMR spektrum bylo porovnáno se spektrem z databáze<sup>126</sup>, čímž bylo prokázáno, že se jedná o zkoumanou  $GA_3$ . Následně byla vyzkoušena rozpustnost  $GA_3$  v  $D_2O$ , protože komplexy s CD v DMSO- $d_6$  jsou podstatně méně stabilní nebo by komplexace vůbec nemusela proběhnout. V  $D_2O$  se rozpustila pouze část ligandu, proto byl nasycený roztok odebrán do NMR kyvety a bylo provedeno měření  $^1H$  NMR spektra. Pro zjištění koncentrace již změřeného nasyceného roztoku  $GA_3$  byl do kyvety přidán roztok standardu kyseliny maleinové a změřeno  $^1H$  NMR spektrum. Za pomoci integrace a známé koncentrace k. maleinové byla vypočtená koncentrace nasyceného roztoku  $GA_3$  v kyvetě na hodnotu  $0,015 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . K nerozpuštěné navážce z předešlého vzorku byl přidán  $K_2CO_3$  a další množství  $D_2O$ .  $K_2CO_3$  v roztoku vytvořil alkalické prostředí, ve kterém se  $GA_3$  rozpustila, ale v  $^1H$  NMR spektrech byla zpozorována nová sada signálů. Vznik nové sady signálů může být zapříčiněn hydrolyzou laktonového kruhu. Roztok s  $K_2CO_3$  byl příliš alkalický, jelikož docházelo k degradaci  $GA_3$ . Z tohoto důvodu bylo hledané vhodné vodné prostředí, a proto byl vytvořen pufr z  $H_3BO_3$ , KCl a NaOH, jehož výsledné pH bylo 8,16. V tomto pufru byla změřena stabilita  $GA_3$ , vzorek se změnil  $4\times$  s časovou prodlevou 24 hodin. I po dlouhém časovém intervalu byla měřená kyselina v roztoku o daném pH stabilní. Proto byl pufr následně použit i pro další experimenty.

## 4.2 Supramolekulární komplexy kyseliny gibberellové s CD

### 4.2.1 Nukleární magnetická resonance

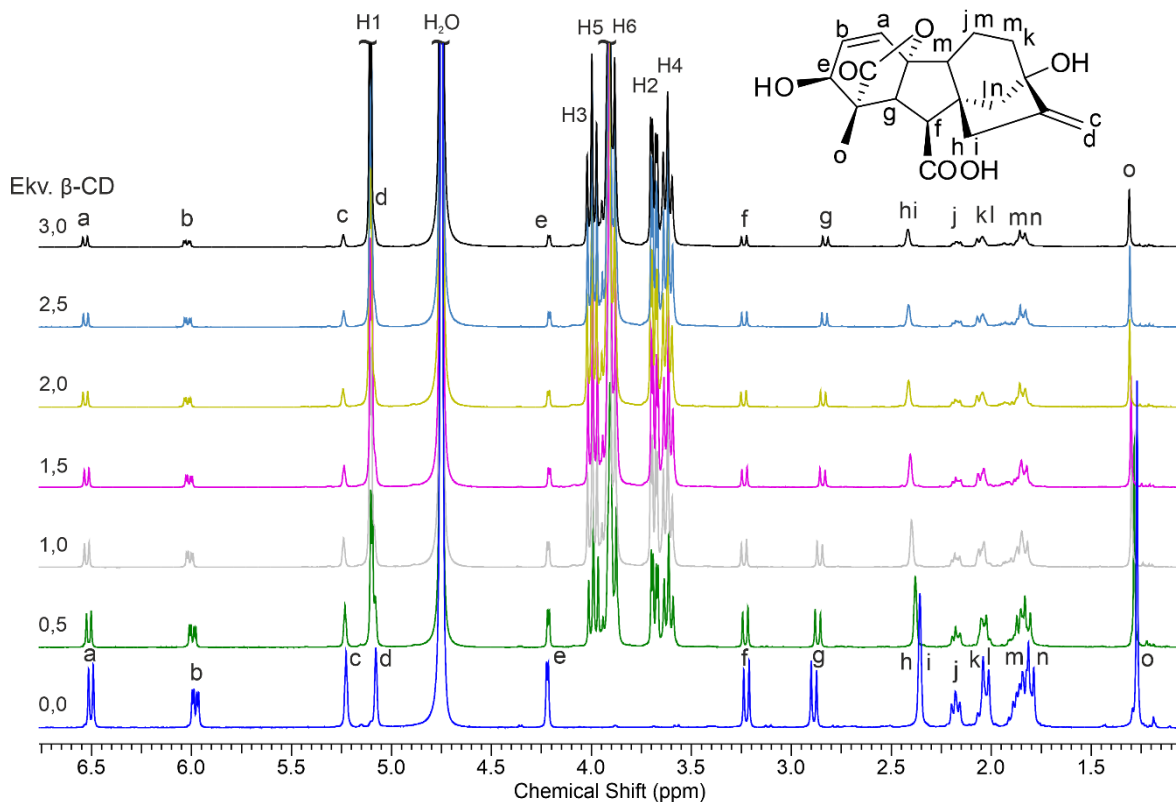
#### Titrace

NMR titrace je analytická metoda, která studuje interakce mezi hostem a hostitelskou molekulou. Interakce mezi hostem a hostitelem se zpravidla projevuje změnou rozložení elektronové hustoty, čímž se změní chemické posuny signálů obou komponent. Supramolekulární komplex vzniká vždy v rovnováze s nekomplexovanými složkami. Vzhledem k rychlosti NMR spektrometru můžeme rozlišit rychlou nebo pomalou výměnu. Rychlá výměna je typická pro hostitelské molekuly CD, kde během titrace dochází k postupnému posunu signálu, tak jak roste molární zlomek komplexované složky.

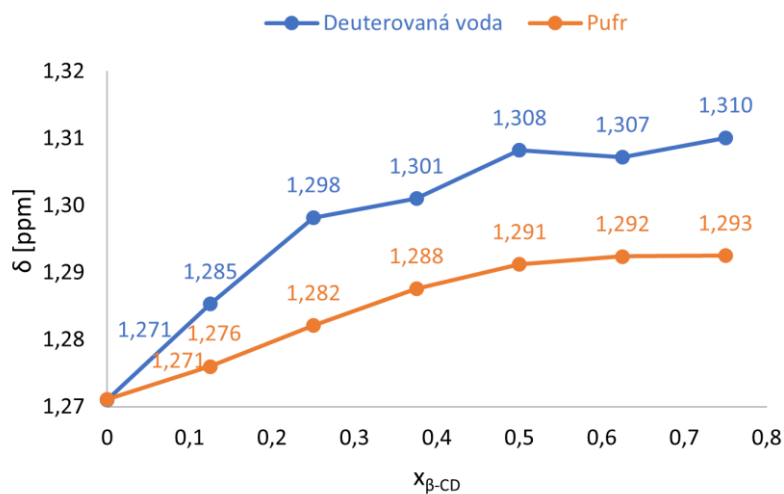
V tomto experimentu byly ke GA<sub>3</sub> postupně pipetovány tři ekvivalenty  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD nebo  $\gamma$ -CD. Měření bylo kromě čisté D<sub>2</sub>O provedeno také v pufru o pH 8,16.

Titrace ligandu GA<sub>3</sub> s  $\alpha$ -CD. V <sup>1</sup>H NMR spektrech (Příloha 3) nebyly zaznamenány žádné výrazné posuny, které by odpovídaly interakcím mezi jednotlivými komponenty. V čisté D<sub>2</sub>O i v pufru (Příloha 4) byly výsledky měření obdobné. Lze tedy soudit, že stabilita komplexu GA<sub>3</sub>@ $\alpha$ -CD v roztoku je velmi nízká, pokud tedy vůbec za dané koncentrace vzniká. Tento výsledek se dal očekávat vzhledem k relativně malé velikosti kavity  $\alpha$ -CD.

Při titraci s  $\beta$ -CD byly zaznamenány malé, ale jednoznačné posuny signálů v <sup>1</sup>H NMR spektrech (Obrázek 17). Největší posun byl zaznamenán u signálu methylové skupiny ligandu GA<sub>3</sub>. Z toho vyplývá, že právě methylová skupina je nejvíce ovlivněna vznikem komplexu. Chemické posuny signálů methylové skupiny naměřené v obou prostředích, byly následně vyneseny do grafu (Obrázek 18) v závislosti na molárním zlomku. Z křivek v grafu lze vyčíst, že vzniklý komplex se v obou prostředích chová obdobně (Příloha 5). Nicméně v prostředí čisté D<sub>2</sub>O jsou u GA<sub>3</sub>@ $\beta$ -CD zaznamenány větší změny chemického posunu.



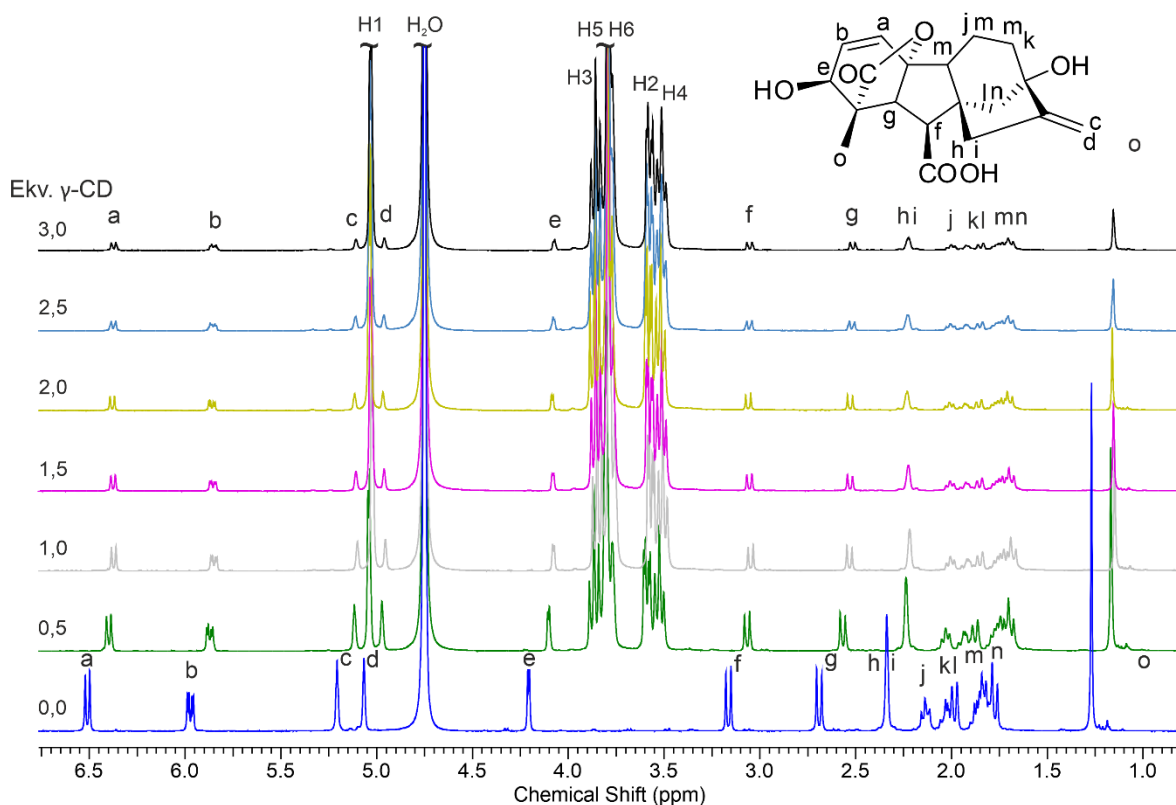
Obrázek 17  $^1\text{H}$  NMR spektra GA<sub>3</sub> titrované roztokem  $\beta$ -CD v  $\text{D}_2\text{O}$  při 30 °C



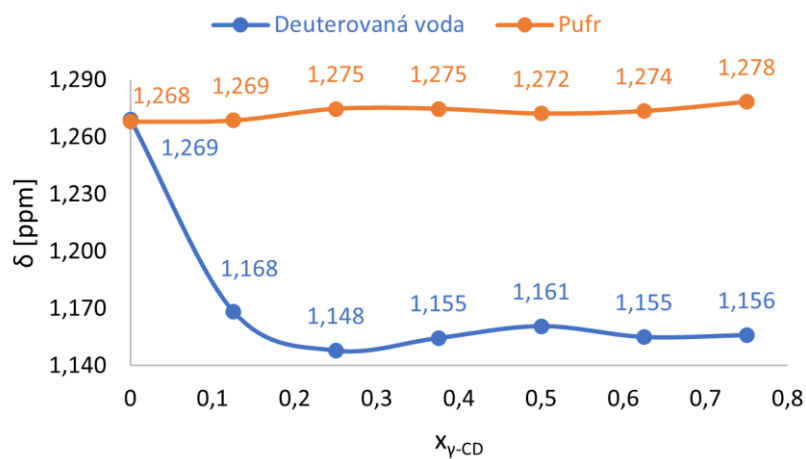
Obrázek 18 Změna chemických posunů methylové skupiny GA<sub>3</sub> v závislosti na molárním zlomku  $\beta$ -CD v  $\text{D}_2\text{O}$  a pufru

Z titrace s  $\gamma$ -CD lze zpozorovat posun mezi  $^1\text{H}$  NMR spektrem čisté GA<sub>3</sub> (Obrázek 19) a spektrem po prvním přidání ekvivalentu hostitelské molekuly. Tento jev nasvědčuje možnému vzniku komplexu GA<sub>3</sub>@ $\gamma$ -CD. Největší posun byl stejně jako u GA<sub>3</sub>@ $\beta$ -CD

zaznamenán u signálu methylové skupiny GA<sub>3</sub>, proto byly tyto signály pro titrace v obou prostředích vyneseny do grafu (Obrázek 20) v závislosti na molárním zlomku. Z grafu lze zpozorovat, že mezi první a druhou hodnotou chemického posunu v prostředí D<sub>2</sub>O došlo k strmému poklesu, což by mohlo nasvědčovat vzniku komplexu, kdežto v prostředí pufru jsou chemické posuny konstantní (Příloha 6) oproti D<sub>2</sub>O.



