

## Věda, nesmyslně krutá milenka

*Ve chvílích relaxace často hovoří badatelé (všech možných oborů) o vědě, jako o kruté milence. V 21. století bude zřejmě nutné parafrázovat toto staré rčení a doplnit je slůvkem „nesmyslně“.*

*V posledních měsících se o vědě hodně hovořilo a psalo. Pod pojmem věda však myslí každý něco jiného. Bez nároku na správnost lze říci, že převládá názor, že pojem věda je blízký pojmu základní výzkum. Ve společnosti se pak používají další termíny: výzkum aplikovaný, vývoj, inovace. A tady je snad začátek celé řady nedorozumění. Existuje mnoho pokusů jak vědu definovat. Cituji jednu kratší: „Věda je nepřetržitý proces lidského poznávání přírody, společnosti, člověka, lidského myšlení a kultury. Na rozdíl od běžného poznávání jde ve vědě o systematické racionální a metodické vyvozování a zobecňování nových poznatků na základě abstraktního myšlení a teoretické činnosti“. Ve vědeckém bádání tedy nejde o výzkum aplikovaný, ani o vývoj, natož o inovace. Jde o výzkum základní, který podle nositele Nobelovy ceny prof. Wüthricha „nelze předem ani plánovat, ani zaručit. Pokud vědu plánujete, nejedná se o výzkum základní, protože ten je z definice něco nového.“ Ostatně lapidárněji to vyjádřil ještě před ním jiný „nobelista“, Frederic Joliot-Curie, když řekl: „Základní výzkum je to, když nevím, co dělám...“*

*V posledních měsících se hodně diskutovalo „o vědě“, místo aby se mluvilo o schopnostech vědu tvořit. Ve vědě jde především o využívání vědeckého talentu. Ten je bohužel dán jen některým lidem podobně jako talent výtvarný, hudební, sportovní aj. Přestože je všeobecně známo, že v českých zemích je nemnoho skutečně vědeckých týmů, stále se hraje v řadě institucí (s výjimkou AV ČR a některých pracovišť VŠ) „hra na vědce“. Hodnota peněz na vědu se tak logicky rozměňuje. Pletou se peníze na vědu (výzkum základní) s penězi na výzkum aplikovaný nebo dokonce na vývoj a inovace. Ve skutečnosti se vedou spory o tom, jak financovat výzkum, vývoj a inovace, protože až v první řadě jde zase jen o peníze. Typicky českým způsobem se hledají kličky a skuliny v nově zaváděném systému a kvalita, kterou by měl přinést, se tak vytrácí. Problém je noblesně halen do snahy podporovat ty projekty, které peníze nejen spotřebovávají, ale jejichž řešení je i přínáší. To je jistě na místě, pokud se jedná o vývoj a inovace, ale již méně, jde-li o výzkum (základní, snad i aplikovaný). V případě vědy je však pouhé ekonomické*

*hodnocení komické. Věda (v převážně většině oborů) podléhá mezinárodním kritériím hodnocení, která jsou ve svých důsledcích mnohdy ostřejší, než sledování toku peněz úřednictvem s glotovými rukávy. Ale hlavně, opravdová vědecká práce je záležitost výjimečných schopností, souhry talentu a usilovné práce.*

*Snaha smíchat v jednom kotlíku vše od vědy až po inovace je tedy málo smysluplná. Rozhodně by prospělo věci, kdyby se srovnávalo podobně s podobným (jak činí v oblasti základního výzkumu třeba GA ČR) a kdyby byly finance rozděleny do různých balíčků, aby bylo zřejmé, kolik peněz daňových poplatníků jde opravdu na vědu a kolik jich třeba mizí v černých dírách různých „vývoju a inovací“.*

*Pragmaticky by mělo být financování vědy, výzkumu, vývoje a inovací zcela odděleno a posuzováno specificky. Lépe by se vidělo, kam a kolik peněz plyne, na co se přidělené prostředky vynaložily a co vlastně přinesly.*

*Stát by měl mít zájem na vytváření podmínek pro skutečně excelentní vědecké týmy vedené lidmi schopnými vědeckého myšlení a akceptovanými světovou vědeckou komunitou. Takových center vědy ostatně u nás není mnoho, ale jsou významné pro celou společnost. Nelze se však potom divit, že někteří čeští vědci raději působí v zahraničí. V globalizovaném světě by to nemuselo vadit, kdybychom tím nepřicházeli o možnost výchovy mladých nadějí učit se ve špičkových vědeckých týmech.*

*A konečně je tu také neustále bující byrokracie, která vědu „řídí“. Dobrá byrokracie je nutná, nikoliv však byrokrat škůdce měnící pokyny během roku, obměňující formuláře všech možných dokumentů jak na běžícím pásu, i když tím vědu nijak nevylepší, ale pouze jí klade nové a nové překážky. Je smutné, když renomovaný hodnotitel opakovaně musí dokládat svoji kvalifikaci, když neodborníci vymýšlejí pokyny, jak opakovaně kádrovat hodnotitele, kdy samo luštění těchto rébusů představuje více práce, než vlastní hodnocení projektu. Správný byrokrat má být pomocníkem a ne obtěžovatelem. Bohužel, takových je poskrovnu.*

*A tak jako v bajce nakonec přichází poučení. Místo abychom se v péči o vědu, výzkum, vývoj a inovace, vydali cestou třeba Nizozemí nebo Dánska, směřujeme někam úplně jinam.*

Pavel Rauch.

## METODY PŘEDPOVĚDI KOLOIDNÍ STABILITY PIVA

MIROSLAV DIENSTBIER<sup>a</sup>, LUCIE JANKOVÁ<sup>b</sup>,  
PETR SLADKÝ<sup>c</sup> a PAVEL DOSTÁLEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Lípová 15, 120 44 Praha 2, <sup>b</sup> Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, <sup>c</sup> Katedra chemické fyziky a optiky, Matematicko-fyzikální fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Ke Karlovu 3, 121 16 Praha 2  
Pavel.Dostalek@vscht.cz

Došlo 6.1.09, přijato 19.5.09.

---

Klíčová slova: pivo, zákal, koloidní stabilita

---

### Obsah

1. Úvod
2. Koloidní stabilita piva
  - 2.1. Zákal piva a jeho kvantifikace
3. Principy a rozdělení metod předpovědi koloidní stability piva
  - 3.1. Šokovací testy
  - 3.2. Precipitační testy
  - 3.3. Alkoholový chladový test
  - 3.4. Kvantitativní analýza koloidů piva
  - 3.5. Analýza obsahu zákalotvorných látek
  - 3.6. Imunochemické metody
4. Závěr

### 1. Úvod

Pivo jako nápoj je známo už od pradávna. Jeho obliba po celém světě je velmi vysoká a neustále narůstá. Spotřebitelé vyžadují kvalitní nápoj, který je čirý, má čerstvou chuť a vůni, správnou barvu a pěnivost. V dnešní globální ekonomice se požaduje mnohdy až roční garantovaná trvanlivost<sup>1,2</sup> piva, a proto je jedním z hlavních problémů zajištění odpovídající stability všech jeho parametrů. Pivo je složitý koloidní roztok, který obsahuje až několik tisíc různých látek. V tomto systému stačí nepatrné změny, aby výsledný produkt byl odlišný od předešlé šarže výrobku či se v čase změnil jeho vlastnosti.

I když pivo je na výstupu z pivovaru čiré, může v něm z různých důvodů následně vzniknout zákal, který indikuje změny v koloidním systému a je spotřebitelsky nepřijatelný. Díky moderním technologiím mikrofiltrace či

pasterace je nebezpečí infekce a tvorby zákalů způsobených pomnožením mikroorganismů (biologické zákal) dnes již poměrně vzácné, ale tvorbě nebiologických (koloidních) zákalů vznikajících v průběhu jeho stárnutí zcela zabránit nelze<sup>1–4</sup>.

Cílem všech výrobců je z technologického hlediska provést takové zásahy, které při minimálním senzoricím ovlivnění piva zákal omezí – tj. provést optimálním způsobem jeho stabilizaci. Pro kontrolní účely je potřebná metoda, která by na daném výrobku koloidní stabilitu a tím i jeho trvanlivost dostatečně rychle a spolehlivě předpověděla.

### 2. Koloidní stabilita piva

Bez ohledu na barvu má být pivo (kromě některých speciálních značek) na pohled čiré. V průběhu času však dochází k tomu, že molekuly původně rozpuštěné v roztoku se shlukují ve větší celky, na nichž dochází k rozptylu světla – vzniká zákal.

Pro definici pojmu koloidní stabilita či trvanlivost není doposud kritérium, které by bylo jednoznačně přijímané. Z obecného hlediska jde o časový interval, který uplyne od stočení piva k okamžiku, kdy je již koloidní systém piva detegovatelně odlišný od původního. Z pivovarského pohledu to znamená, že pivo již nemá akceptovatelnou čirost – je zakalené. V různých pivovarských skupinách se však pro tuto hranici používají různé hodnoty. Nejčastěji se jako hraniční berou hodnoty trvalého zákalu mezi 1–2 jednotkami EBC (European Brewery Convention), ale např. O'Neill<sup>5</sup> definoval koloidní trvanlivost jako dobu od stočení k dosažení celkového zákalu 2,5 j. EBC při teplotě 0 °C. Stanovení akceptovatelné hranice zákalu není jednoznačné i vzhledem k tomu, že vizuální hodnocení ne vždy souhlasí s výsledky objektivního měření na zákalometru. Subjektivní vnímání zákalu je ovlivněno nejen koncentrací, ale i velikostí přítomných zákalotvorných částic a současně i barvou piva. Jinou možností je definovat dobu koloidní stability jako okamžik, kdy na křivce vývoje zákalu piva v čase dochází ke zlomu a původně neměnný zákal začíná prudce narůstat<sup>6</sup>.

#### 2.1. Zákal piva a jeho kvantifikace

Zákal, který je v pivu z hlediska spotřebitele především optickým vjemem, se objektivně měří pomocí přístrojů nazývaných zákalometry či turbidimetry.