Obrázek 19 <sup>1</sup>H NMR spektra GA<sub>3</sub> titrované roztokem  $\gamma$ -CD v D<sub>2</sub>O při 30 °C



Obrázek 20 Změna chemických posunů methylové skupiny GA<sub>3</sub> v závislosti na molárním zlomku  $\gamma$ -CD v D<sub>2</sub>O a pufru

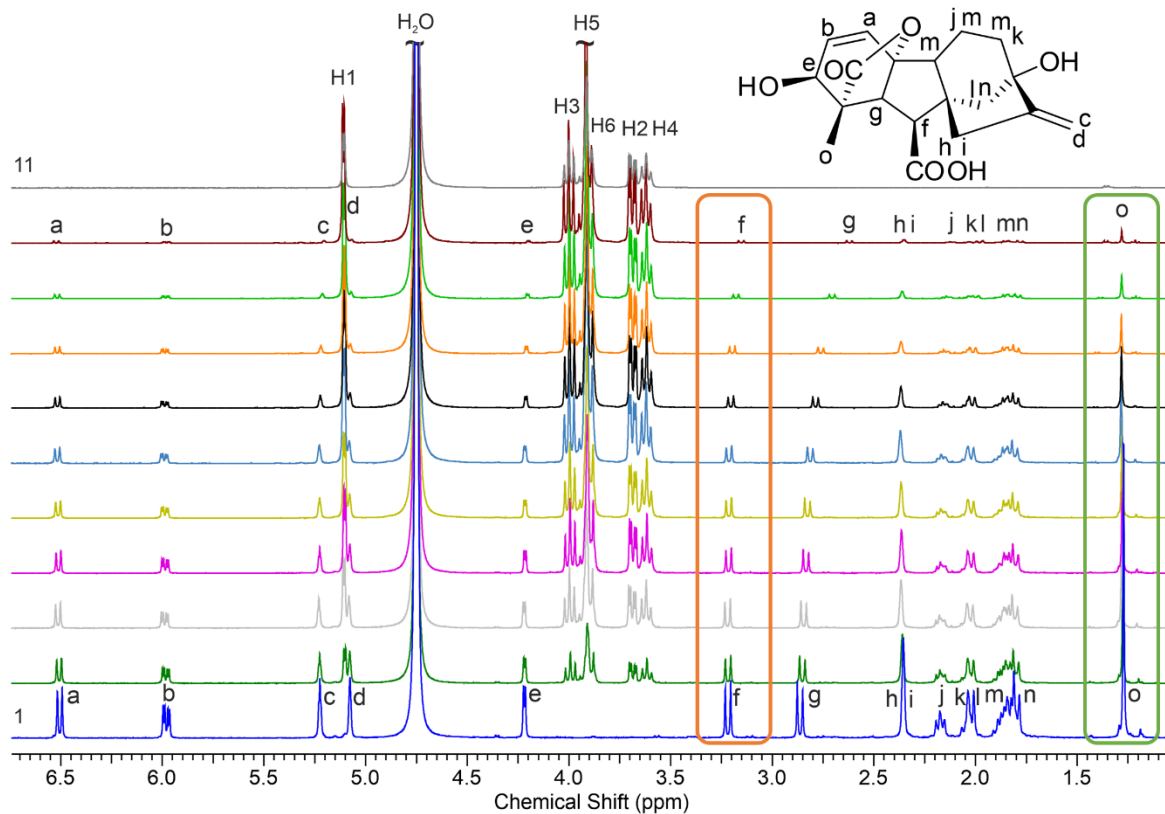


### Konstrukce Jobova grafu

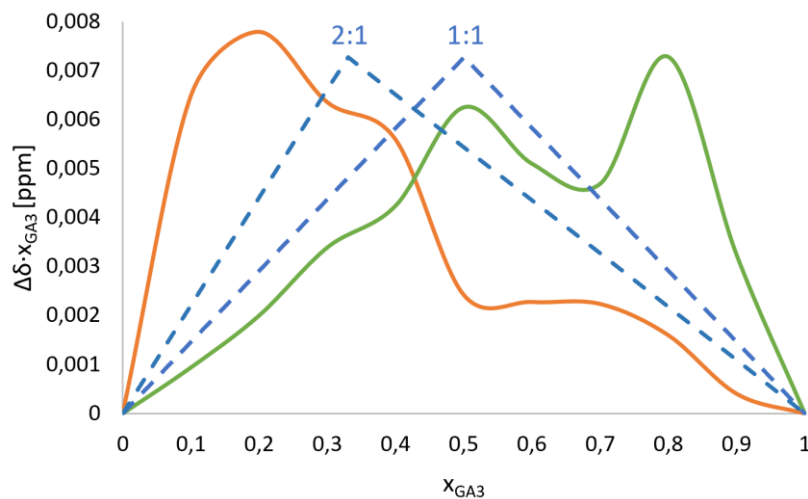
Pro určení stechiometrie komplexů byla použita analytická metoda, která se nazývá Jobův graf (Jobs plot). Při této metodě je udržován konstantní součet koncentrací a mění se molární zlomky ligandu a makrocyklu.

Nejdříve byla změřena  $GA_3$  s  $\alpha$ -CD. Již před měřením bylo předpokládáno, na základě výše popsanych titračních experimentů, že vnitřní prostor hostitelské molekuly  $\alpha$ -CD je pro  $GA_3$  příliš malý. V naměřených  $^1H$  NMR spektrech (Příloha 7) byly zpozorovány jen velmi malé změny chemických posunů. Dá se tedy opět konstatovat, že komplex  $GA_3@ \alpha$ -CD pravděpodobně nevzniká.

Následovalo měření  $GA_3$  s  $\beta$ -CD. V tomto případě byla očekávaná komplexace v poměru 1:1. V  $^1H$  NMR spektrech (Obrázek 21) s  $\beta$ -CD došlo k výraznějším posunům v porovnání s předchozím měřením s  $\alpha$ -CD, a to například u signálu H-atomu na  $\alpha$ -atomu vzhledem ke karboxylové funkci ( $H_f$ ) nebo u signálu methylové skupiny ( $H_o$ ). Byl vytvořen graf závislosti změny chemického posunu v součinu s molárním zlomkem na molární zlomku (Obrázek 22), který by mohl určit stechiometrický poměr vzniklého komplexu. Nicméně výsledky tohoto experimentu jsou velmi nejednoznačné. Graf neukazuje jasnou stechiometrii komplexu  $GA_3@ \beta$ -CD, neboť maximum signálu  $H_f$  se nachází v hodnotě molárního zlomku přibližně 0,20 a maximum signálu  $H_o$  se nachází okolo 0,85. V grafu je dále vykreslený ideální případ pro vznik komplexu  $G@H$  ve stechiometrii 1:1, jehož maximum leží v 0,50 a poměr 2:1 s maximem v 0,33. Tato nejednoznačná interpretace výsledků může plynout jednak z toho, že změny chemických posunů jsou velmi malé, prakticky na hranici chyby měření a jednak z možné přítomnosti dalších procesů, například disociace dimeru kyseliny při nižších koncentracích, které rovněž ovlivňují chemický posun.



**Obrázek 21**  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  a  $\beta\text{-CD}$  měřena Jobovou metodou



**Obrázek 22** Graf obsahující chemické posuny v součinu s molárním zlomkem signálů  $\text{H}_f$  a  $\text{H}_o$  v závislosti na molárním zlomku  $\text{GA}_3$

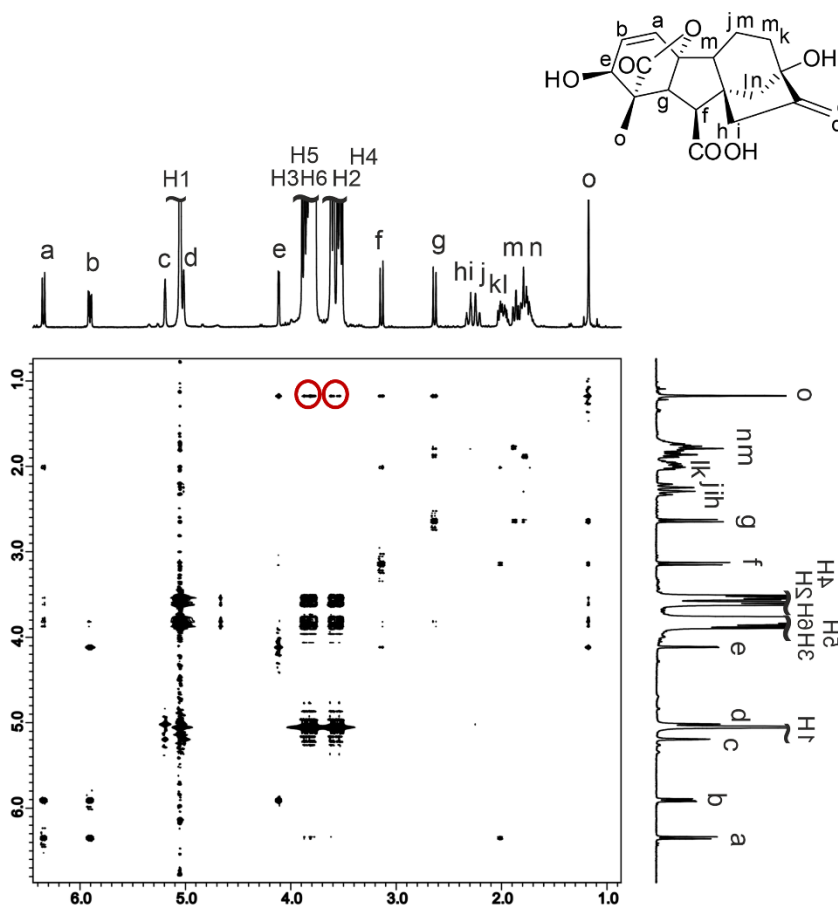
Poslední měření pomocí metody kontinuálních variací proběhlo pro komplex  $\text{GA}_3@ \gamma\text{-CD}$ . Posuny jednotlivých signálů v  $^1\text{H}$  NMR spektrech (Příloha 8) byly obdobné ve srovnání se

spektry získanými při měření s  $\beta$ -CD. Což znamená že, komplex  $\text{GA}_3@ \gamma$ -CD s velkou pravděpodobností vzniká, avšak jeho stechiometrie je nejasná.

V případě  $^1\text{H}$  NMR experimentů se všemi třemi homology CD se objevil intenzivní posun u signálu  $\text{H}_g$ . Tento jev může být zapříčiněn právě rozpadem výše zmíněného dimeru kyseliny.

### ROESY experiment

K potvrzení, zda mezi sebou  $\text{GA}_3$  a  $\beta$ -CD či  $\gamma$ -CD interaguje, a dochází tedy ke vzniku komplexu, byly změřeny 2D ROESY spektra, která umožňují detekovat prostorově blízké H-atomy. V naměřeném ROESY spektru  $\text{GA}_3@ \beta$ -CD nebyly viděny žádné výrazné interakce, které by jednoznačně potvrzovaly vznik komplexu. V případě měření  $\text{GA}_3$  s  $\gamma$ -CD (Obrázek 23) byly interakce intenzivnější oproti měření s  $\beta$ -CD, ve spektru lze zpozorovat interakce mezi H-atomy lokalizovanými uvnitř kavity  $\gamma$ -CD a methylovou skupinou zkoumané kyseliny (V Obrázku 23 zvýrazněno červenými kroužky). Tento experiment tudíž podporuje hypotézu o přítomnosti komplexu  $\text{GA}_3@ \gamma$ -CD ve studovaném roztoku.



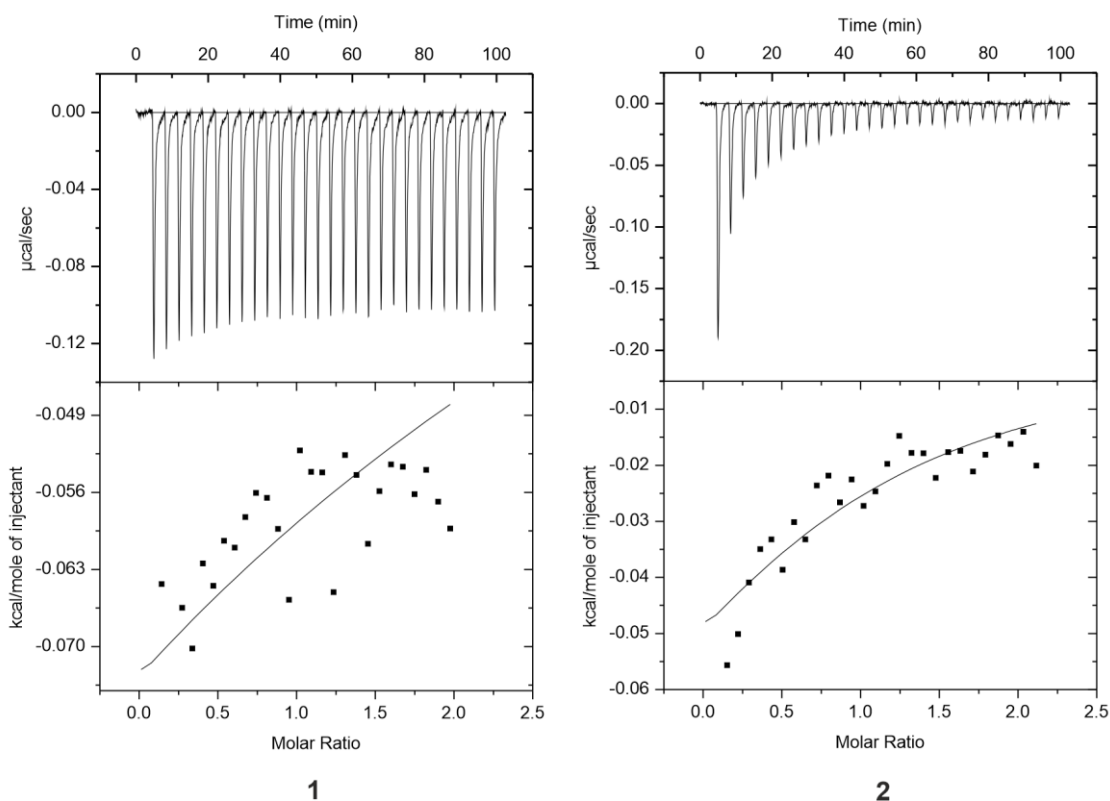
Obrázek 23 2D ROESY spektrum komplexu  $\text{GA}_3$  s  $\gamma$ -CD

#### 4.2.2 Isotermální titrační mikrokalorimetrie

Druhou použitou metodou byla ITC, díky které bylo možné zjistit stechiometrií ( $n$ ), vazebnou konstantu ( $K$ ), změnu enthalpie ( $\Delta H$ ) a změnu entropie ( $\Delta S$ ). V cele kalorimetru se nacházela  $GA_3$  a v jehle  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD nebo  $\gamma$ -CD. Tři experimenty byly provedeny v čisté vodě, další tři v pufru o pH 8,16. Všechny experimenty na ITC byly prováděny při 30°C.

Ani pomocí ITC nebyla stechiometrie vzniklých komplexů objasněna. Body, které znázorňují hodnoty uvolněných tepel během titrace, vykazují značný rozptyl od modelové funkce, a při zachování variability ve všech třech iteračních parametrech ( $n$ ,  $K$ ,  $\Delta H$ ) nekonvergovala iterace ke smysluplným hodnotám. Aby bylo možné získat alespoň hodnoty  $K$ , bylo nutné hodnoty  $n$  zafixovat dle předpokládané stechiometrie 1:1. Z tohoto důvodu byla stechiometrii přisouzena hodnota jedna, což by znamenalo, že host tvoří s daným hostitelem komplex ve stechiometrickém poměru 1:1 a následně proběhla iterace. Z křivky byly získány parametry  $K$ ,  $\Delta H$  a dopočítána byla hodnota  $\Delta S$ .

Ze záznamu experimentu, kdy byl ligand titrován  $\alpha$ -CD (Obrázek 24), je možno vyčíst že v prostředí pufru je uvolněné teplo mnohem větší než ve  $H_2O$ . Větší hodnota vazebné konstanty (Tabulka 10) přísluší měření v pufru, z čehož lze soudit, že kdyby komplex vznikal, v prostředí pufru bude stabilnější než v čisté  $H_2O$ .

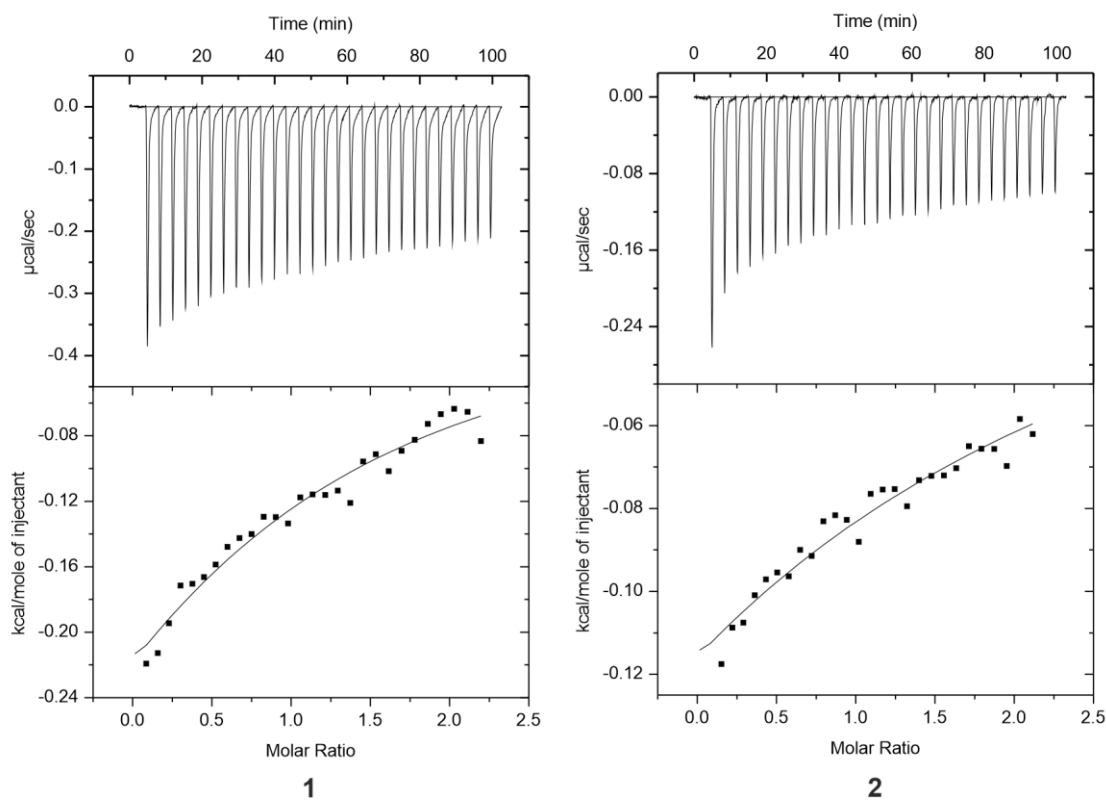


Obrázek 24 ITC záznamy  $GA_3$  titrované roztokem  $\alpha$ -CD v  $H_2O$  (1) a v pufru (2)

Tabulka 10 Termodynamické parametry komplexace  $GA_3$  s  $\alpha$ -CD v  $H_2O$  a v pufru

Prostředí	$n$	$K [M^{-1}]$	$\Delta H [kJ \cdot mol^{-1}]$	$\Delta S [kJ \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}]$
$H_2O$	1	$7 \cdot 10^2$	-7552	-24,9
Pufr o pH 8,16	1	$1,6 \cdot 10^3$	-0,55	0,06

Ze záznamu experimentu, kde bylo titrováno odměrným roztokem  $\beta$ -CD (Obrázek 25) bylo uvolněné teplo v obou prostředích přibližně stejné. Termodynamické parametry (Tabulka 11) se v měřených prostředích významně nelišily.

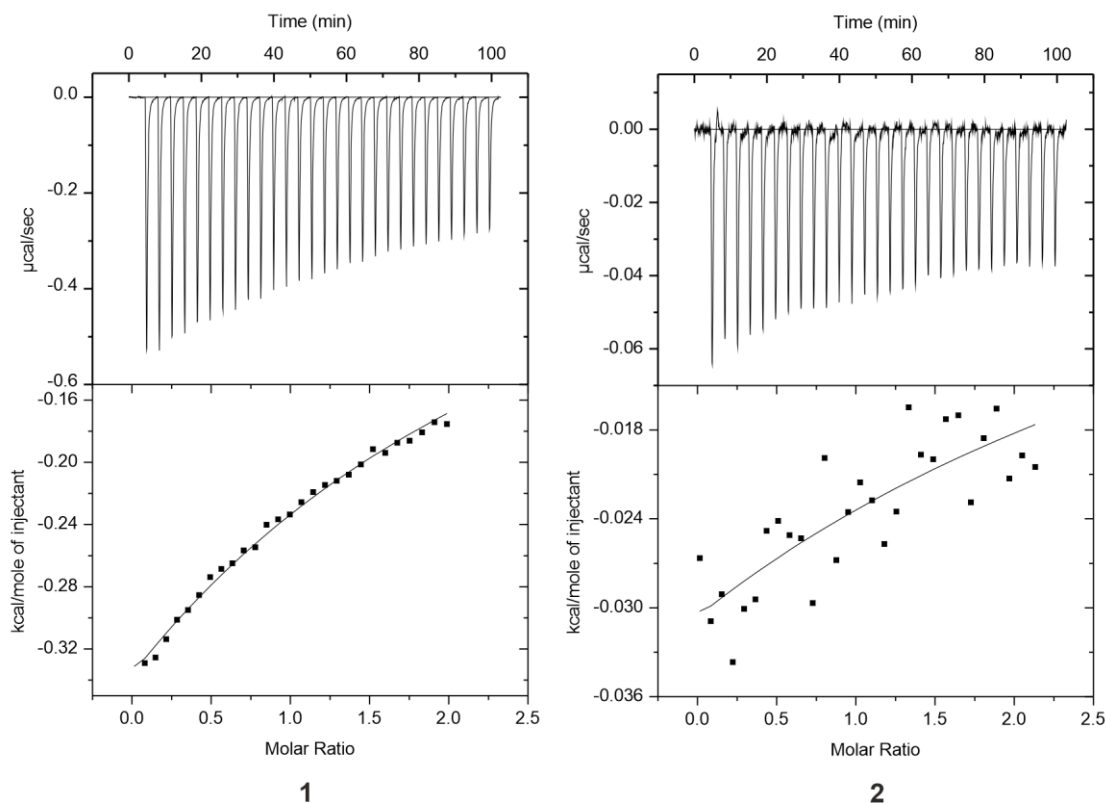


Obrázek 25 ITC záznamy  $\text{GA}_3$  titrované roztokem  $\beta$ -CD v  $\text{H}_2\text{O}$  (1) a v pufru (2)

Tabulka 11 Termodynamické parametry komplexace  $\text{GA}_3$  s  $\beta$ -CD v  $\text{H}_2\text{O}$  a v pufru

Prostředí	$n$	$K$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	$\Delta H$ [ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ]	$\Delta S$ [ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ]
$\text{H}_2\text{O}$	1	972	-2,8	0,05
Pufr o pH 8,16	1	197	-5,3	0,03

V poslední sadě experimentů byla zkoumaná kyselina titrována  $\gamma$ -CD, uvolněná tepla se v prostředí vody a pufru výrazně nelišila (Obrázek 26). Větší vazebná konstanta (Tabulka 12) byla zjištěna při měření v  $H_2O$ , a to přibližně o jeden řád oproti měření v pufru. Výrazně vyšší rozptyl experimentálních bodů kolem modelové funkce však poněkud snižuje důvěryhodnost výsledku v případě titrace v pufru.