V zákalometru se měří světlo rozptýlené ve vzorku pod jistým úhlem a intenzita tohoto světla se porovnává s intenzitou světla rozptýleného v příslušném zákalovém standardu. Dříve se používaly různé zákalové standardy, v současné době se však používá převážně zákalové sus-

penze formazinu (*N,N'*-dimethylenhydrazin), který po přípravě za definovaných laboratorních podmínek představuje bílou suspenzi ve vodném roztoku, které se uzančně připisuje nominální zákalová hodnota. Stále však existují různé jednotkové stupnice. V pivovarství se používají v Evropě převážně jednotky EBC (European Brewery Convention) a zejména v USA jednotky ASBC (American Society of Brewing Chemists) či řidčeji jednotky podle Helma (1 j. EBC = 40 j. Helma = 69 j. ASBC) a u přístrojů s aplikací mimo pivovarství jsou nejužívanější jednotky NTU (Nephelometric Turbidity Unit) nebo FTU (Formazine Turbidity Unit), kde 1 NTU = 1 FTU = 0,25 j. EBC.

Vývojem se ustanovily nejobvyklejší geometrie uspořádání detekce zákalu a to buď z útlumu primárního světelného svazku prošlého vzorkem (turbidimetrie) či z měření intenzity svazku rozptýleného pod úhlem 90° (nefelometrie) nebo pod relativně malým úhlem 11–25° (dopředný rozptyl). Vzhledem k tomu, že úhlová charakteristika rozptylu závisí výrazně na velikosti částic, jsou i zákalové měření pod odlišnými úhly závislé na velikostní distribuci přítomných částic. Zhruba lze říci, že zákalové měření pod úhlem 90° jsou citlivější k velmi malým částicím submikronové velikosti (v pivovarství někdy tzv. neviditelný zákal – bílkoviny, koloidy) a zákalové měření v dopředném úhlu jsou citlivější k částicím řádové velikosti 3–15 μm (viditelný zákal – kvasinky, vyloučené částičky kalu nebo křemeliny). U dobře filtrovaného čirého světlého piva je proto zákal změřený v dopředném směru o 0,1 až 0,3 j. EBC nižší než při měření pod úhlem 90° (cit.<sup>7,8</sup>), kde se obvykle pohybuje mezi 0,25–0,5 j. EBC.

Metody sledování stability pív uvedené v pivovarských analytikách jsou ve většině případů založeny na nefelometrických měřeních zákalu. Současné měření zákalů ve dvou směrech rozptylu světla<sup>7</sup> (nefelometrickém i dopředném) však umožňuje minimálně kvalitativně rozlišit v pivu zákalové tvoreny převážně částicemi z rozměrových pásem pod a nad hranicí jednoho až dvou mikrometrů.

Nebiologické zákalové měření v pivu jsou teplotně závislé – s rostoucí teplotou prakticky vždy klesají jako důsledek rozpadu částic vázaných slabými interakcemi. Z praktického hlediska se v pivu uzančně definují zákalové měření při dvou teplotách – tzv. trvalý (permanentní) zákal, který je v pivu přítomen při laboratorní teplotě 20 °C a chladový zákal, který se tvoří navíc při ochlazení piva na teplotu 0 °C. (Dané teploty jsou však spíše věcí analytické dohody a byly historicky definovány i s ohledem na praktické možnosti jejich realizace v laboratoři). Zákal, který se reálně měří při teplotě 0 °C se nazývá celkový zákal a je dán součtem zákalu chladového a trvalého.

Chladový zákal se při ohřátí na laboratorní teplotu rozpouští a je ze značné části reverzibilní. Přijímá se, že vzniká slabou vazebnou interakcí typu vodíkového můstku mezi nízkomolekulárními polyfenoly a proteiny. Objevuje se v pivu podstatně dříve než zákal permanentní, v který postupem času přechází<sup>1</sup>. Je proto indikátorem v predikci vývoje koloidního systému piva. Koloidní částice chladového zákalu bývají téměř kulovitého tvaru a jejich průměr se pohybuje řádově v rozmezí od 0,1 do 1 μm. Jejich molekulová hmotnost bývá v rozsahu 10 000 až 100 000 (cit.<sup>9,10</sup>).

Permanentní zákal je také způsoben převážně interakcí mezi polyfenoly a bílkoviny, vazebné síly jsou však silnější a přechází až do kovalentních vazeb. Část zákalu se dále rozpouští při zahřátí na vyšší teploty (40 až 70 °C). Velikost částic, které jsou již nepravidelného tvaru, se v tomto případě pohybuje od 1 do 10 μm (cit.<sup>10</sup>) a je proto jedním z důležitých kritérií při laickém posuzování lahvo-  
vých pív. Na vzniku trvalého zákalu se podílí kromě dalších fyzikálních vlivů zejména teplota a přítomnost kyslíku<sup>1</sup>.

I když hlavními původci nebiologických zákalů jsou bílkoviny a polyfenoly, existují i další složky piva charakteristické pro tvorbu některých typů zákalů, jako jsou polysacharidy, kovové ionty, křemičitany a další<sup>11–13</sup>.

I když hlavními původci nebiologických zákalů jsou bílkoviny a polyfenoly, existují i další složky piva charakteristické pro tvorbu některých typů zákalů, jako jsou polysacharidy, kovové ionty, křemičitany a další<sup>11–13</sup>.

### 3. Principy a rozdělení metod předpovědi koloidní stability piva

Pro předpověď koloidní stability piva bylo v posledních padesáti letech vyvinuto velké množství fyzikálních i chemických metod<sup>14–16</sup>, z nichž pouze některé se používají v praxi. Již tato skutečnost je jistým znamením, že i když řada z nich byla kodifikována i v pivovarských analytikách<sup>8,17,18</sup>, žádná není dostatečně univerzální a spolehlivá.

Všechny předpovědní testy můžeme rozdělit do dvou hlavních kategorií.

- Umělé zrychlení procesu stárnutí piva vyvolané buď fyzikálními (teplotní cyklování) nebo chemickými (např. působením oxidačních činidel) postupy doprovázené měřením změn čírosti. Na tomto principu jsou založeny tzv. šokovací testy.
- Určení obsahu složek, které se na tvorbě zákalu podílejí (zákalotvorné prekurzory) a jejich schopnosti vzájemně reagovat a vytvářet zákal. Do této skupiny patří např. zákalové precipitační testy, alkoholový chladový test, imunochemické postupy či nábojová titrace.

#### 3.1. Šokovací testy

Cílem teplotního šokování piva, kdy je pivo střídavě ohříváno (40–60 °C) a chlazeno (obvykle 0 °C), je urychlit procesy, které při laboratorní teplotě probíhají pomalu. Při „teplých dnech“ jsou zrychleny chemické pochody při stárnutí, při „dnech studených“ je vyvolán chladový zákal<sup>15,19</sup>.

Zkoušky koloidní stability pív tepelným cyklováním patří mezi nejdůležitější kodifikované fyzikální metody a v praxi jsou i nejčastěji používané<sup>8,17,18</sup>. Existuje celá řada provedení metody, které se liší teplotou a dobou ohřevu vzorku a tím, zda se jako parametr sleduje permanentní či chladový zákal. Nejběžnější metody teplotního šokování udává tabulka I. Je možné je navíc kombinovat i s me-

Tabulka I  
Nejběžnější metody teplotního šokování

Metoda	Provedení
Původní EBC test	7 dní při 40 °C a 1 den při 0 °C (cit. <sup>10</sup> )
Schildův test	7 dní při 60 °C a 1 den při 0 °C (cit. <sup>10</sup> )
Současný EBC test	1 den při 0 °C, 2 dny při 60 °C, 1 den při 0 °C (cit. <sup>10</sup> )
Metoda dle Bašařové a Kahlera	6 h při 0 °C, 16 h při 66 °C, 6 h při 0 °C (cit. <sup>15</sup> )
Analytika Mebak r. 1979	1 den při 40 °C (60 °C), 1 den při 0 °C (cit. <sup>1</sup> )
Podle Šavla a Prokopové	24 h při 0 °C – změří se zákal, 6 dní při 50 °C, 24 h při 0 °C – změří se zákal a šokovací cyklus se opakuje, dokud zákal nepřesáhne 2 j. EBC (cit. <sup>1</sup> )

chanickými a optickými vlivy<sup>7,15</sup>.

Kritéria vyhodnocení se pro jednotlivé postupy šokování liší. Zkušenosti při testování např. v pivovarech skupiny Guinness ukazují, že jeden týden při teplotě 37 °C je ekvivalentní měsíčnímu skladování při běžné teplotě (18 °C). Z testování jiné varianty (2 dny při 60 °C následované jedním dnem při –2 °C) vychází, že jeden kompletní cyklus je ekvivalentní 6 týdnům normálního skladování. Z těchto hodnot je vidět, že k předpovědi, zda pivo vydrží po celý rok při skladování, jsou zapotřebí testy, které trvají poměrně dlouho.

Málokterý pivovar si však může dovolit takový komfort, aby byl schopen již stočené pivo ponechat ve svých prostorách, dokud se tyto testy nevyhodnotí. Snaha o urychlení oxidačních procesů, které se značnou měrou podílejí na tvorbě zákalu v pivu, vedla k pokusům použít v kombinaci s teplotou jako oxidační činidla i některé chemické látky. Tak se např. do lahví, které pak byly podrobeny šokování přidával persíran draselný či amonný<sup>20</sup>.

K výhodám šokovacích zkoušek patří skutečnost, že je lze provádět s relativně jednoduchým přístrojovým vybavením (vhodný termostat a laboratorní zákalometr, který je obvykle v pivovarských laboratořích nutný již pro výstupní kontrolu čírosti). Navíc pokud jsou realizovány v komerčních uzavřených lahvích přímo z výrobní linky, mohou postihnout i defekty, k nimž může docházet právě až na plnicí lince. Vzhledem ke složitosti procesu stárnutí se však doporučuje tyto modelové testy u konkrétních značek piv a výrobních postupů korelovat s výsledky dlouhodobých testů koloidního stárnutí za přirozenějších podmínek odpovídajících blíže skladování a transportu.

### 3.2. Precipitační testy

Důraz na zkrácení doby předpovědních testů vede však stále častěji k používání podstatně rychlejších (výsledky v časových intervalech desítek minut až několi-

ka hodin) testů a rozborů, i když jejich korelace s praktickou trvanlivostí je mnohdy menší než u šokovacích zkoušek.

V zákalových precipitačních testech se po přidání vhodného činidla evokuje vyloučení zákalotvorných látek. Nejčastěji se jedná o vysrážení bílkovinných, polyfenolových či bílkovino-polyfenolových komplexů. Měří se vznikající zákal a parametrem pro hodnocení je buď hodnota zákalu nebo množství přidaného činidla pro vyvolání dané hodnoty zákalu.

#### *Srážení síranem amonným*

Tzv. síranový test poskytuje informaci o stabilitě rozpuštěných bílkovinných složek v pivu. Používá se proto zejména k posouzení předpokládané trvanlivosti a sledování účinnosti stabilizace při stabilizačních zásazích týkajících se proteinových složek piva.

K testovanému odplyněnému vzorku piva se (při 20 °C) postupně přidává nasycený roztok síranu amonného (známé činidlo pro izolaci – precipitaci bílkovin). Po počáteční fázi, kdy se zákal nemění či mírně klesá (efekt vsolování), začne zákal prudce narůstat, jak dochází k postupnému vysolování bílkovinných složek.

Subjektivně lze hodnotu síranového testu určit posouzením nástupu viditelného zákalu ve vzorku podle hodnocení pozorovatelem. Objektivní metoda využívá možnost stanovení prahové hodnoty z grafu závislosti měřeného nefelometrického zákalu na koncentraci přidaného činidla<sup>21</sup>.

Hodnota síranového testu se určuje v ml spotřebovaného roztoku síranu amonného do dosažení prahu (bodu zlomu na křivce vývoje zákalu) pro daný objem vzorku. Čím vyšší je hodnota prahu, tím je pivo stabilnější a tím delší je jeho předpokládaná trvanlivost<sup>8,17,18</sup>. Obvyklé hodnoty prahu (v ml nasyceného roztoku (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na 10 ml piva) jsou 0,5–0,75 pro nestabilizovaná piva, 0,75–1,1 pro mírně stabilizovaná piva a > 1,1 pro dobře stabilizovaná piva<sup>8</sup>.

#### *Srážení síranem hořečnatým, srážení kyselinou trichloroctovou*

Testy jsou obdobné testu se síranem amonným. Na základě velikosti vzniklého zákalu (resp. obsahu precipitátu) se kvantifikuje obsah zákalotvorných proteinů. Liší se poněkud odlišnou citlivostí vzhledem k jejich molekulární hmotnosti.

Testy však nejsou příliš rozšířené, protože z hlediska predikce koloidní stability neposkytují zásadně významnější výsledky<sup>15</sup>.

#### *Precipitační index kyseliny pikrové (Esbachův index)*

Esbachovo činidlo je směsí pikrové a octové kyseliny<sup>22</sup>. Sráží především vysoko molekulární a částečně i středně molekulární bílkoviny. Přidává se do piva rozpuštěného v destilované vodě. V roztoku se tvoří zákal – maxima dosahuje při 20 °C po cca 6 hodinách. Množství precipitátu se kvantifikuje prostřednictvím nefelometrického zákalu<sup>15</sup> nebo ve spektrofotometru z poklesu transmittance<sup>8</sup>. Jde o metodu, která se používala zejména pro před-

pověď koloidní stability piv stabilizovaných bentonitem<sup>23</sup> (v současnosti velice řídký případ).

#### Stanovení citlivých proteinů

Ne všechny proteiny resp. jejich fragmenty v pivu se podílejí na tvorbě zákalu. Pouze ta skupina proteinů, která vstupuje do vazebné interakce se svými polyfenolovými partnery<sup>24,25,26</sup> je aktivní – citlivá k tvorbě zákalu. Tyto „zákalově citlivé“ proteiny můžeme proto z piva odstranit jinými polyfenoly – např. gallotaniny. Tanin reaguje s proteinem za tvorby nerozpustného komplexu, který je výsledkem interakce mezi ketonovou skupinou taninu a nukleofilní skupinou (–SH nebo –NH<sub>2</sub>) proteinu.

Obsah citlivých proteinů v pivu můžeme definovat právě přes velikost zákalu vytvořeného v pivu po přidání jistého množství taninu. Principem metody je postupné přidávání definovaného množství taninu do vzorku odplyněného piva. Tanin reaguje s proteiny v pivu a sráží je. Množství sražených proteinů je měřeno zákaloměrem jako nárůst zákalu piva. Výsledek se vyjadřuje jako rozdíl konečného a počátečního zákalu v jednotkách EBC (cit.<sup>8,17,18</sup>).

Ke stanovení obsahu citlivých proteinů v pivu lze použít i jejich sorpci na křemičitém gelu následovanou zpětným vymytím a určením jejich obsahu v eluentu pomocí vhodného barviva a spektrofotometru<sup>27</sup>, jde však o nesrovnatelně pracnější a delší postup.

#### Stanovení tanoidů

Obdobně jako u proteinů ne všechny polyfenolové látky v pivu se podílejí na tvorbě zákalu<sup>28</sup>. Jako tanoidy byly Chaponem<sup>29,30,31</sup> nazvány nízké až středně molekulární polyfenolové látky, které reagují se specifickými proteiny v pivu za vzniku koloidního zákalu. Jsou vyloučitelné (adsorbovatelné) rozpustným vysokomolekulárním PVP (polyvinylpyrrolidonem) pravděpodobně přes vodíkové můstky za tvorby komplexů. Vzniká zákal, jehož intenzita se zvyšuje tak dlouho, než se všechny tanoidy adsorbují.

Stanovení spočívá v titraci piva roztokem PVP za současného měření zákalu. Na křivce vývoje nefelometrického zákalu se za přítomnosti tanoidů tvoří maximum, po jehož dosažení velikost zákalu s dalším dávkováním PVP klesá. Spotřeba PVP v mg l<sup>-1</sup> potřebná k dosažení maximálního zákalu udává koncentraci tanoidů v pivu.

#### Kombinovaný zákalový test

Rychlý test využívající kombinace přídatku proteinu (gliadin) a polyfenolu (catechin) do piva s jeho ohřevem na 80 °C po dobu 20 min a následným měřením celkového zákalu po 30 min inkubaci při 0 °C byl vyvinut a použit<sup>32</sup> k posouzení efektu působení různých stabilizačních prostředků na pivo. Principem bylo evokovat za dostupných laboratorních podmínek zákal v pivu tvorbou komplexů od obou hlavních zákalotvorných složek současně. I když modifikace testu posloužila k vyhodnocení koloidní stability speciálního piva z čiroku<sup>33</sup>, test nenalezl širšího uplatnění (nebyly ani dostatečně eliminovány možné interferenční faktory).

#### Formaldehydový test

Používá se 35% roztok formaldehydu, který se přidává (1 % objemu testovaného vzorku) do piva (provádí se i na lahvovém pivu). Měří se nárůst zákalu po temperaci vzorku na 0 °C po jistou dobu (např. 24 h)<sup>8,15</sup>.

Zákal se poté přepočítává na trvanlivost vyjádřenou počtem tzv. teplých dní (40 °C) resp. po vynásobení dalším korekčním koeficientem na pravděpodobnou trvanlivost.

#### 3.3. Alkoholový chladový test (ACT)

V tomto testu se provokuje vznik zákalu ve vzorku přidávkem několika (3–8) procent alkoholu a následným chlazením do teplot pod 0 °C (obvykle na –5 až –8 °C).

Za laboratorní teploty se do vzorku odplyněného piva přidá aliquotní množství alkoholu a změří se jeho počáteční nefelometrický zákal. Vzorky jsou pak umístěny do termostatu na nízkou teplotu, kde zůstanou po definovaný časový interval (40–60 min). Následně se při této nízké teplotě změří celkový konečný zákal. Alkoholový chladový zákal se bere jako rozdíl zákalu konečného a počátečního.

U piva s nízkou hodnotou alkoholového chladového zákalu se očekává vyšší koloidní stabilita než u piva s vyšší hodnotou<sup>15,29,30,34</sup>. Protože hodnota vytvořeného zákalu závisí na celkovém obsahu alkoholu v pivu, je třeba brát při vyhodnocování v úvahu jeho původní obsah před přidáním.

Pro tento test byly vyvinuty speciální aparatury<sup>35,36</sup>, ale lze ho relativně jednoduše realizovat s obdobným přístrojovým vybavením jako pro šokovací testy<sup>37</sup>.

#### 3.4. Kvantitativní analýza koloidů piva

Pro predikci chování koloidního systému je žádoucí co nejlépe kvalitativně i kvantitativně popsat jeho momentální stav a odezvu na modelový impulz (tepelný, chemický).

Měření zákalu představuje variantu statického kvasielastického rozptylu světla, která však nedává kvantitativní informaci o počtu a distribuci velikosti částic. Takové údaje mohou v principu poskytnout metody dynamického rozptylu světla – DLS (pod jiným názvem fotonová korelační spektroskopie – PCS), které jsou založeny na analýze rozptylu světla v důsledku Brownova pohybu částic v roztoku. Situace je však značně komplikovaná, protože pro výpočty je zapotřebí znát indexy lomu a viskozity matrice a v tak silně heterogenních vzorcích jako je pivo mohou navíc větší částice maskovat jemnější suspendované látky.

Jinou metodou, s jejíž pomocí lze získat informace o částicích v roztoku, je průtoková cytometrie. Běžně se používá pro hodnocení intracelulárních komponent mikroorganismů, ale byla aplikována i pro hodnocení částic zákalu piva. S výhodou zde lze použít barvení fluorescenčními barvivy<sup>38</sup>, která jsou specifická k bílkovinám (např. fluorescein isothiokyanát) či polyfenolům (fluostain I). Specifické barvení je možné použít i pro identifikaci oxa-

látových zákalů (fura-2 pro barvení vápníku.) Tato metoda sice může pomoci k charakterizaci zákalů piva, ale práce na přípravě vzorků je poněkud náročná, takže se doposud používá spíše pro analýzu výsledných zákalů než pro předpověď jejich vývoje.