Obrázek 26 ITC záznamy  $GA_3$  titrované roztokem  $\gamma$ -CD v  $H_2O$  (1) a v pufru (2)

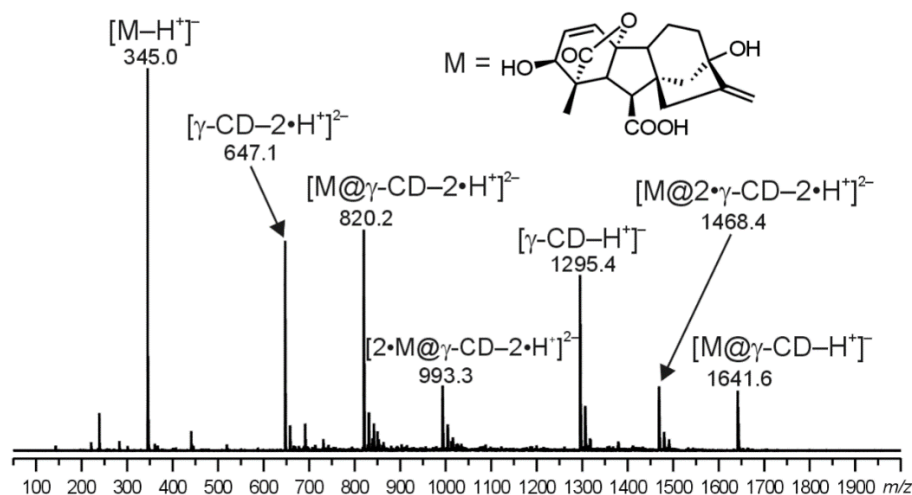
Tabulka 12 Termodynamické parametry komplexace  $GA_3$  s  $\gamma$ -CD v  $H_2O$  a v pufru

Prostředí	$n$	$K [M^{-1}]$	$\Delta H [kJ \cdot mol^{-1}]$	$\Delta S [kJ \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}]$
$H_2O$	1	245	-12,13	0,006
Pufr o pH 8,16	1	94,8	-2,75	-0,03

### 4.2.3 Elektrosprejová ionizace s hmotnostním detektorem

Vznik komplexů  $GA_3@β\text{-CD}$  a  $GA_3@γ\text{-CD}$  byly ověřeny pomocí třetí nezávislé metody ESI-MS, která je citlivější než NMR. Jelikož  $GA_3$  je karboxylová kyselina, tak měření bylo prováděno v záporném módu. Z experimentu byla zjištěna stabilita a stechiometrie daných komplexů, kdy stabilnější byl komplex  $GA_3@γ\text{-CD}$  (vyšší intenzita signálů komplexu), což může být odůvodněno větší hostitelskou molekulou, kterou  $γ\text{-CD}$  oproti  $β\text{-CD}$  disponuje. Měření probíhalo ve dvou směsích v molárních poměrech 1:1 a 1:3. Z tandemových spekter bylo zjištěno, že při fragmentaci komplexů se stechiometrií 1:1 vznikají vždy deprotonované molekuly hostitele a se stechiometrií 1:2 dochází ke vzniku deprotonované molekuly hosta s hostitelem.

V hmotnostním spektru (Obrázek 27) směsi  $GA_3$  a  $γ\text{-CD}$  v molárním poměru 1:3 je vyobrazeno celkem sedm iontů. Základní pík s hodnotou  $345\ m/z$  patří deprotonované  $GA_3$ . Dva molekulové klastry náleží hostitelské molekule  $γ\text{-CD}$ . Klastř s hodnotou  $820\ m/z$ , který je dvakrát nabitý a klastř s hodnotou  $1641$  náleží komplexu ve stechiometrií 1:1. Dále se ve spektru vyskytuje signál odpovídající dvakrát nabitému komplexu dvou  $GA_3$  s  $γ\text{-CD}$ , který je ve spektru označen  $[2\cdot M@γ\text{-CD}-2\cdot H^+]^{2-}$ . Poslední iont, který je dvakrát deprotonovaný má ve spektru hodnotu  $1468$  a patří komplexu  $GA_3$  s  $γ\text{-CD}$  v poměru 1:2.



**Obrázek 27** Hmotnostní spektrum směsi  $GA_3$  a  $γ\text{-CD}$  v molárním poměru 1:3



#### 4.2.4 Klíčení semen

V klíčícím experimentu jsme se snažili ověřit, jestli roztok GA<sub>3</sub> či roztok připravený rozpuštěním navážky β-CD v roztoku GA<sub>3</sub> ovlivní klíčení semen rostliny *Lunaria rediviva*. Jako slepý experiment byly použity roztok samotného β-CD a destilovaná voda. Rostlina *Lunaria rediviva* byla zvolena vzhledem k velikosti semen (cca 10 mm), což značně usnadňovalo provádění experimentu i jeho vyhodnocení. Kromě toho se jedná o rostlinu vedenou na červeném seznamu ohrožených druhů ČR a případné pozitivní výsledky by mohly napomoci pěstování této rostliny v kultuře a následné reintrodukcii. Semena byla sbírána v sezóně 2021 v populaci původem z Králického Sněžníku (5867a) reintrodukované ve Vizovických vrších (6873a). Semena byla uchovávána po dobu 36 dní v termostatu při teplotě 25 °C. Již po druhém dni po zahájení experimentu se na semenech objevila plíseň, která se během dalších dní rozrůstala. Vzhledem k tomu, že se plíseň šířila výhradně ze semen, je pravděpodobné, že semena byla kontaminovaná sporama plísni a opláchnutí 3 % roztokem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nebylo dostatečné pro sterilizaci povrchu semen. Použití alternativního dezinfekčního činidla, například roztoku KMnO<sub>4</sub> nebylo vhodné pro možnou interferenci zbytků sloučenin manganu s aplikovanou GA<sub>3</sub>. Experiment probíhal i po nalezení plísně nadále, s domněnkou, že by semena mohla být vůči plísni odolná, jelikož samotná rostlina roste v těžkých podmínkách. Ani po 36 dnech se neobjevily žádné známky klíčení a docházelo k stálému rozšiřování plísně (Obrázek 28), a tak byl pokus po 36. dni ukončen. Pro případné budoucí experimenty s klíčením semen bude nutné zvolit jiný rostlinný model nebo vyřešit problém se sterilizací semen.



**Obrázek 28** Ukázka provedení klíčiho experimentu se zřetelnou plísní na semenech

## ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo otestovat supramolekulární chování  $GA_3$  s  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD a  $\gamma$ -CD pomocí NMR, ITC a ESI-MS.

Titrační experimenty pomocí NMR byl provedeny ve dvou prostředích, v  $D_2O$  a v pufru o pH 8,16. Z měření  $^1H$  NMR spekter nebyl prokázán vznik komplexu  $GA_3@ \alpha$ -CD, ve spektrech nebyly zaznamenány žádné viditelné změny chemických posunů. V případě titrace s  $\beta$ -CD k malým změnám chemických posunů dochází, přičemž největší změna chemického posunu byla pozorována u signálu methylové skupiny ligandu  $GA_3$ , který je pravděpodobně nejvíce ovlivněn vznikem komplexu. Při titraci s  $\gamma$ -CD komplex pravděpodobně vzniká. Tomuto tvrzení nasvědčuje výrazná změna chemických posunů mezi  $^1H$  NMR spektrem samotné  $GA_3$  a spektrem po prvním přidavku hostitelské molekuly  $\gamma$ -CD. V měřeních v pufru byly změny chemických posunů ve všech případech menší. Další použitou NMR metodou byla konstrukce Jobova grafu, z kterého měla být určena stechiometrie vzniklých komplexů. Tato metoda ukazuje, stejně jako předchozí metoda, že komplex  $GA_3@ \alpha$ -CD pravděpodobně nevzniká. Výsledky měření pro komplexy  $GA_3@ \beta$ -CD a  $GA_3@ \gamma$ -CD vypadaly obdobně: z Jobova grafu nevyplývala jasná stechiometrie komplexů, jelikož maxima molárních zlomků se nacházela pro signál  $H_F$  v 0,20 a  $H_O$  v 0,85. Nejednoznačná interpretace výsledků může být způsobena malými chemickými posuny nebo zde může při nižších koncentracích probíhat disociace dimeru  $GA_3$ . Pro ověření komplexace mezi  $GA_3$  a hostitelskou molekulou  $\beta$ -CD či  $\gamma$ -CD byla změřena 2D ROESY spektra. V ROESY spektrech byly zaregistrovány silnější interakce mezi  $GA_3$  a  $\gamma$ -CD, než v případě měření s  $\beta$ -CD. Tento experiment podporuje tvrzení, že komplex  $GA_3@ \gamma$ -CD vzniká.

Druhou nezávislou metodou, z které lze určit stechiometrií, vazebnou konstantu, změnu enthalpie a změnu entropie je ITC. Experiment probíhal buď v čisté  $H_2O$  nebo v pufru o pH 8,16. Z důvodu rozptýlených experimentálních hodnot uvolněných tepel, bylo nutné hodnoty stechiometrie zafixovat dle předpokládané stechiometrie 1:1. Pro měření s odměrným roztokem  $\alpha$ -CD v pufru byla vazebná konstanta o jeden řád větší než v prostředí čisté  $H_2O$ . Při titraci s  $\beta$ -CD byly vazebné konstanty relativně stejné v obou prostředích. V případě měření s  $\gamma$ -CD v prostředí  $H_2O$  byla konstanta stability o jeden řád větší než v pufru.

Vznik komplexu byl ověřen třetí nezávislou metodou ESI-MS. Krom samotných hmotnostních spekter byla změřena i tandemová hmotnostní spektra. Byla ověřena stabilita a stechiometrie ve dvou molárních poměrech 1:1 a 1:3 supramolekulárních komponent ve studovaných roztocích. Větší stabilita byla zjištěna pro komplex  $GA_3@γ$ -CD. V roztoku obsahujícím  $GA_3$  a  $β$ -CD v poměru 1:1 by detekován komplex  $GA_3@β$ -CD. V obsahujícím obě složky v poměru 1:3 se vyskytuje kromě komplexu se stechiometrií 1:1 taky komplex  $GA_3@2·β$ -CD. V případě  $γ$ -CD se v obou roztocích s molárním zastoupením 1:1 i 1:3 vyskytovaly vždy stejné komplexy se stechiometrií 1:1, 2:1 a 1:2.

V neposlední řadě proběhlo ověření působení roztoku s  $GA_3$  a roztoku  $GA_3$  s  $β$ -CD na klíčení semen *Lunaria rediviva*. I když před započítím experimentu proběhla sterilizace všeho náčiní i semen ve 3 %  $H_2O_2$ , nedokázali jsme předejít vzniku plísně. Plíseň se na povrchu semen objevila již druhý den po aplikaci roztoků. Jelikož *Lunaria rediviva* v přírodě roste v těžkých podmínkách (stinná, vlhká a chladná místa), doufali jsme ve zvýšenou odolnost semen vůči plísni a v experimentu pokračovali. Po 36. dni byl experiment ukončen, bez známek klíčení. Pro případné opakování klíčícího experimentu bude nutné změnit modelovou rostlinu nebo způsob sterilizace semen.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- <sup>1</sup> R. Hooley: Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant. Mol. Biol.* **1994**, *26*, 1529–1555.
- <sup>2</sup> K. Graeber, K. Nakabayashi, E. Miatton, G. Leubner-Metzger, W. Soppe: Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant Cell Environ.* **2012**, *35*, 1769–1786.
- <sup>3</sup> K. Hermann, J. Meinhard, P. Dobrev, A. Linkies, B. Pesek, B. Hess, I. Macháčková, U. Fischer, G. L. Metzger: 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) - A comparative study of fruits and seeds. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 3047–3060.
- <sup>4</sup> B. A. Adie, J. P. Pérez, M. M. P. Pérez, M. Godoy, J. J. S. Serrano, E. A. Schmelz, R. Solano: ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **2007**, *19*, 1665–1681.
- <sup>5</sup> J. D. Jones, J. L. Dangl: The plant immune system. *Nature* **2006**, *444*, 323–329.
- <sup>6</sup> S. T Chisholm, G. Coaker, B. Day, B. J. Staskawicz: Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell.* **2006**, *124*, 803–814.
- <sup>7</sup> P. Sabol, J. Pilátová: Jak funguje imunita u rostlin? *Živa.* **2020**, *1*, 17–19.
- <sup>8</sup> V. G. Roldan, S. Fermas, P. B. Brewer, V. P. Pages, E. A. Dun, J.P. Pillot, F. Letisse, R. Matusova, S. Danoun, J. C. Portais, H. Bouwmeester, G. Becard, C. A. Beveridge, C. Rameau, S. F. Rochange: Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature.* **2008**, *455*, 189–194.
- <sup>9</sup> C. Darwin: The power of movement in plants. *Cambridge University Press.* **1880**, ISBN 9780511693670.
- <sup>10</sup> F. W. Went: Wuchsstoff und Wachstum. Extrait du Recueil des Travaux Botaniques Neerlandais. **1928**, *25*, 1–116.
- <sup>11</sup> K. Ljung, R. Bhalerao, G. Sandberg: Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* **2001**, *28*, 465–474.
- <sup>12</sup> F. Kögl, A. J. H. Smit, H. Erxleben: Über ein neues Auxin (Heteroauxin) aus Harn. XI. Mitteilung über pflanzliche Wachstumsstoffe. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie.* **1934**, *228*, 90–103.