Obdobné konstatování platí i pro metodu tzv. Coulter-Counter, při níž se detegují změny vodivosti při průchodu částic v kapalině malou štěrbinou a která byla v pivu použita pro charakterizaci velikostní distribuce zákalů<sup>39</sup>. Je však limitována velikostí částic a v některých případech navíc vyžaduje rozpouštění vzorků v roztoku dalšího elektrolytu.

Zpracování výsledků u zde výše uvedených metod komplikuje vysoká heterogenita koloidů piva. Pro předběžnou frakcionaci částic byla testována metoda frakcionace tokem v poli – FFF. Jedná se v podstatě o chromatografickou metodu, kde separace je ovlivněna difuzí a elučním časem. Vlastní separace probíhá v dutém kanálu naplněném pouze mobilní fází. Absence stacionární fáze zabraňuje interakcím pevná látka – pevná látka. Pro koloidy potravin se jako vhodné ukázalo spojení metody FFF s detektorem MALLS (Multiple-Angle Laser Light Scattering), kdy lze nejen detegovat eluované částice, ale i určovat jejich velikost a molekulovou hmotnost. Takto byly charakterizovány submikronové koloidy piva<sup>40</sup> a provedeno porovnání výsledků s dalšími metodami (nefelometrie a PCS).

Aplikace těchto moderních technik však byly v pivovarství prozatím spíše pokusného charakteru. Silným limitujícím faktorem pro běžnou praxi je bohužel výrazně vysoká cena aparatur, která není doposud vyvážená dostatečně spolehlivými výsledky.

#### *Analýza rozložení elektrického náboje v koloidním systému – nábojová titrace*

Mnohé koloidní systémy lze úspěšně popisovat v rámci tzv. teorie DLVO, která vychází z představ o rozložení elektrického náboje v nejbližším okolí koloidních částic. Ve speciální měřicí komůrce – v detektoru částicového náboje se na vzorcích piva měří elektrický potenciál odpovídající vázanému náboji v obalové vrstvě částic. Při postupném řízeném přidávání vhodného polyelektrolytu ke vzorku se získá charakteristická potenciálová titrační křivka. Z porovnání parametrů křivky z referenčního vzorku piva a piva po tepelném šoku lze získat informaci o stavu jeho koloidního systému a uvažovat o míře jeho stability<sup>41</sup>. I v tomto případě se však vychází z představy urychlení procesu stárnutí zvýšením teploty jako u klasických šokovacích zkoušek s měřením zákalu. Zhodnocení tepelného poškození a tím i zhodnocení stability koloidního systému by se však při této metodě mělo dosáhnout za podstatně kratší dobu tepelného namáhání. Metoda je však teprve ve stádiu vývoje.

### 3.5. Analýza obsahu zákalotvorných látek

Obsah pouze jednotlivé zákalotvorné složky může být dostatečně vypovídající o koloidní stabilitě pouze

v případě některých jednotlivých výrobních technologií. Obecně však podstatně vyšší předpovědní sílu mohou mít pouze veličiny – indexy, v jejichž matematické formulaci vystupuje koncentrace minimálně dvou hlavních zákalotvorných složek – zákalově citlivých polyfenolů i proteinů<sup>42–44</sup>. Pro předpověď koloidní stability na základě obsahu významných polyfenolových látek lze tak použít např. i metody vysoce citlivé kapalinové chromatografie (HPLC)<sup>44</sup>, pro zákalově aktivní proteiny některou z metod barvení<sup>27</sup>.

#### *Měření redoxního stavu piva*

Někdy se pro předpověď koloidní stability používají i metody založené na zjišťování redoxních stavů systému. Jedná se buď o měření redukční síly roztoku a nebo o prosté stanovení redoxního potenciálu. Ačkoli je zřejmé, že oxidace se při tvorbě zákalů uplatňuje jako hlavní proces, tento typ měření se ukazuje být vhodnějším spíše pro stanovení chuťové stability než koloidní<sup>1</sup>.

### 3.6. Imunochemické metody

Imunochemické metody se používají pro charakterizaci proteinů, např. k diferenciaci pěnnotvorných a zákalotvorných proteinů<sup>45</sup>. Zákalotvorné proteiny pocházející z hordeinů byly z piva izolovány působením silikagelu. V takto izolovaných proteinech byl odhalen poměrně vysoký obsah prolinu a glutaminu (více než 30 %). Použití sladů s redukováným množstvím zákalotvorných proteinů se proto jeví jako potenciálně vhodná strategie pro zvyšování koloidní stability. Byly připraveny polyklonální protilátky k proteinovým frakcím, které se využívají k posouzení různých sladových proteinů. Tyto protilátky byly postupně použity k výběru monoklonálních protilátek schopných rozpoznat pěnnotvorné a zákalotvorné hordeinové štěpy. Takto vybrané monoklonální protilátky umožnily rozšíření metody ELISA již dříve používané pro charakterizaci sladových proteinů<sup>46,47</sup>. Imunochemické metody byly aplikovány pro předpověď kvalitativních vlastností pěny a zákalu piva přímo ze sladu používaného pro výrobu piva. Předpověď na vývoj koloidní stability finálního piva však prozatím opět není dostatečně efektivní.

## 4. Závěr

Na téma předpověď koloidní stability bylo již napsáno velké množství prací, neboť se jedná o tematiku velmi rozsáhlou a komplikovanou, kde verifikace výsledků si vyžaduje vždy dlouhou konfrontační dobu s reálnou praxí skladování a transportu.

Postupy, které v současné době používá pivovarská praxe, jsou založeny na původních metodách, které se vyvíjejí již od poloviny minulého století. Vlastní zlepšení či vývoj většinou nespočívá v objevení zcela nové metody, ale jedná se zejména o rozvoj techniky a aplikaci poznatků z oblasti koloidní chemie a fyziky do pivovarství.

Účinnost a spolehlivost (zejména rychlých) predikčních testů byla podrobována kritickým rozborům<sup>37,48–52</sup>.

Řada z výše uvedených testů prováděných jak v manuálním, tak poloautomatickém režimu s využitím speciálních přístrojů byla např. nedávno porovnána na sérii piv s krátkou i dlouhou trvanlivostí. Výsledky testů byly korelovány s reálnou trvanlivostí – resp. hodnotami zákalů získaných v čase na odpovídajících pivech ve dvou teplotních režimech blízkých reálným podmínkám při jejich běžném skladování. Z této studie vyplynulo, že jako relativně nejspolehlivějších indikátorů koloidní stability lze použít výsledků tepelných šokovacích zkoušek, nebo součinného produktu obsahu citlivých proteinů a tanoidů získaných z precipitačních zákalových testů<sup>44</sup>.

Pro provádění zákalových precipitačních testů jsou v současné době komerčně dostupné 2 specializované přístroje<sup>36,43</sup>, kde se měří změny zákalu ve 4 ml vzorku v kyvetě. Variantou k nim jsou modulární přístrojové sestavy DATTS a BETA-2002 (cit. 7,53,54). Ty vychází z laboratorního dvouúhlového zákalometru pro měření zákalu ve velkoobjemových kyvetách a komerčních lahvích (pro standardní výstupní kontrolu či měření zákalů při šokovacích zkouškách). Zákalometr je doplněn o speciální nástavec pro měření v 5 ml vzorku ve zkumavce a je řízený z PC speciálním softwarem, který současně ovládá i přídatnou dávkovací pumpu na titrant.

I přes vysoký počet jednotlivých metod používaných pro predikci koloidní stability se stále nedaří najít takovou, která by byla univerzální, dostatečně spolehlivá a současně též rychlá. Proto pivovarníkům nezbyvá, než podle svých vlastních zkušeností dále hledat optimální metodu či kombinaci metod, která nejlépe vyhovuje právě jejich výrobku a finančním možnostem.

*Práce byla podpořena prostředky grantu MSM6019369701, MSM0021620835, MSM 6046137305 a IM0570.*

## LITERATURA

- Bamforth C. W.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 57, 81 (1999).
- Kosař K., Procházka S.: *Technologie výroby sladu a piva*. VÚPS, Praha 2000.
- Briggs D., Boulton Ch., Brookes P., Stevens R.: *Brewing Science and Practice*. CRC Press, Boca Raton 2004.
- Ferenc M.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 1993.
- O'Neill M.: Brewer 82, 54 (1996)
- Leemans C., Pellaud J., Melotte L., Dupire S.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 29, 1 (2003).
- Sladký P., Dienstbier M.: Kvasný Prům. 47, 122 (2001).
- Basařová G. (ed.): *Pivovarsko-sladařská analytika*. Merkanta, Praha 1993.
- Kábrt L.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 1991.
- Claesson S., Sandegren E.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 9, 221 (1963).
- Basařová G., Čepička J.: *Sladařství a pivovarství*. VŠCHT, Praha 1986.
- Siebert K. J., Stenroos L. E., Reid D. S.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 39, 1 (1981).
- Niemsch K., Heinrich T.: Brauwelt 145, 1250 (2005).
- Zedek J.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2004.
- Moll M., v knize: *Brewing Science* (Pollock J. R. A., ed.), sv. II, kap. *Colloidal Stability of Beer*. Academic Press, London 1987.
- O'Rourke T.: Brewer International 2, 41 (2002).
- Analytica EBC*, European Brewery Convention, 5. vyd. Verlag Hans Carl Getranke-Fachverlag, Nürnberg 2005.
- Methods of Analysis*. Institute of Brewing, London 1997.
- Hrnečková L.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 1996.
- Šavel J., Zdvihalová D., Prokopová M.: Kvasný Prům. 42, 11 (1996).
- Sladký P., Císařová H.: Kvasný Prům. 45, 156 (1999).
- Le Corvaisier H.: Brauwissenschaft 13, 85 (1960).
- De Clerck J.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 4, 161 (1953).
- Chapon L.: Monatsschr. Brauwiss. 9/10, 300 (1995).
- Chapon L.: Monatsschr. Brauwiss. 1/2, 12 (1996).
- Chapon L.: Monatsschr. Brauwiss. 3/4, 111 (1996).
- Yang J.-I., Siebert K. J.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 59, 172 (2001).
- Li J., Siebert K. J.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 66, 71 (2008).
- Chapon L.: Brauwelt 108, 3 (1968).
- Chapon L.: J. Inst. Brew. 99, 49 (1993).
- Chapon L.: Monatsschr. Brauwiss. 7/8, 263 (1993).
- Schultz J., Cornelius J., Adams J., Clark D.: Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am. 36, 203 (1999).
- EtokAkpan O. U.: Process Biochem. 40, 2489 (2005).
- Chapon L., Chemardin M.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 11, 389 (1967).
- Moll M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 39, 15 (1981).
- <http://www.pfeuffer.com>, staženo 20.4.2009.
- McCarthy S. L., Melm G. D., Pringle A. T.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 63, 69 (2005).
- Dostálek P., Fiala J., Novák J.: Kvasný Prům. 49, 90 (2003).
- Leedham K.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 16, 729 (1977).
- Pellaud J., Leemans C., Carruthers A., Melotte L.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 30, 119 (2005).
- Titze J., Ilberg V., Jacob F., Friess A., Parlar H.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 31, 79 (2007).
- McMurrough I., Madigan D., Kelly R., O'Rourke T.: Food Technol. 53, 58 (1999).
- <http://www.opto-ems.de>, staženo 20.4.2009.
- Vaag P.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 31, 105 (2007).
- Evans D. E., Robinson L. H., Sheehan M. C., Hill A., Skerritt J. S., Barr A. R., Tolhurst R. L.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 61, 55 (2003).
- Ishibashi Y., Terano Y., Fukui N., Honbou N., Kakui T., Kawasaki S., Nakatani K.: J. Am. Soc. Brew.

- Chem. 54, 177 (1996).
47. Ishibashi Y., Kakui T., Terano Y., Hon-no E., Kogin A., Nakatani K.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 55, 20 (1997).
  48. Siebert K. J., Lynn P. Y., Clark D. F., Hatfield G. R.: Tech. Q. MBBA Commun. 42, 7 (2005).
  49. Berg K. A., Ding L. L., Patterson R.E.: Tech. Q. MBBA Commun. 44, 29 (2007).
  50. Batchvarov V., Chapon L.: Monatsschr. Brauwiss. 8, 331 (1985).
  51. Batchvarov V., Chapon L.: Monatsschr. Brauwiss. 4, 143 (1986).
  52. Batchvarov V., Chapon L.: Monatsschr. Brauwiss. 5, 188 (1986).
  53. Sladký P., Dienstbier M.: Kvasný Prům. 46, 280, (2000)
  54. Sladký P.: Proc. Congr. – Eur. Brew. Conv. 30, 96 (2005).

**M. Dienstbier<sup>a</sup>, L. Janková<sup>b</sup>, P. Sladký<sup>c</sup>, and P. Dostálek<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> *Research Institute of Brewing and Malting, Prague*, <sup>b</sup> *Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*, <sup>c</sup> *Department of Chemical Physics and Optics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague*): **Methods for Prediction of Beer Colloidal Stability**

Compared with most alcoholic beverages, beer is unique due to its instability in the final package. The rate of its deterioration depends on time, temperature, and production batch. The most important is the colloidal stability of beer during its shelf life; beer should not become hazy. There are two principal methods of assessing the stability of beer: (i) accelerated ageing of the packaged beer involving heating for several days followed by measuring turbidity at a low temperature; (ii) measurement of the protein or polyphenol content to predict the shelf life of beer. The methods used for prediction of colloidal stability of beer in practice are reviewed.



## STEROIDNÍ FYTOHORMONY: FUNKCE, MECHANISMUS ÚČINKU A VÝZNAM

MAREK KAMLAR<sup>a,b</sup>, ONDŘEJ UHLÍK<sup>a,b</sup>,  
LADISLAV KOHOUT<sup>a</sup>, JURAJ HARMATHA<sup>a</sup>  
a TOMÁŠ MACEK<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6, <sup>b</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6  
tom.macek@uochb.cas.cz

Došlo 21.1.09, přepracováno 8.7.09, přijato 25.8.09.

Klíčová slova: brassinosteroidy, ekdysteroidy, fytohormony, fytosteroly, RuBisCO, steroidní receptory, vazebné bílkoviny

### Obsah

1. Úvod
2. Steroidní fytohormony a mechanismus jejich účinku
  - 2.1. Brassinosteroidy
  - 2.2. Ekdysteroidy
3. Způsoby studia působení steroidních hormonů u rostlin
  - 3.1. Knock-out a knock-down genu
  - 3.2. Identifikace a izolace vazebných bílkovin
    - 3.2.1. Molekulárně-biologické metody
    - 3.2.2. Afinitní chromatografie
4. Bílkoviny s afinitou ke steroidním fytohormonům
  - 4.1. Vazebné bílkoviny brassinosteroidů
  - 4.2. Vazebné bílkoviny ekdysteroidů
5. Závěr

### 1. Úvod

Fytohormony neboli rostlinné hormony jsou obecně chápány jako endogenní signální molekuly zodpovědné za přenos informací mezi pletivou a orgány<sup>1</sup>. Steroidní fytohormony, jmenovitě brassinosteroidy (BRs) a ekdysteroidy (ES), pak tvoří jednu z podskupin těchto látek.

Význam BRs pro rostlinu spočívá jednak v pozitivní regulaci jejího růstu a jednak ve schopnosti ovlivnění její adaptace na stres vyvolaný biotickými či abiotickými faktory. Bylo prokázáno, že tyto látky jsou hormonálně aktivní<sup>2</sup>. Na rozdíl od živočišných steroidních hormonů jsou však v tomto případě přenos signálu do buňky a následná buněčná odpověď zprostředkovány systémem receptorů lokalizovaných na/v buněčné membráně<sup>3,4</sup>. Přesný mecha-

nismus působení ovšem stále není zcela jasný.

Funkce ekdysteroidů, další ze skupiny látek s povahou hormonů, je dobře prozkoumána u živočichů, zejména pak u hmyzu a korýšů, u nichž tyto látky ovlivňují fáze zakuklení a svlékání a zřejmě i syntézu některých pohlavních feromonů<sup>5</sup>, jejich význam pro rostliny však i přes značný obsah ES v rostlinné tkáni, bohužel, příliš objasněn není.

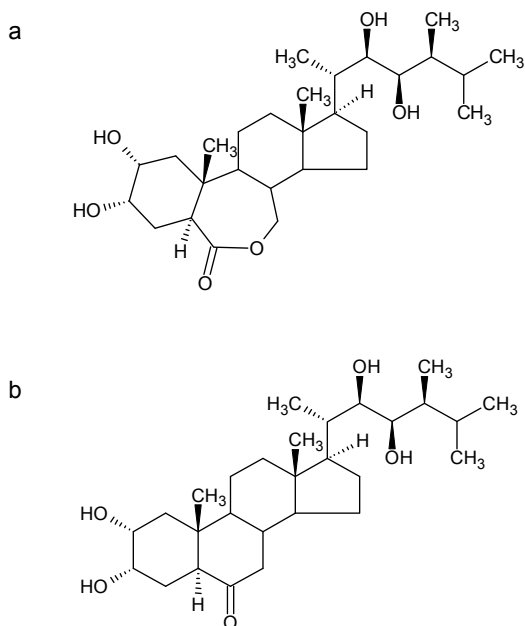
V souvislosti s bližším poznáním mechanismu působení obou výše zmiňovaných skupin hormonů u rostlin je výzkum v současné době orientován dvěma směry: první spočívá ve snaze o cílené odstranění (knock-out) či utlumení (knock-down) některého z genů ovlivňujících signální dráhu studovaných steroidů (vznikají tak např. mutanty necitlivé k působení BRs)<sup>6,7</sup>, druhý naproti tomu využívá přímé izolace vazebných bílkovin či samotných receptorů, a to buď pomocí molekulárně-biologických metod, nebo s využitím afinitní chromatografie.

### 2. Steroidní fytohormony a mechanismus jejich účinku

Mezi steroidní látky s povahou hormonů, které byly v rostlinách nalezeny, patří brassinosteroidy a ekdysteroidy. Jejich základní strukturu tvoří – podobně jako je tomu u živočišných hormonů – steranový skelet. V rostlinách se vyskytují buď volné, nebo vázané. Zatímco volnou formu představují všemožné steroly (steroidy s 3 $\beta$ -hydroxylovou skupinou a 17 $\beta$ -alifatickým postranním řetězcem) a oxysteroly (steroly, jež mají atomem kyslíku modifikován A- či B-kruh steranového skeletu, příp. i postranní řetězec), vázaná forma je zastoupena různými typy konjugátů, zvláště estery sterolů s nasycenými i nenasycenými kyselinami, méně často pak glykosidy<sup>8,9</sup>.

#### 2.1. Brassinosteroidy

BRs (obr. 1) hrají v životě rostliny nezastupitelnou roli. Ovlivňují tvorbu biomasy, růst a diferenciaci orgánů, regulují počet a velikost semen i plodů a v neposlední řadě oddalují senescenci, tedy stárnutí rostliny. Kromě toho se též podílejí na přizpůsobivosti rostliny nepříznivým životním podmínkám, jimiž jsou např. nedostatek živin či vody, přítomnost herbicidů, nadbytek solí, chlad, popř. napadení rostliny škůdci. Bylo zjištěno, že BRs působí podobně jako peptidové hormony u živočichů, tj. prostřednictvím přenosu signálu přes receptor lokalizovaný na buněčné membráně. Někteří autoři vědeckých prací<sup>4</sup> předpokládají nutnost vazby samotného steroidu na vazebnou bílkovinu a následnou interakci vzniklého aduktu s membránovým receptorem, jímž<sup>3,10</sup> zase usuzují na přímou vazbu steroidu na membránový receptor.