- <sup>13</sup> Kögl F, D. G. F. R. Kostermans: Hetero-auxin als Stoffwechselprodukt niederer pflanzlicher Organismen. Isolierung aus Hefe. 13. Mitteilung über pflanzliche Wachstumsstoffe. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*. **1934**, 228, 113–121.
- <sup>14</sup> K. V. Thimann: On the plant growth hormone produced by *Rhizopus suinus*. *Int. J. Biol. Chem.* **1935**, 109, 279–291.
- <sup>15</sup> F. W. Went, K. V. Thimann: Phytohormones. *The Macmillan Company*. **1937**. [http://www.rooting-hormones.com/IBAarticles/Went\\_Phytohormones\\_with%20ocr.pdf](http://www.rooting-hormones.com/IBAarticles/Went_Phytohormones_with%20ocr.pdf)
- <sup>16</sup> T. A. Enders, L. C. Strader: Auxin Activity: Past, present, and Future. *Am. J. Bot.* **2016**, 102, 180–196.
- <sup>17</sup> N. D. Tivendale, J. J. Ross, J. D. Cohen: The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci.* **2014**, 19, 44–51.
- <sup>18</sup> D. A. Korasick, T. A. Enders, L. C. Strader: Auxin biosynthesis and storage forms. *J. Exp. Bot.* **2013**, 64, 2541–2555.
- <sup>19</sup> M. Yamamoto, K. T. Yamamoto: Differential effects of 1-naphthaleneacetic acid, indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, *aux1*. *Plant Cell Physiol.* **1998**, 39, 660–664.
- <sup>20</sup> E. Zazimalová, A. S. Murphy, H. Yang, K. Hoyerová, P. Hošek: Auxin transporters—Why so many? *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2010**, 2.
- <sup>21</sup> J. Friml, J. Wiśniewska, E. Benková, K. Mendgen, K. Palme: Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*. **2002**, 415, 806–809.
- <sup>22</sup> J. Friml, E. Benková, I. Blilou, J. Wisniewska, T. Hamann, K. Ljung, S. Woody, G. Sandberg, B. Scheres, G. Jürgens, K. Palme: AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*. **2002**, 108, 661–673.
- <sup>23</sup> M. G. Sawchuk, A. Edgar, E. Scarpella: Patterning of leaf vein networks by convergent auxin transport pathways. *PLoS Genet.* **2013**, 9.
- <sup>24</sup> E. Remy, P. Duque: Beyond cellular detoxification: A plethora of physiological roles for MDR transporter homologs in plants. *Front Physiol.* **2014**, 5, 201.
- <sup>25</sup> W. A. Peer, J. J. Blakeslee, H. Yang, A. S. Murphy: Seven things we think we know about auxin transport. *Mol. Plant.* **2011**, 4, 487–504.

- <sup>26</sup> P. Hedden, V. Sponsel: A century of gibberellin research. *J. Plant Growth Regul.* **2015**, *34*, 740–760.
- <sup>27</sup> P. Achard, P. Genschik: Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 1085–1092.
- <sup>28</sup> S. Yamaguchi: Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 225–251.
- <sup>29</sup> P. Hedden, V. Sponsel: A Century of Gibberellin Research. *J. Plant Growth Regul.* **2015**, *34*, 740–760.
- <sup>30</sup> D. Tarkowská, O. Novák, K. Floková, P. Tarkowski, V. Turečková, J. Grúz, J. Rolčík, M. Strnad: Quo vadis plant hormone analysis? *Planta.* **2014**, *240*, 55–76.
- <sup>31</sup> J. Binenbaum, R. Weinstain, E. Shani: Gibberellin Localization and Transport in Plants. *Trends Plant Sci.* **2018**, *23*, 410–421.
- <sup>32</sup> P. Hedden, A. L. Phillips: Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* **2000**, *5*, 523–530.
- <sup>33</sup> B. Bruckner, D. Blechschmidt: The gibberellin fermentation. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1991**, *192*, 163–192.
- <sup>34</sup> C. Rodrigues, L. P. D. S. Vandenberghe, J. de Oliveira, C. R. Soccol: New perspectives of gibberellic acid production: a review. *Crit Rev Biotechnol* **2012**, *32*, 263–273.
- <sup>35</sup> A. Pandey, C. R. Soccol, D. Mitchell: New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* **2000**, *35*, 1153–1169.
- <sup>36</sup> S. Selvaraj, V. R. Murty: Semi-solid state fermentation: a promising method for production and optimization of tannase from *Bacillus gottheilii* M2S2. *Res. J. Biotechnol.* **2017**, *12*, 39–48.
- <sup>37</sup> E. M. Escamilla, L. Dendooven, I. P. Magaña, R. Parra, M. De la Torre: Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *J. Biotechnol.* **2000**, *76*, 147–155.
- <sup>38</sup> P. K. R. Kumar, B. K. Lonsane: Solid state fermentation: physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1990**, *34*, 145–148.
- <sup>39</sup> Z. Tang, R. Zhou, Z. Duan: Separation of gibberellic acid (GA3) by macroporous adsorption resins. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2000**, *75*, 695–700.

- <sup>40</sup> J. Berrios, D. L. Pyle, G. Aroca: Gibberellic acid extraction from aqueous solutions and fermentation broths by using emulsion liquid membranes. *J. Memb. Sci.* **2010**, *348*, 91–98.
- <sup>41</sup> D. W. Mok, M. C. Mok: Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2001**, *891*, 89–118.
- <sup>42</sup> T. ASAMI, Y. NAKAGAWA: Preface to the Special Issue: Brief review of plant hormones and their utilization in agriculture. *J. Pestic. Sci.* **2018**, *43*, 154–158.
- <sup>43</sup> R. C. Martin, M. C. Mok, J. E. Habben, D. W. S. Mok: A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2001**, *981*, 5922–5926.
- <sup>44</sup> B. Gillissen, L. Burkle, B. Andre, C. Kuhn, D. Rentsch, B. Brandl, W. B. Frommer: A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in Arabidopsis. *Plant Cell.* **2000**, *1*, 291–300.
- <sup>45</sup> A. Wasilewska, F. Vlad, C. Sirichandra, Y. Redko, F. Jammes, C. Valon, N. F. D. Frey, J. Leung: An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular. Plant.* **2008**, *1*, 198–217.
- <sup>46</sup> S. R. Cutler, P. L. Rodriguez, R. R. Finkelstein, S. R. Abrams: Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Ann. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 651–679.
- <sup>47</sup> K. Nakabayashi, M. Okamoto, T. Koshiba, Y. Kamiya, E. Nambara: Genome-wide profiling of stored mRNA in Arabidopsis thaliana seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J.* **2005**, *41*, 697–709.
- <sup>48</sup> J. Kang, J. U. Hwang, M. Lee, Y. Y. Kim, S. M. Assmann, E. Martinoia, Y. Lee: PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2010**, *107*, 2355–2360.
- <sup>49</sup> W. T. Sedgwick, F. Schneider: The relation of illuminating gas to public health. *J Am Pub Health Assoc.* **1911**, *1*, 385–390.
- <sup>50</sup> D. Neljubow: Uber die horizontale nutation der stengel von Pisum sativum und einiger anderen. *Pflanzen Beih. Bot. Zentralb.* **1901**, *10*, 128–139.
- <sup>51</sup> R. Gane: Production of ethylene by some fruits. *Nature.* **1934**, *134*, 1008.
- <sup>52</sup> B. Van de Poel, D. Van der Straeten: 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*.



- <sup>53</sup> C. Chang: Q&A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biol.* **2016**, *14*.
- <sup>54</sup> G. J. Bishop, T. Yokota: Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant Cell Physiol.* **2001**, *42*, 114–120.
- <sup>55</sup> J. W. Mitchell, N. Mandava, J. F. Worley, J. R. Plimmer, M. V. Smith: Brassins—a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature.* **1970**, *225*, 1065–1066.
- <sup>56</sup> S. D. Clouse, M. Langford, T. C. McMorris: A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol.* **1996**, *111*, 671–678.
- <sup>57</sup> A. Sakurai: Brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* **1999**, *37*, 351–361.
- <sup>58</sup> A. Planas-Riverola, A. Gupta, I. Betegón-Putze, N. Bosch, M. Ibañes, A. I. Caño-Delgado: Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development.* **2019**, *146*.
- <sup>59</sup> V. Balbi, A. Devoto: Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol.* **2008**, *177*, 301–318.
- <sup>60</sup> A. Conconi, M. J. Smerdon, G. A. Howe, C. A. Ryan: The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature.* **1996**, *383*, 826–829.
- <sup>61</sup> O. Herde, R. Atzorn, J. Fisahn, C. Wasternack, L. Willmitzer, H. P. Cortes: Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* **1996**, *112*, 853–860.
- <sup>62</sup> H. Gundlach, M. Müller, T. M. Kutchan, M. H. Zenk: Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1992**, *89*, 2389–2393.
- <sup>63</sup> T. A. Dar, M. Uddin, M. M. A. Khan, K. R. Hakeem, H. Jaleel: Jasmonates counter plant stress: a review. *Environ. Exp. Bot.* **2015**, *115*, 49–57.
- <sup>64</sup> E. E. Farmer, C. A. Ryan: Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **1990**, *87*, 7713–7716.

- <sup>65</sup> B. O. R. Bargmann, A. M. Laxalt, B. Ter Riet, C. Testerink, E. Merquiol, A. Mosblech, A. Leon-Reyes, C. M. J. Pieterse, M. A. Haring, I. Heilmann, D. Bartels, T. Munnik: Reassessing the role of phospholipase D in the Arabidopsis wounding response. *Plant Cell Environ.* **2009**, *32*, 837–850.
- <sup>66</sup> I. Raskin: Role of salicylic acid in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **1992**, *43*, 439–463.
- <sup>67</sup> J. Y. Wick: Aspirin: A history, a love story. *Consult. Pharm.* **2012**, *27*, 322–329.
- <sup>68</sup> G. Weissmann: Aspirin. *Sci. Am.* **1991**, *264*, 84–91.
- <sup>69</sup> H. I. Lee, J. León, I. Raskin: Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1995**, *92*, 4076–4079.
- <sup>70</sup> K. Akiyama, H. Hayashi: Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann. Bot.* **2006**, *97*, 925–931.
- <sup>71</sup> K. Sorefan, J. Booker, K. Haurogne, M. Goussot, K. Bainbridge, E. Foo, S. Chatfield, S. Ward, C. Beveridge, C. Rameau, O. Leyser: MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in Arabidopsis and pea. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 1469–1474.
- <sup>72</sup> C. E. Cook, L. P. Whichard, B. Turner, M. E. Wall, G. H. Egley: Germination of Witchweed (*Striga lutea* Lour.): Isolation and Properties of a Potent Stimulant. *Science.* **1966**, *154*, 1189–1190.
- <sup>73</sup> C. Parker: Observations on the current status of Orobanche and Striga problems worldwide. *Pest. Manag. Sci.* **2009**, *65*, 453–459.
- <sup>74</sup> V. G. Roldan, S. Fermas, P. B. Brewer, V. P. Pagès, E. A. Dun, J. P. Pillot, F. Letisse, R. Matusová, S. Danoun, J. Ch. Portais, H. Bouwmeester, G. Bécard, Ch. A. Beveridge, C. Rameau, S. F. Rochange: Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature.* **2008**, *455*, 189–194.
- <sup>75</sup> S. M. Smith: Q&A: What are strigolactones and why are they important to plants and soil microbes? *BMC Biol.* **2014**, *12*.
- <sup>76</sup> A. Ider, M. Jamil, M. Marzorati, M. Bruno, M. Vermathen, P. Bigler, S. Ghisla, H. Bouwmeester, P. Beyer, S. Al-Babili: The path from  $\beta$ -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science.* **2012**, *335*, 1348–1351.