Obr. 1. a) Brassinolid, první objevený brassinosteroid, b) kastasteron, biosyntetický prekurzor brassinolidu

## 2.2. Ekdysteroidy

Ekdysteroidy (obr. 2) byly nalezeny jak u živočichů (např. u hmyzu a některých dalších členovců), tak u rostlin (nejhojněji jsou zastoupeny zejména ve špenátu a některých kapradinách)<sup>11,12</sup>. ES jsou rovněž označovány jako svlékáací hormony, a to díky vlivu na ekdysy hmyzu<sup>5</sup>. U něj také ovlivňují tvorbu pohlavních feromonů a mnohé jiné funkce<sup>5</sup>. Zatímco význam ES pro živočichy je znám, jejich funkce v rostlinách objasněna není. Byla sice navržena hypotéza o jejich možném zapojení se do obrany rostliny proti býložravým škůdcům a tedy funkci jakýchsi přírodních pesticidů<sup>5,13</sup>, ale zda je tomu tak i ve skutečnosti, bude nutné podložit ještě dalšími studii.

## 3. Způsoby studia působení steroidních hormonů u rostlin

### 3.1. Knock-out a knock-down genu

Pro studium mechanismu působení steroidních hormonů u rostlin se nejčastěji využívají metody založené na knock-outu, resp. knock-downu některého z genů signálních drah studovaných steroidů. Zatímco knock-outem genu míníme jeho úplné odstranění, příp. inaktivaci (např. vložením jednoho nebo více nukleotidů do nukleotidové sekvence)<sup>14</sup>, knock-down genu naproti tomu spočívá pouze v utlumení jeho exprese pomocí mechanismu RNA interference („rušení“ RNA, RNAi)<sup>15,16</sup>.

### 3.2. Identifikace a izolace vazebných bílkovin

#### 3.2.1. Molekulárně-biologické metody

Molekulárně-biologické metody identifikace vazebných bílkovin rostlinných sterolů (SBPs, z angl. sterol-binding proteins) jsou, podobně jako je tomu v případě izolace živočišných SBPs<sup>17,18</sup>, založeny na přípravě knihoven cDNA (z angl. complementary DNA) určitého rostlinného organismu a následném vyhledávání konkrétních genů či sekvencí DNA v těchto knihovnách<sup>19</sup>.

#### 3.2.2. Afinity chromatografie

Afinity chromatografie je chromatografická metoda založená na specifické a současně vratné interakci mezi dvěma molekulami dvou různých látek. Těmi mohou být např. antigen a protilátka, enzym a kofaktor, inhibitor nebo substrát, lektin a sacharid nebo případně i hormon či léčivo a jeho příslušný bílkovinný receptor či přenašeč<sup>20</sup>.

V případě studia mechanismu působení steroidních fytohormonů se využívá afinity vazebné bílkoviny ke steroidnímu ligandu navázanému na inertním polymerním nosiči. Samotné navázání pak vychází z klasické Merrifieldovy syntézy na pevné fázi<sup>21</sup>, která však byla v průběhu let pro potřeby steroidních látek<sup>22,23</sup>, resp. přímo brassinosteroidů a ekdysteroidů<sup>24</sup>, různě modifikována.

## 4. Bílkoviny s afinitou ke steroidním fytohormonům

### 4.1. Vazebné bílkoviny brassinosteroidů

Jak bylo uvedeno výše, mechanismus působení BRs je založen na přenosu signálu přes receptor lokalizovaný na buněčné membráně. K tomu může teoreticky docházet buď přímou vazbou steroidu na receptor, nebo nepřímo navázáním steroidu na vazebnou bílkovinu a následnou interakcí vzniklého aduktu s receptorem<sup>4</sup>. Výsledky z poslední doby<sup>3,10</sup> sice ukazují spíše na platnost první z teorií, nicméně ani druhá možnost není ještě zcela vyloučena.

#### BRII kinasy

Na základě genetických studií s některými mutanty huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) byl identifikován první gen pro receptory rostlinných brassinosteroidů, *BRII* (z angl. brassinosteroid-insensitive), dle původu označovaný též jako *AtBRII* (cit.<sup>25</sup>). Tento gen byl poté v různých obdobích a s různým stupněm ortologie nalezen také u rýže (*Oryza sativa*; *OsBRII*)<sup>4,26</sup>, rajčete (*Lycopersicon esculentum*; *LeBRII*, resp. *tBRII*)<sup>27</sup>, hrachu (*Pisum sativum*; *PsBRII*)<sup>28</sup>, ječmene (*Hordeum vulgare*; *HvBRII*)<sup>29</sup>, bavlníku (*Gossypium hirsutum*; *GhBRII*)<sup>30</sup> a révy (*Vitis vinifera*, *VvBRII*)<sup>31</sup>.

Produkty *BRII* genů – *BRII* bílkoviny – řadíme k tzv. LRR-RLKs kinasám (z angl. leucine-rich repeats-receptor-like kinases)<sup>32–34</sup>. Základem jejich struktury je extracelulární část, která je transmembránovou doménou spojena s částí intracelulární. U *AtBRII* tvoří extracelu-

lární část celkem 25 (cit.<sup>35–37</sup>), podle některých prací<sup>10</sup> 24 tandemových LRRs, před a za ohraničených 2 cysteinovými páry a mezi LRR21 a LRR22 přerušených 70aminokyselinovým ostrůvkem. Dále je zde přítomen tzv. signální peptid a také motiv tzv. leucinového zipu<sup>35</sup>, jehož existenci Vert a spol.<sup>10</sup> naopak vylučují. Intracelulární část je mj. tvořena Ser/Thr kinasovou doménou a CTE (z angl. carboxy-terminal extension) oblastí<sup>4,10,37</sup>.

Další ze skupiny BR receptorů, OsBRI1 rýže, je velmi podobný výše popisovanému AtBRI1. Místo 25 zde však nalezneme pouze 22 LRRs párů. Aminokyselinový ostrůvek je tvořen opět 70 aminokyselinami a je umístěn mezi LRR18 a LRR19. Bez výraznějších strukturních změn zůstávají jak Ser/Thr kinasová, tak i transmembránová doména. Přítomnost leucinového zipu zde ale prokázána nebyla<sup>33,38</sup>.

U rajčete (*Lycopersicon esculentum*) je BRI1 ortologem tBRI1. Montoya a spol.<sup>27</sup> klonováním a následnou sekvenční analýzou *tBRI1* zjistili, že tento gen zde kóduje bílkovinu obdobnou kinase SR160, identifikované u rajčete *L. peruvianum*<sup>39</sup> jako receptor pro systemin (angl. systemin receptor 160kDa), peptidový hormon – novější studie se přiklánějí spíše k označení endogenního elicitoru<sup>40</sup> – uvolňovaný při mechanickém poškození rostliny či jejím napadením býložravým hmyzem<sup>41</sup>.

Systemin – typický pro většinu zástupců čeledi *Solanaceae* vyjma tabáku<sup>42</sup> – vyvolává systémovou odpověď organismu<sup>43</sup>. Ta spočívá zejména v syntéze jasmonátu, signální molekuly zodpovědné u rostlin za indukci tvorby obranných látek, např. inhibitorů proteas, peroxidas či polyfenoloxidas<sup>41,44–46</sup> a PR proteinů<sup>47</sup>.

Sekvenčním porovnáním bylo zjištěno, že tBRI1 a SR160 jsou jedna a tatáž bílkovina. Výsledky poukazují na necelý 1% rozdíl, který je přisuzován mezidruhové proměnlivosti (tBRI1 byl nalezen u *L. esculentum*, zatímco SR160 u *L. peruvianum*)<sup>39,48</sup>. tBRI1/SR160 je tedy receptorem duálním, tj. pro brassinosteroidy i systemin současně<sup>49,50</sup>. Podobně jako je tomu v případě AtBRI1, i tBRI1/SR160 obsahuje 25 LRRs dvojic a 70aminokyselinový ostrůvek mezi LRR21 a LRR22. Výraznou podobnost nalezneme také u jednotlivých domén<sup>39</sup>.

U hrachu (*Pisum sativum*) je BRI1 ortologem PsBRI1. Nomura a spol.<sup>28</sup> předpokládají totožnost *PsBRI1* genu s genem *Lka*, ekvivalentem *AtBRI1*, což naopak Bishop a Koncz<sup>51</sup> vyvracejí. PsBRI1 obsahuje opět 25 LRRs párů, aminokyselinový ostrůvek však tvoří jen 68 aminokyselin, vnořených mezi LRR21 a LRR22 (cit.<sup>28</sup>).

Struktura HvBRI1, BRI1 ortologu u ječmene (*Hordeum vulgare*), vykazuje prvky podobnosti s jinými BRI1 ortology. Opět je přítomna LRR-doména se 70aminokyselinovým ostrůvkem, transmembránové i kinasové domény a dva páry Cys zbytků. Rozdíl je pouze v počtu párů LRRs – má jich pouze 22 – a v absenci motivu leucinového zipu. Tím se podobá spíše OsBRI1 než ostatním doposud zmiňovaným BRI1 ortologům. Vysvětlení rozdílů v počtu LRRs kopií a (ne)přítomnosti Leuzipu lze hledat v evoluční rozmanitosti. Huseníček,

rajče, hrách, bavlník i vinná réva totiž patří mezi rostliny dvouděložné, zatímco rýže i ječmen mezi rostliny jednoděložné<sup>29</sup>.

### BRL proteiny

Prohledáním genových databází (GenBank/EMBL/DDBJ) bylo u rostlin nalezeno několik dalších BRI1 homologů. Jedněmi z nich jsou tzv. BRL proteiny (z angl. BRI1-like proteins). U huseníčku se jedná o AtBRL1 (cit.<sup>52,53</sup>), AtBRL2 – identický s dříve nalezeným VH1 (z angl. vascular highway 1) proteinem<sup>52,54</sup> – a AtBRL3 (cit.<sup>52</sup>), u rýže o OsBRL1, OsBRL2 a OsBRL3 (cit.<sup>38</sup>). Z dalších lze jmenovat např. hypotetickou bílkovinu s označením LjBRI1 (cit.<sup>55</sup>), homolog BRI1 z luskoviny *Lotus japonicus*, resp. CrBRI1 (cit.<sup>56</sup>), BRI1 homolog z kokošky *Capsella rubella*.