- <sup>77</sup> J. Mithila, J. CH. Hall, W. G. Johnson, K. B. Kelley, D. E. Riechers: Evolution of resistance to auxinic herbicides: historical perspectives, mechanisms of resistance, and implications for broadleaf weed management in agronomic crops. *Weed Sci.* **2011**, *59*, 445–457.
- <sup>78</sup> K. Grossmann: Auxin herbicides, current status of mechanism and mode of action. *Pest Manag. Sci.* **2010**, *66*, 113–120.
- <sup>79</sup> S. Horvitz, C. Godoy, A. F. L. Camelo, A. Yommi, C. Godoy: Application of gibberellic acid to 'Sweetheart' sweet cherries: effects on fruit quality at harvest and during cold storage. *Acta Hortic.* **2003**, *628*, 31–316.
- <sup>80</sup> L. Casanova, R. Casanova, A. Moret, M. Agustí: The application of gibberellic acid increases berry size of 'Emperatriz' seedless grape. *Span. J. Agric. Res.* **2009**, *7*, 919–927.
- <sup>81</sup> A. M. MacLeod, A. S. Millar: Effects of gibberellic acid on barley endosperm. *J. Inst. Brew.* **1962**, *68*, 322–332.
- <sup>82</sup> P. O. Baes, M. R. Aréchiga: Seed germination of *Trichocereus terscheckii* (Cactaceae): light, temperature and gibberellic acid effects. *J. Arid. Environ.* **2007**, *69*, 169–176.
- <sup>83</sup> M. Hamayun, S. A. Khan, A. L. Khan, J. H. Shin, B. Ahmad, D. H. Shin, I. J. Lee: Exogenous gibberellic acid reprograms soybean to higher growth and salt stress tolerance. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 7226–7230.
- <sup>84</sup> N. Akter, M. R. Islam, M. A. Karim, T. Hossain: Alleviation of drought stress in maize by exogenous application of gibberellic acid and cytokinin. *J. Crop. Sci. Biotechnol.* **2014**, *17*, 41–48.
- <sup>85</sup> R. Ivarenga, J. C. Moraes, A. M. Auad, M. Coelho, A. M. Nascimento: Induction of resistance of corn plants to *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) by application of silicon and gibberellic acid. *Bull Entomol. Res.* **2017**, *107*, 527–533.
- <sup>86</sup> W. Rademacher: Plant Growth Regulators: Backgrounds and Uses in Plant Production. *J Plant Growth Regul.* **2015**, *34*, 845–872.
- <sup>87</sup> M. Ashikari, H. Sakakibara, S. Lin, T. Yamamoto, T. Takashi, A. Nishimura, E. R. Angeles, Q. Qian, H. Kitano, M. Matsuoka: Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science.* **2005**, *309*, 741–745

- <sup>88</sup> W. Healy: Piles of money. *GrowerTalks*. **2009**, 72, 42–46.
- <sup>89</sup> P. Bhadoria, M. Nagar, V. Bharihoke, A. S. Bhadoria: Ethephon, an organophosphorous, a Fruit and Vegetable Ripener: Has potential hepatotoxic effects? *J. Family Med. Prim. Care*. **2018**, 7, 179–183.
- <sup>90</sup> *Chem. Rev.* **1998**, 98 (5), 7–2076. Celé číslo je věnováno cyklodextrinům.
- <sup>91</sup> J. L. Atwood, J. M. Lehn, J. Szejtli: *Comprehensive supramolecular Chemistry, volume 3 cyclodextrins*. Pergamon, Oxford, U. K., **1996**.
- <sup>92</sup> A. Villiers: Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique. *Chimie Organique—Compte Rendus des Séances de l'Académie des Sciences Février*. **1891**, 112, 435–437.
- <sup>93</sup> A. Villiers: Sur la transformation de la fécule en dextrine par le ferment butyrique. *Bulletin de la Société Chimique de Paris*. **1891**, 45, 468–470.
- <sup>94</sup> F. Schardinger: Über thermophile bakterien aus verschiedenen speisen und milch, sowie über einige umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen nährlösungen, darunter krystallisierte polysaccharide (dextrine) aus stärke. *Zeitschrift für Unter- suchung von Nahrungs- und Genussmittel*. **1903**, 6, 865–880.
- <sup>95</sup> F. Schardinger: Bacillus macerans, ein aceton bildender rotteba- cillus. *Centralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde und Infek- tionskrankheiten*. **1905**, 14, 772–781.
- <sup>96</sup> D. French, M. L. Levine, J. H. Pazur, E. Norberg: Studies on the Schardinger dextrans. The preparation and solubility character- istics of alpha-dextrans, beta-dextrans, and gamma-dextrans. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 353–356.
- <sup>97</sup> K. Freudenberg, H. Boppel, M. Meyer-Delius: Observations on starch. *Naturwissenschaften*. **1938**, 26, 123–124.
- <sup>98</sup> F. Cramer: Die cyclodextrine aus Stärke. *Dissertation Heidelberg*. **1949**.
- <sup>99</sup> S. M. Han, Y. I. Han, D. W. Armstrong: Structural factors affecting chiral recognition and separation on beta-cyclodextrin bonded phases. *J. Chromatogr.* **1988**, 441, 376–381.
- <sup>100</sup> R. A. Menges, D. W. Armstrong: Chiral separations using native and functionalized cyclodextrin-bonded stationary phases in highpressure liquid-chromatography. *ACS Symp. Ser.* **1991**, 471, 67–100.

- <sup>101</sup> Počet publikací o cyklodextrinech vydaných od roku 1998 do roku 2020. *Chemical abstract, SciFinder Scholar* <sup>TM</sup>. **2022**.
- <sup>102</sup> G. Crini, S. Fourmentin, É. Fenyvesi, G. Torri, M. Fourmentin, N. M. Crini: Cyclodextrins, from molecules to applications. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, *16*, 1361–1375.
- <sup>103</sup> N. M. Crini, S. Fourmentin, É. Fenyvesi, E. Lichtfouse, G. Torri, M. Fourmentin, G. Crini: 130 years of cyclodextrin discovery for health, food, agriculture, and the industry: a review. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19*, 2581–2617.
- <sup>104</sup> A. Villiers: *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1891**, *112*, 536.
- <sup>105</sup> S. M. Botella, B. del Castillo, M.A. Martýn: Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *Ars. Pharm.* **1995**, *36*, 187–198.
- <sup>106</sup> O. Calliess, A. H. Daranas: Application of isothermal titration calorimetry as a tool to study natural product interactions. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 881–904.
- <sup>107</sup> J. S. Renny, L. L. Tomasechiv, E. H. Tallmadge, D. B. Collum: Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 11998–12013.
- <sup>108</sup> C. S. Mallis, M. L. Saha, P. J. Stang, D. H. Russell: Topological Characterization of Coordination-Driven Self-Assembly Complexes: Applications of Ion Mobility-Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *30*, 1654–1662.
- <sup>109</sup> F. Ulatowski, K. Dabrova, T. Balakier, J. Jurczak: Recognizing the Limited Applicability of Job Plots in Studying Host–Guest Interactions in Supramolecular Chemistry. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 1746–1756.
- <sup>110</sup> G. Crini: Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940–10975.
- <sup>111</sup> T. Loftsson, M. E. Brewster: Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins 1. Drug Solubilization and Stabilization. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1017–1025.
- <sup>112</sup> A. Nowicki, V. Le Boulaire, A. Roucoux: Nanoheterogeneous Catalytic Hydrogenation of Arenes: Evaluation of the Surfactant-Stabilized Aqueous Ruthenium(0) Colloidal Suspension. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 2326–2330.
- <sup>113</sup> G. Gübitz, M. G. Schmid: Chiral separation principles in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* **1997**, *792*, 179–225.

- <sup>114</sup> J. Szejtli: Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 575–587.
- <sup>115</sup> H. Hashimoto, K. Hara, N. Kuwahara, K. Mikuni, K. Kainuma, S. Kobayashi. *Jpn. Kokai.* **1985**. JP85 234 564.
- <sup>116</sup> K. Lindner, L. Szente, J. Szejtli. *Acta Alimentaria.* **1981**, *10*, 175.
- <sup>117</sup> A. Tamagawa. *Jpn. Kokai.* **1985**. JP85 204 739.
- <sup>118</sup> Y. Akiyama. *Jpn. Kokai.* **1979**. JP7980463.
- <sup>119</sup> J. Agric: Antioxidant Vitamin E/Cyclodextrin Inclusion Complex Electrospun Nanofibers: Enhanced Water Solubility, Prolonged Shelf Life, and Photostability of Vitamin E. *Food Chem.* **2017**, *65*, 5404–5412
- <sup>120</sup> J. Szejtli: Cyclodextrins in pesticides. *Starch/stärke.* **1985**, *11*, 382–386.
- <sup>121</sup> S. Gao, Y. Liu, J. Jiang, Q. Ji, Y. Fu, L. Zhao, C. Li, F. Ye: Physicochemical properties and fungicidal activity of inclusion complexes of fungicide chlorothalonil with  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *J. Mol. Liq.* **2019**, *293*, 111–513.
- <sup>122</sup> M. Chen, J. Wang, W. Zhang, G. Diao: Preparation and characterization water-soluble inclusion complexes of imidacloprid- $\beta$ -cyclodextrin polymer and their electrochemical behavior. *J. Electroanal. Chem.* **2013**, *696*, 1–8.
- <sup>123</sup> A. C. Turan, İ. Özen, H. K. Gürakın, E. Fatarella: Controlled release profile of imidacloprid- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex embedded polypropylene filament yarns. *J. Eng. Fibers. Fabr.* **2017**, *12*, 75–83.
- <sup>124</sup> J. J. Villaverde, P. S. España, J. L. A. Prados, A. M. Lamsabhi, M. Alcamí: Computational Study of the Structure and degradation products of alloxym herbicide. *J. Phys. Chem. A.* **2018**, *122*, 3909–3918.
- <sup>125</sup> M. E. Báez, J. Espinoza, R. Silva, E. Fuentes: Influence of selected cyclodextrins in sorption-desorption of chlorpyrifos, chlorothalonil, diazinon, and their main degradation products on different soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**, *24*, 20908–20921.
- <sup>126</sup> Gibberellic acid (77-06-5) <sup>1</sup>H NMR. [https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN\\_77-06-5\\_1HNMR.htm](https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_77-06-5_1HNMR.htm)

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

PAMP	pathogen-associated molecular patterns
IAA	kyselina indol-3-yloctová
GA	gibberelliny
GA <sub>3</sub>	kyselina gibberellová
CK	cytokininy
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
ABA	kyselina abscisová
BR	brassinosteroidy
JA	kyselina jasmonová
SA	kyselina salicylová
SL	strigolaktony
CD	cyklodextriny
NMR	nukleární magnetická resonance
ITC	isotermální titrační mikrokalorimetrie
ESI-MS	elektrosprejová ionizace s hmotnostním detektorem
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	deuterovaný dimethylsulfoxid
D <sub>2</sub> O	deuterovaná voda
MeOH	methanol
ROESY	rotating-frame nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy
<i>n</i>	parametr stechiometrie
<i>K</i>	vazebná konstanta
$\Delta H$	enthalpie
$\Delta S$	entropie

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b> „Cik–cak“ model rostlinné imunity .....	12
<b>Obrázek 2</b> Test auxinové odezvy <i>Avena</i> .....	13
<b>Obrázek 3</b> Chemická struktura některých auxinů: indol-3-yloctová kyselina (1), 4-chlorindol-3-yloctová kyselina (2), fenyloctová kyselina (3) a 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (4) .....	14
<b>Obrázek 4</b> Chemická struktura gibberellinu 12 (5), kyseliny gibberellové (6), gibberellinu 4 (7) a gibberellinu 7 (8) .....	15
<b>Obrázek 5</b> Chemická struktura <i>trans</i> -zeatinu (9), 6-benzylaminopurininu (10), kinetinu (11) a thidiazuronu (12) .....	17
<b>Obrázek 6</b> Chemická struktura kyseliny abscisové (13) .....	17
<b>Obrázek 7</b> Chemický vzorec ethenu (14) .....	18
<b>Obrázek 8</b> Chemická struktura brassinolidu (15) a castasteronu (16) .....	19
<b>Obrázek 9</b> Chemická struktura kyseliny jasmonové (17) a methyl-jasmonátu (18) .....	19
<b>Obrázek 10</b> Chemická struktura kyseliny salicylové (19), salicinu (20), methyl-salicylátu (21) a kyseliny acetylsalicylové (22) .....	20
<b>Obrázek 11</b> Chemická struktura strigolu (23), orbancholu (24) a GR24 (25) .....	21
<b>Obrázek 12</b> Příprava CD enzymatickou degradací škrobu .....	23
<b>Obrázek 13</b> Počet publikací o CD vydaných v letech 1998 až 2020 dle Chemical Abstracts, SciFinder Scholar <sup>TM</sup> .....	24
<b>Obrázek 14</b> Chemické struktury a rozměry pro $\alpha$ -, $\beta$ - a $\gamma$ -CD .....	25
<b>Obrázek 15</b> Možné stechiometrie CD komplexů .....	27
<b>Obrázek 16</b> Procentuální zastoupení CD v jednotlivých odvětvích průmyslu .....	28
<b>Obrázek 17</b> <sup>1</sup> H NMR spektra GA <sub>3</sub> titrované roztokem $\beta$ -CD v D <sub>2</sub> O při 30 °C .....	39
<b>Obrázek 18</b> Změna chemických posunů methylové skupiny GA <sub>3</sub> v závislosti na molárním zlomku $\beta$ -CD v D <sub>2</sub> O a pufru .....	39
<b>Obrázek 19</b> <sup>1</sup> H NMR spektra GA <sub>3</sub> titrované roztokem $\gamma$ -CD v D <sub>2</sub> O při 30 °C .....	40
<b>Obrázek 20</b> Změna chemických posunů methylové skupiny GA <sub>3</sub> v závislosti na molárním zlomku $\gamma$ -CD v D <sub>2</sub> O a pufru .....	40
<b>Obrázek 21</b> <sup>1</sup> H NMR spektra GA <sub>3</sub> a $\beta$ -CD měřena Jobovou metodou .....	42
<b>Obrázek 22</b> Graf obsahující chemické posuny v součinu s molárním zlomkem signálů H <sub>f</sub> a H <sub>o</sub> v závislosti na molárním zlomku GA <sub>3</sub> .....	42
<b>Obrázek 23</b> 2D ROESY spektrum komplexu GA <sub>3</sub> s $\gamma$ -CD .....	43
<b>Obrázek 24</b> ITC záznamy GA <sub>3</sub> titrované roztokem $\alpha$ -CD v H <sub>2</sub> O (1) a v pufru (2) .....	45
<b>Obrázek 25</b> ITC záznamy GA <sub>3</sub> titrované roztokem $\beta$ -CD v H <sub>2</sub> O (1) a v pufru (2) .....	46
<b>Obrázek 26</b> ITC záznamy GA <sub>3</sub> titrované roztokem $\gamma$ -CD v H <sub>2</sub> O (1) a v pufru (2) .....	47
<b>Obrázek 27</b> Hmotnostní spektrum směsi GA <sub>3</sub> a $\gamma$ -CD v molárním poměru 1:3 .....	48



**Obrázek 28** Ukázka provedení klíčícího experimentu se zřetelnou plísní na semenech....50

**SEZNAM TABULEK**

<b>Tabulka 1</b> Vybrané vlastnosti jednotlivých CD .....	26
<b>Tabulka 2</b> Navážky GA <sub>3</sub> a CD rozpuštěných v D <sub>2</sub> O .....	34
<b>Tabulka 3</b> Navážky GA <sub>3</sub> a CD rozpuštěných v pufru .....	34
<b>Tabulka 4</b> Navážky GA <sub>3</sub> a CD pro Jobův graf .....	35
<b>Tabulka 5</b> Pipetované objemy roztoků do jednotlivých NMR kyvet .....	35
<b>Tabulka 6</b> Navážky GA <sub>3</sub> a CD pro měření ROESY .....	35
<b>Tabulka 7</b> Navážky GA <sub>3</sub> a CD rozpuštěných v H <sub>2</sub> O pro měření na ITC.....	35
<b>Tabulka 8</b> Navážky GA <sub>3</sub> a CD rozpuštěných v pufru pro měření na ITC .....	36
<b>Tabulka 9</b> Počet misek s jednotlivými roztoky použitých na klíčící experiment.....	36
<b>Tabulka 10</b> Termodynamické parametry komplexace GA <sub>3</sub> s α-CD v H <sub>2</sub> O a v pufru .....	45
<b>Tabulka 11</b> Termodynamické parametry komplexace GA <sub>3</sub> s β-CD v H <sub>2</sub> O a v pufru .....	46
<b>Tabulka 12</b> Termodynamické parametry komplexace GA <sub>3</sub> s γ-CD v H <sub>2</sub> O a v pufru .....	47

## SEZNAM PŘÍLOH

**Příloha 1**  $^1\text{H}$  NMR spektrum  $\text{GA}_3$

**Příloha 2**  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum  $\text{GA}_3$

**Příloha 3**  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  titrované roztokem  $\alpha$ -CD v  $\text{D}_2\text{O}$  při 30 °C

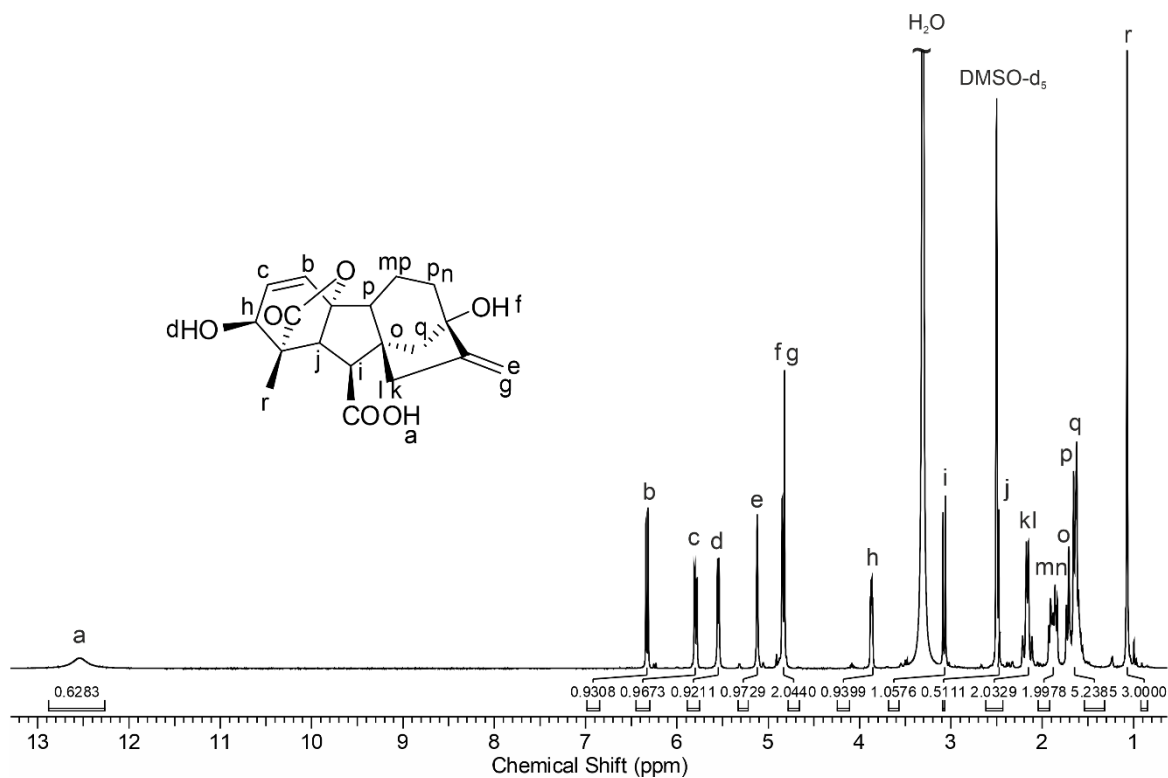
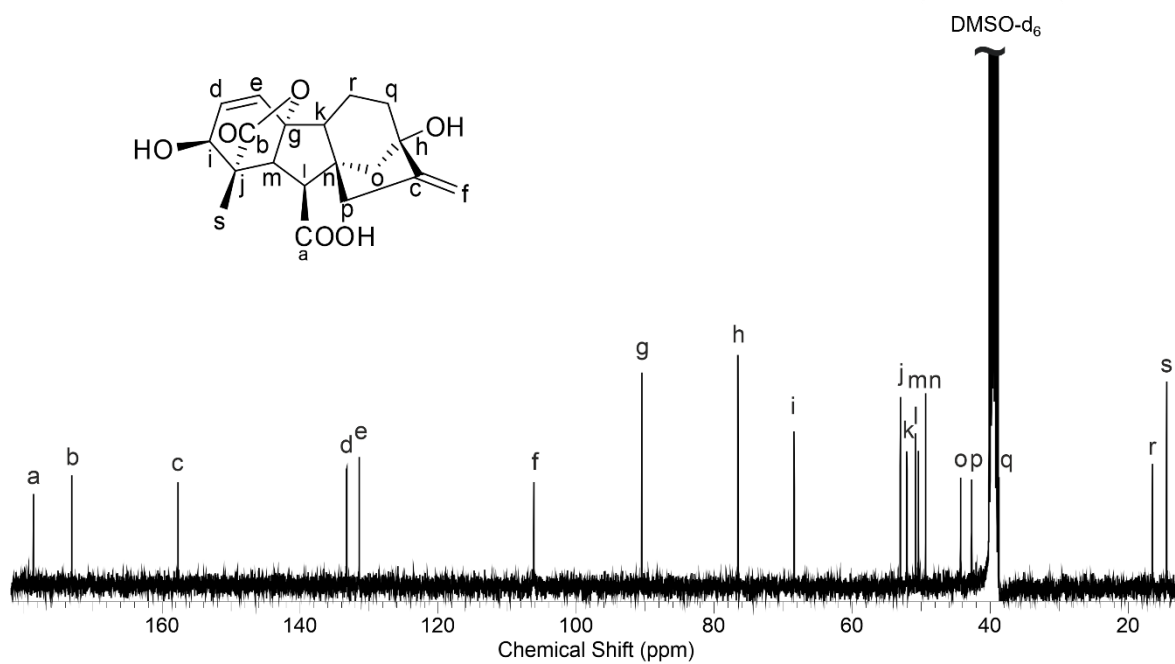
**Příloha 4**  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  titrované roztokem  $\alpha$ -CD v pufru při 30 °C

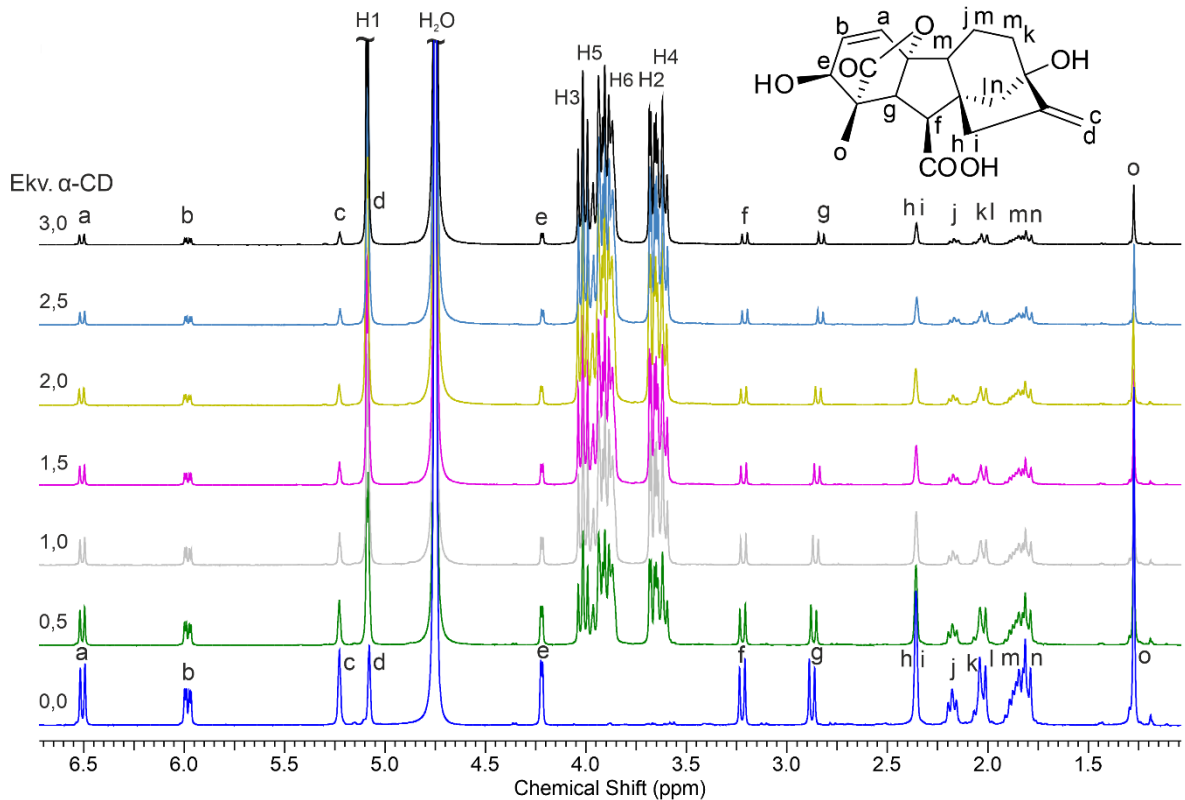
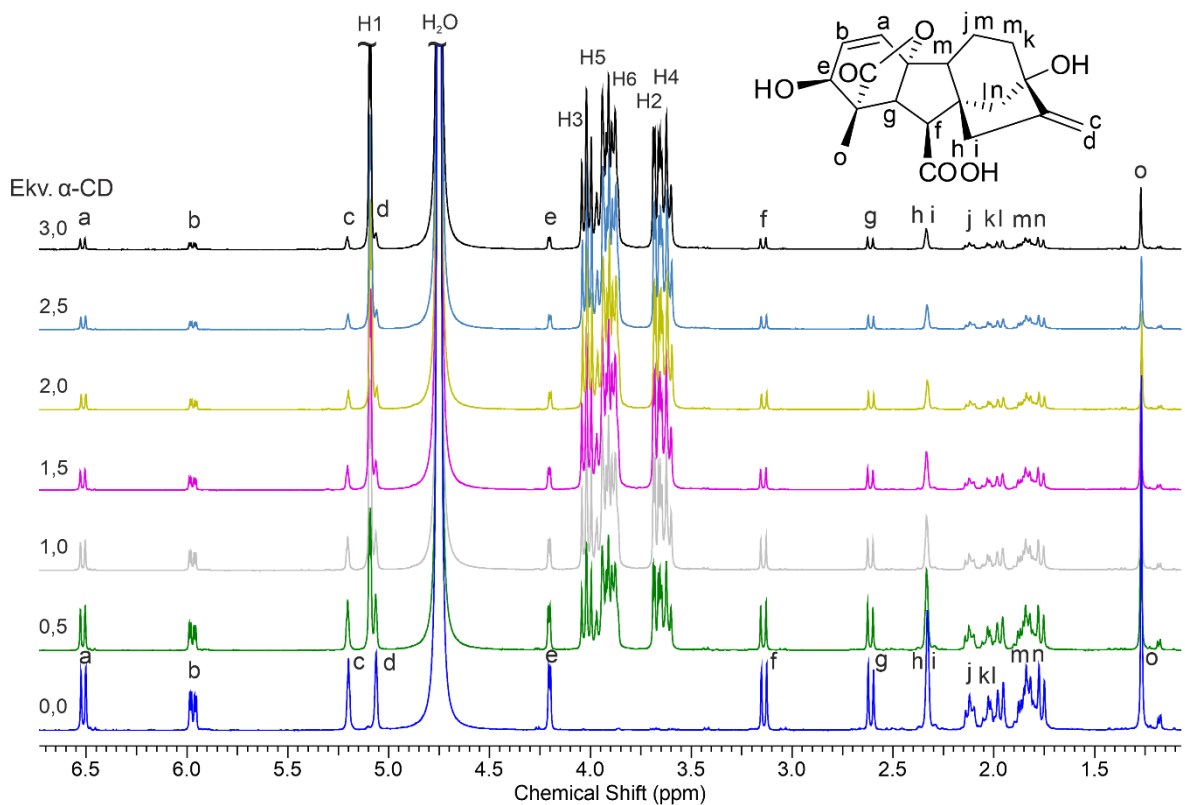
**Příloha 5**  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  titrované roztokem  $\beta$ -CD v pufru při 30 °C