Zatímco exprese *BRI1* genu je orgánově specifická<sup>26</sup>, *BRL* geny se exprimují převážně v cévních svazcích<sup>52</sup>. U huseníčku jsou BRL – podobně jako BRI1 – lokalizovány na plazmatické membráně. Na rozdíl od BRL2 jsou BRI1 a BRI3 schopny vázat brassinolid (obr. 1a)<sup>3,52,53</sup>. A právě schopnost vazby téhož ligandu jako u BRI1 i výrazná sekvenční homologie s BRI1 (43% jako celku, 90% mezi LRRs, resp. 93% mezi aminokyselinovými ostrůvkem) vedly<sup>52</sup> k vyslovení hypotézy o nových BR receptorech – BRL1 a BRL3.

O BRL je známo, že podporují diferenciaci cévních a procévních buněk<sup>52</sup>. A protože i BRs ovlivňují diferenciaci cévních buněk<sup>57</sup>, lze předpokládat, že se tak děje právě díky interakci s BRL receptory a jimi zprostředkovanou buněčnou odezvou.

BRL proteiny huseníčku jsou strukturně velmi podobné BRI1. N-koncová signální sekvence je opět následována extracelulární doménou tvořenou 23 (u BRL1 a BRL3), resp. 22 (u BRL2) páry LRRs a 70aminokyselinovým ostrůvkem a spojenou transmembránovou doménou s doménou intracelulární<sup>52,53</sup>.

Podobně jako u huseníčku, tak i u rýže jsou BRL proteiny zastoupeny nejméně 3 druhy. Nakamura a spol.<sup>38</sup> našli *in silico* sekvenčním porovnáním ortologů BRI1 a BRL proteiny OsBRL1, OsBRL2 a OsBRL3. Z jejich výsledků taktéž vyplývá, že vazby brassinolidu jsou schopny opět pouze OsBRL1 a OsBRL3. Kinoshita a spol.<sup>3</sup> se domnívají, že vazebné schopnosti BR receptorů souvisí s částí sekvence (-Asp-Gly-Ser-Met-) LRR21 ostrůvkové domény.

Stejně jako *AtBRI1*, tak i *OsBRI1* může být exprimován ve všech orgánech<sup>26</sup>. Určitou podobnost lze nalézt také u *BRL* genů. Zatímco *AtBRL1* je exprimován zejména v kořenech, stoncích a cévních tkáních a *AtBRL3* převážně v cévních tkáních, *OsBRL1* a *OsBRL3* jsou exprimovány hlavně v kořenech a *OsBRL3* navíc i v embryích<sup>32,38</sup>.

### BAK1 kinasy

Bylo prokázáno, že BRI1 je hlavní součástí brassinosteroidového receptoru<sup>58</sup>. Na přenosu signálu se však podílí i tzv. BAK1 kinasa (z angl. BRI1-associated kinase 1), u huseníčku označovaná též jako AtSERK3 (z angl.

*A. thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 3)<sup>59–61</sup>.

BAK1 je tvořena třemi částmi: mimobuněčnou, vnitrobuněčnou a transmembránovou, která obě tyto části propojuje. O jejich struktuře platí totéž, co bylo napsáno u BRI1, u mimobuněčné části jsou však zjevné rozdíly: Zatímco signální peptid a motiv leucinového zipu (u BAK1 je kratší, je tvořen pouze 4 páry Leu-zbytků) zůstávají zachovány, aminokyselinový ostrůvek zde chybí. Počet LRRs párů je také odlišný (pouze 5) a navíc je zde přítomna doména bohatá na prolin<sup>59</sup>. BAK1 se tak strukturou podobá spíše SERK kinasám než samotnému BRI1 (cit.<sup>59</sup>).

#### Mechanismus aktivace BR-receptoru

Jak BRI1, tak BAK1 jsou v nepřítomnosti brassinosteroidů v homodimerní – inaktivní – formě. Má-li však dojít k přenosu signálu a následné buněčné odpovědi, musí být obě kiny nejprve aktivovány.

Společným rysem aktivace většiny receptorových kinas (RK) u živočichů je di(oligo)merizace indukovaná ligandem a následovaná transfosforylací tohoto di(oligo)meru<sup>62</sup>. Zda je tomu tak i u rostlin, nebylo dosud jednoznačně prokázáno.

Na základě výsledků z poslední doby a možné podobnosti s výše zmiňovanou aktivací živočišných RK byly pro rostlinné BR-receptory navrženy dva modely mechanismu aktivace: První vychází z toho, že navázání BR-ligandu na extracelulární doménu BRI1 vyvolá vzájemnou interakci BRI1 s BAK1, tvorbu heterodimeru BRI1/BAK1 a následnou transfosforylací mezi BRI1 a BAK1 (cit.<sup>59</sup>), druhý naopak z toho, že vazba BR-ligandu na extracelulární doménu BRI1 vyvolá konformační změny mezi kinasovými doménami obou jednotek BRI1-homodimeru, a teprve pak může dojít k fosforylaci a aktivaci BAK1 (cit.<sup>37,60</sup>).

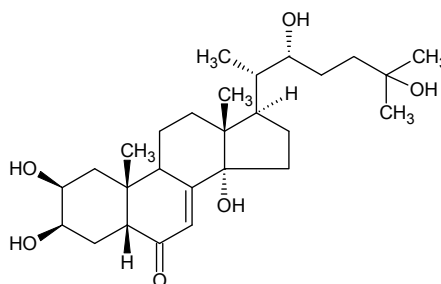
Dle Kinoshita a spol.<sup>3</sup> je pro vazbu BR-ligandu na extracelulární doménu BRI1 u *A. thaliana* nutný minimální vazebný motiv sestávající z 22. LRR repetice a 70aminokyselinového ostrůvku. Taktéž bylo zjištěno<sup>63</sup>, že BRI1 může přenášet signál i bez BAK1, a to pravděpodobně díky interakci s BKK1 proteiny (z angl. BAK1-like kinase), dříve označovanými jako SERK4. BAK1 i BKK1 pak podle studií z posledních let<sup>63,64</sup> patří mezi proteiny s dvojitou funkcí. Kromě již zmiňovaného významu pro BR-signalizaci je jim připisována také role regulátorů obranných mechanismů rostliny. Samotná regulace je pak miněna v negativním slova smyslu a jako nezávislá na přítomnosti BR-ligandu.

#### 4.2. Vazebné bílkoviny ekdysteroidů

Ekdysteroidy jsou látky polární a tedy poměrně dobře rozpustné ve vodě. Jejich afinita k bílkovinám – ve srovnání s jinými typy steroidů – je proto také mnohem nižší<sup>65</sup>.

#### Ekdysonový receptor

U obratlovců, resp. hmyzu, je nejlépe popsán receptor pro ekdysteroid označovaný jako ekdyson (obr. 2). Jeho



Obr. 2. Ekdyson, první objevený ekdysteroid

struktura je obdobou struktury receptorů pro thyroidní hormony, kdy jsou receptory vázány na specifické úseky jaderné DNA, které se v případě ES označují jako tzv. EcRE (z angl. ecysteroid response element)<sup>66</sup>.

Ekdysonový receptor (EcR) je charakterizován dvěma oblastmi homologie – centrálně umístěnou DNA-vazebnou doménou (DBD, z angl. DNA-binding domain) a blíže C-konci orientovanou doménou pro vazbu hormonu (HBD, z angl. hormone-binding domain)<sup>67</sup>. DBD obsahuje jako strukturální motiv dva tzv. Cys<sub>2</sub> – Cys<sub>2</sub> zinkové prsty, pomocí nichž se může receptor vnořit mezi specifické páry basí EcRE na DNA helixu<sup>68</sup>. HBD je oproti DBD oblastí, která kromě vazby hormonu zprostředkovává i heterodimerizaci receptoru (viz dále) a též na ligandu závislou transkripční aktivitu<sup>68,69</sup>.

Kromě již uvedených částí obsahuje EcR také několik proměnlivých, nehomologních úseků. K nim patří N-koncová část proteinu, která je cílem fosforylace a tím i samotné aktivace transkripce, dále tzv. pantová oblast, která slouží jako závěs mezi DBD a HBD a která navíc umožňuje rotaci DBD při vazbě receptoru na EcRE, a v neposlední řadě též proměnlivá oblast C-konce, o níž se zatím předpokládá, že není pro vazbu hormonu nikterak potřebná<sup>69,70</sup>.

Jaderné receptory mohou být plně aktivní pouze tehdy, pokud dimerizují s další molekulou receptoru<sup>68</sup>. V případě EcR ale není druhým partnerem tatáž molekula, nýbrž RXR, tedy receptor pro retinoid X (derivát kys. *cis*-9-retinové; oxidační produkt retinalu). Dimerizace je přitom umožněna hydrofóbními repetičemi v HBD doméně a usnadňována jednak interakcemi mezi DNA-vazebnými doménami obou partnerů a jednak přítomností samotného ekdysteroidového ligandu, který se váže na EcR. Teprve vzniklý heterodimer RXR:EcR je ale schopen vázat ES s dostatečnou afinitou<sup>67</sup>.

U hmyzu je obdobou RXR tzv. ultraspiracle (USP) protein<sup>71,72</sup>. Patří do skupiny receptorů označovaných jako sirotčí (angl. orphan)<sup>73</sup>. Toto pojmenování je ovšem notně zavádějící, protože vyvolává představu toho, že receptor kdysi ligand měl, ale postupem času jej ztratil. Přitom se ale může jednat o receptor, který teprve čeká na objevení svého ligandu. V případě USP totiž existují jakési náznaky toho, že by jeho vhodným ligandem mohl být některý zástupce tzv. juvenilních hormonů (JH), látek podílejících se

společně s ES na metamorfóze hmyzu<sup>74</sup>. Příkladem by mohl být methyl-epoxyfarnesoát (JH III), který při biotestech<sup>75,76</sup> skutečně vykazoval afinitu k USP. Ta ovšem byla mnohokrát nižší než je pro jaderné receptory typické.