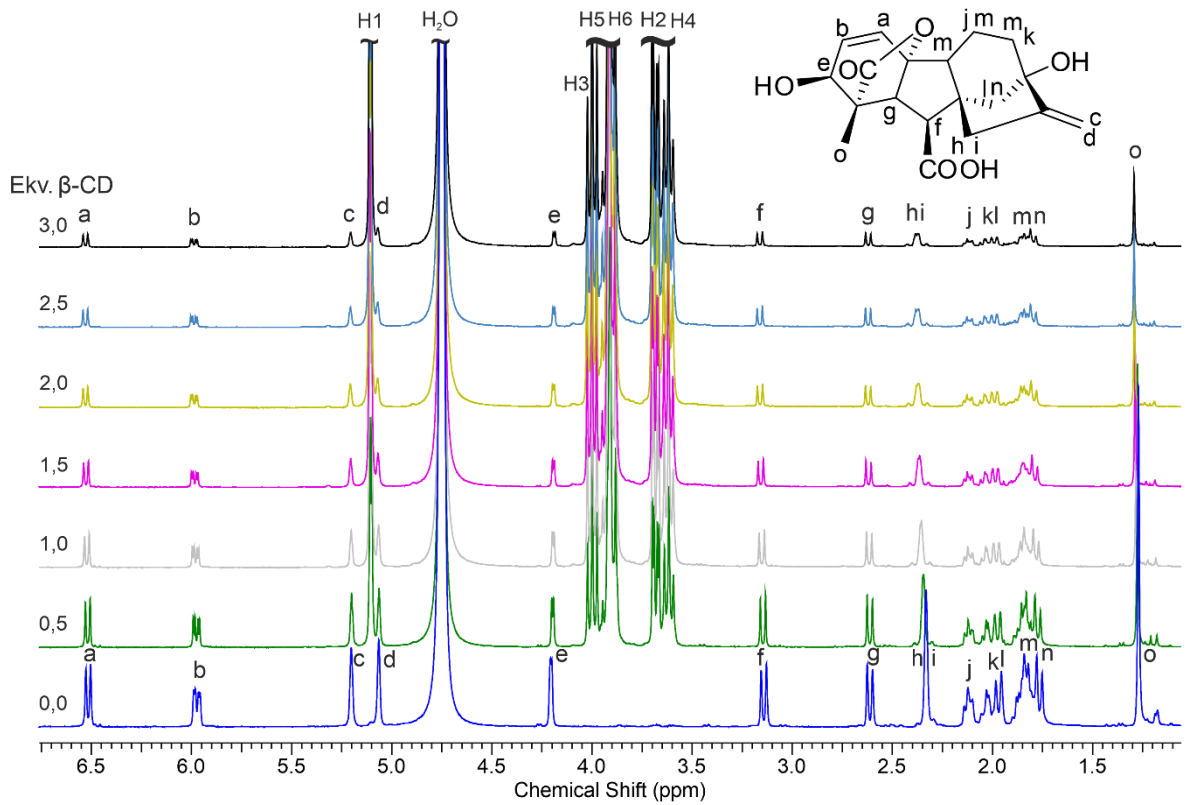
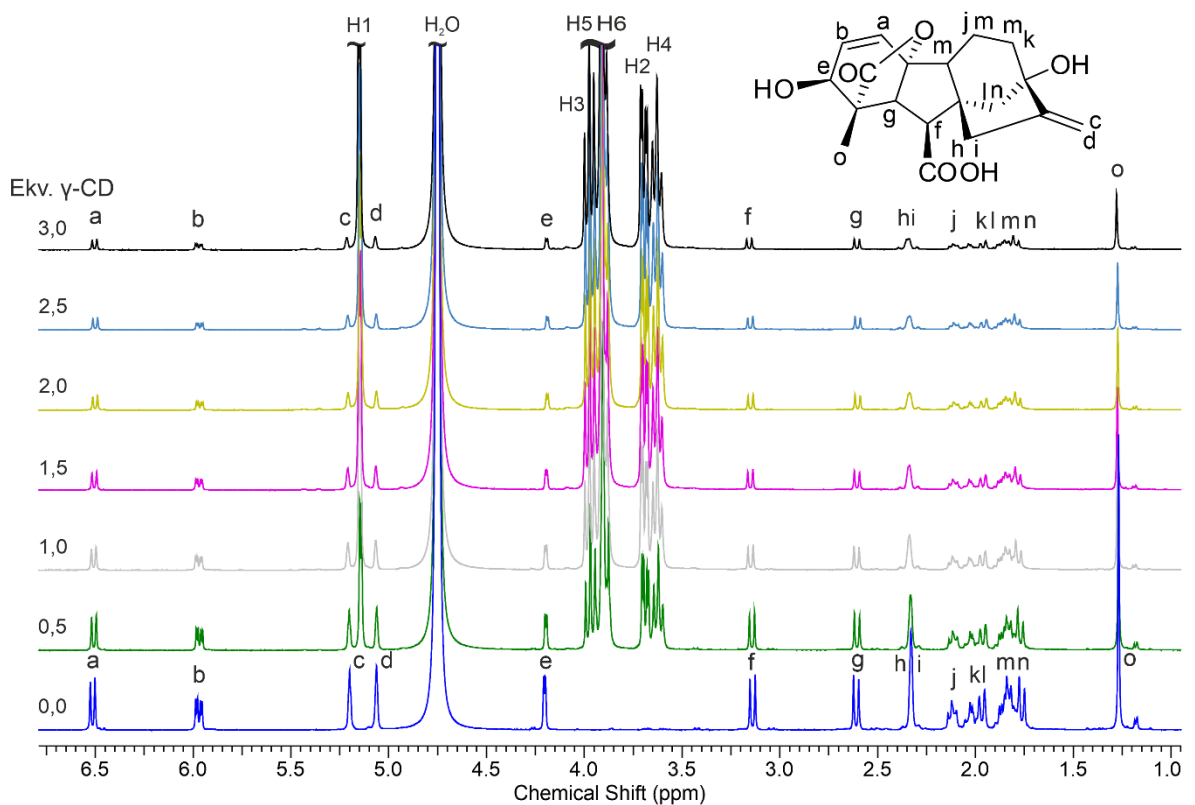
**Příloha 6**  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  titrované roztokem  $\gamma$ -CD v pufru při 30 °C

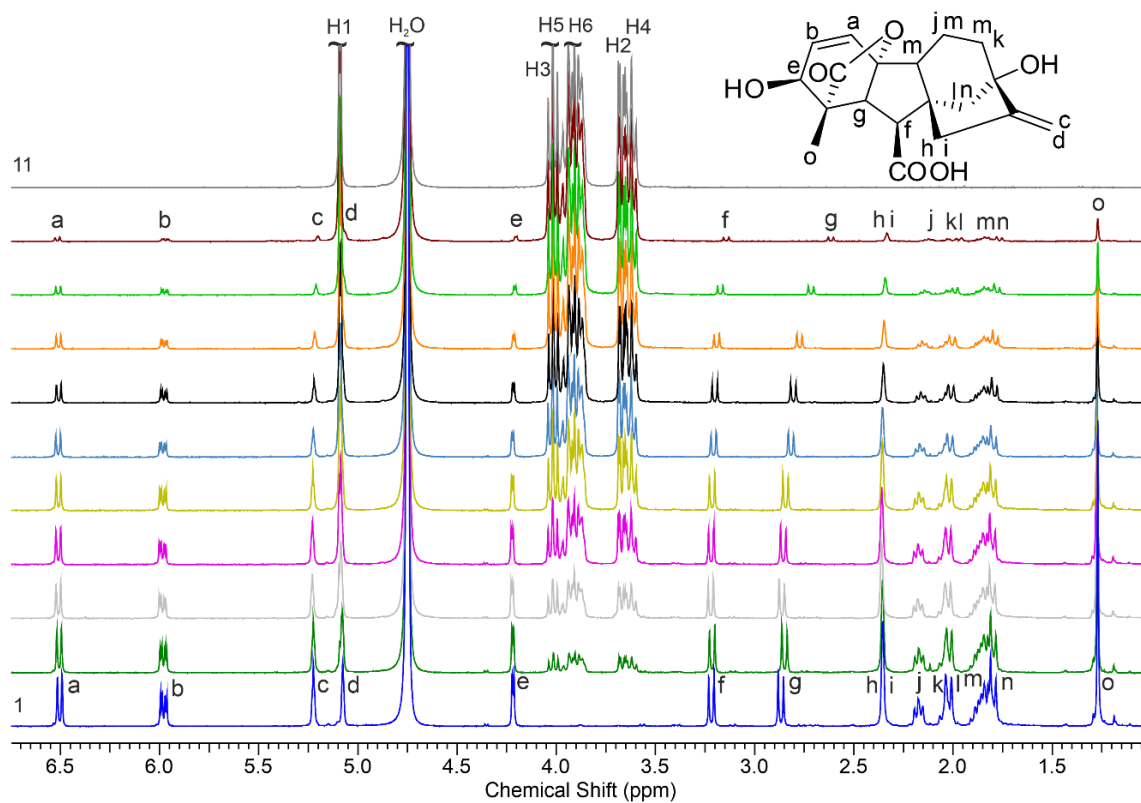
**Příloha 7**  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  a  $\alpha$ -CD měřena Jobovou metodou

**Příloha 8**  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  a  $\gamma$ -CD měřena Jobovou metodou

Příloha 1  $^1\text{H}$  NMR spektrum  $\text{GA}_3$ Příloha 2  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum  $\text{GA}_3$ 

Příloha 3  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  titované roztokem  $\alpha\text{-CD}$  v  $\text{D}_2\text{O}$  při  $30\text{ }^\circ\text{C}$ Příloha 4  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  titované roztokem  $\alpha\text{-CD}$  v pufru při  $30\text{ }^\circ\text{C}$ 

Příloha 5  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  titrované roztokem  $\beta\text{-CD}$  v pufru při  $30\text{ }^\circ\text{C}$ Příloha 6  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  titrované roztokem  $\gamma\text{-CD}$  v pufru při  $30\text{ }^\circ\text{C}$ 

Příloha 7  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  a  $\alpha\text{-CD}$  měřena Jobovou metodouPříloha 8  $^1\text{H}$  NMR spektra  $\text{GA}_3$  a  $\gamma\text{-CD}$  měřena Jobovou metodou