Komplex RXR:EcR, resp. USP:EcR s navázaným ekdysteroidem se váže prostřednictvím DBD k EcRE (cit.<sup>67,71</sup>), načež je dále aktivován fosforylací. Takto aktivovaný poté urychluje tvorbu přediniciačního komplexu transkripčních jednotek faktorů TF2A a TF2D, a tím indukuje transkripci cílových genů<sup>68,77</sup>.

#### RuBisCO

Zatímco u živočichů je struktura EcR popsána poměrně podrobně, u rostlin je tomu naopak. Lze sice usuzovat na jistou konzervativnost a tedy možnou podobnost s výše uvedenou strukturou, není ovšem vyloučeno, že by mechanismus působení ES u rostlin nemohl být založen na zcela jiném principu. Stejně jako v případě živočišných ES-receptorů, kdy je např. DNA-vazebná doména RXR, resp. USP proteinů, vysoce konzervovaná, zatímco HBD vykazuje výrazné evoluční rozdíly<sup>76</sup>, tak i u rostlin na různých vývojových stupních se mohou receptory, resp. přímo jejich strukturální prvky, vzájemně odlišovat.

Macek a spol.<sup>78</sup> ve vztahu k vazebným bílkovinám ekdysteroidů u rostlin zmiňují ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasu (RuBisCO), jeden z klíčových enzymů Calvinova cyklu. Význam tohoto enzymu tkví hlavně ve schopnosti fixovat a poté zabudovávat vzdušný CO<sub>2</sub> do struktury organických molekul, tedy karboxylaci. Při ní dochází k přeměně ribulosa-1,5-bisfosfátu na 3-fosfoglycerát, jeho redukci na glyceraldehyd-3-fosfát a ten pak slouží jako výchozí látka pro tvorbu sacharosy, škrobu a dalších sloučenin<sup>79,80</sup>. Macek a spol.<sup>78</sup> dále poukazují na možnost pozitivní regulace enzymové aktivity RuBisCO pomocí některých druhů ekdysteroidních látek. Jak přesně k ovlivnění dochází a příp. na jaké místo na jeho molekule se tyto látky mohou vázat, je předmětem dalších experimentů.

Že má smysl se tímto problémem vůbec zabývat, je zřejmé již ze samotné podstaty temnostní fáze fotosyntézy, tj. spotřeby CO<sub>2</sub> a jeho využití k tvorbě sacharidů, mastných kyselin či aminokyselin, tedy základních složek rostlinného organismu. Jakékoliv výraznější zvýšení aktivity výše zmiňovaného enzymu či zvýšení jeho obsahu v rostlinách tak může vést jednak ke snižování přebytků CO<sub>2</sub> z ovzduší a jednak ke zvýšení tvorby biomasy pro energetické či potravinové účely. Problematika vazebných bílkovin fytoekdysteroidů tak díky možné spojitosti s fotosyntézou přechází z úrovně ryze teoretické na úroveň praktickou.

## 5. Závěr

Jak přesně funguje to či ono, k čemu to vlastně rostlina má, či jak to souvisí s tím a oním? I to jsou otázky, kterými se nyní musíme zabývat. Z výše uvedeného je zřejmé, že se na poli studia steroidních fytohormonů neza-

hálí, leč i přes intenzivní snahy je tato problematika stále zahalena mnoha nejasnostmi a domněnkami. První receptory pro brassinosteroidy, resp. první vazebné bílkoviny ekdysteroidů u rostlin tak nelze nazvat jinak než „střípky mozaiky, které bude nutné ještě nějak poskládat“. Zda se nám to podaří či nikoliv, ukáže až čas.

*Tato práce vznikla v rámci řešení projektů IM06030 a Z40550506.*

## LITERATURA

1. Pavlová L.: *Fyziologie rostlin* [online]. 2006, staženo 9. 1. 2009. Dostupné z: <[http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/pavlova/fyziologie\\_rostlin/](http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/pavlova/fyziologie_rostlin/)>.
2. Szekeres M., Nemeth K., Koncz-Kálman Z., Mathur J., Kauschmann A., Altmann T., Rédei G. P., Nagy F., Schell J., Koncz C.: *Cell* 85, 171 (1996).
3. Kinoshita T., Caño-Delgado A., Seto H., Hiranuma S., Fujioka S., Yoshida S., Chory J.: *Nature* 433, 167 (2005).
4. Müssig C., Altmann T.: *Trends Endocrin. Met.* 12, 398 (2001).
5. Harmatha J., Dinan L.: *Phytochem. Rev.* 2, 321 (2003).
6. Noguchi T., Fujioka S., Choe S., Takatsuto S., Yoshida S., Yuan H., Feldmann K. A., Tax F. E.: *Plant Physiol.* 121, 743 (1999).
7. Yokota T.: *Trends Plant Sci.* 2, 137 (1997).
8. Lafont R., Harmatha J., Marion-Poll F., Dinan L., Wilson I. D.: *Ecdybase - The ecdysone handbook. 3rd edition* [online]. 2002, poslední revize v březnu 2008. Dostupné z: <<http://ecdybase.org>>.
9. Zullo M. A. T.: *The Brassinosteroids Page* [online]. 1997, poslední revize 29. října 2008. Dostupné z: <<http://members.tripod.com/~mzullo>>.
10. Vert G., Nemhauser J. L., Geldner N., Hong F., Chory J.: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 177 (2005).
11. Jizba J., Herout V., Šorm F.: *Tetrahedron Lett.* 18, 1689 (1967).
12. Macek T., Vaněk T., v knize: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (Bajaj Y., ed.). Springer, Berlin 1994.
13. Bergamasco R., Horn D. H. S., v knize: *Invertebrate Endocrinology, Vol. 1: Endocrinology of Insects* (Downer R. G. H., Laufer H., ed.). Liss, New York 1983.
14. Bouché N., Bouchez D.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 111 (2002).
15. Small I.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 148 (2007).
16. Kusaba M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 139 (2004).
17. Aniss A. M., Apostolopoulos J., Dworkin S., Purton L. E., Sparrow R. L.: *DNA Cell Biol.* 21, 571 (2002).
18. Dawson P. A., Ridgway N. D., Slaughter C. A., Brown M. S., Goldstein J. L.: *J. Biol. Chem.* 264, 16798 (1989).
19. Skirpan A. L., Dowd P. E., Sijacic P., Jaworski C. J., Gilroy S., Kao T. H.: *Plant Mol. Biol.* 61, 553 (2006).

20. Amersham Biosciences: *Affinity chromatography – principles and methods* [online]. Staženo 9. 1. 2009. Dostupné z: <[https://www.chromatography.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/91D3DF5DE303E8B6C1256EB400417F34/\\$file/18102229AE.pdf](https://www.chromatography.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/91D3DF5DE303E8B6C1256EB400417F34/$file/18102229AE.pdf)>.
21. Merrifield R. B.: *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149 (1963).
22. Routledge A., Abell C., Balasubramanian S.: *Synlett* 1, 61 (1997).
23. Bodanzsky M., Bodanzsky A.: *The Practice of Peptide Synthesis*. Springer-Verlag, Berlin 1984.
24. Kamlar M., Macek T., Koncz C., Kohout L.: *Eur. J. Biochem.* 271(S1), 113 (2004).
25. Li J., Chory J.: *Cell* 90, 929 (1997).
26. Yamamuro C., Ihara Y., Wu X., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M.: *Plant Cell* 12, 1591 (2000).
27. Montoya T., Nomura T., Farrar K., Kaneta T., Yokota T., Bishop G. J.: *Plant Cell* 14, 3163 (2002).
28. Nomura T., Bishop G. J., Kaneta T., Chory J., Yokota T.: *Plant J.* 36, 291 (2003).
29. Chono M., Honda I., Zeniya H., Yoneyama K., Saisho D., Takeda K., Takatsuto S., Hoshino T., Watanabe Y.: *Plant Physiol.* 133, 1209 (2003).
30. Sun Y., Fokar M., Asami T., Yoshida T., Yoshida S., Allen R. D.: *Plant Mol. Biol.* 54, 221 (2004).
31. Symons G. M., Davies C., Shavrukov Y., Dry I. B., Reid J. B., Thomas M. R.: *Plant Physiol.* 140, 150 (2006).
32. Morillo S. A., Tax F. E.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 460 (2006).
33. Friedrichsen D., Chory J.: *BioEssays* 23, 1028 (2001).
34. He Z., Wang Z. Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Chory J.: *Science* 288, 2360 (2000).
35. Clouse S. D.: *Mol. Cell* 10, 973 (2002).
36. Friedrichsen D. M., Joazeiro C. A., Li J., Hunter T., Chory J.: *Plant Physiol.* 123, 1247 (2000).
37. Wang X., Li X., Meisenhelder J., Hunter T., Yoshida S., Asami T., Chory J.: *Dev. Cell* 8, 855 (2005).
38. Nakamura A., Fujioka A., Fujioka S., Sunohara H., Kamiya N., Hong Z., Inukai Y., Miura K., Takatsuto S., Yoshida S., Ueguchi-Tanaka M., Hasegawa Y., Kitano H., Matsuoka M.: *Plant Physiol.* 140, 580 (2006).
39. Scheer J. M., Ryan C. A.: *PNAS* 99, 9585 (2002).
40. Narvaez-Vasquez J., Ryan C. A.: *Planta* 218, 360 (2004).
41. Pearce G., Strydom D., Johnson S., Ryan C. A.: *Science* 253 (5022), 895 (1991).
42. Scheer J. M., Pearce G., Ryan C. A.: *PNAS* 100, 10114 (2003).
43. Meindl T., Boller T., Felix G.: *Plant Cell* 10, 1561 (1998).
44. Lindsey K., Casson S., Chilley P.: *Trends Plant Sci.* 7, 78 (2002).
45. Ryan C. A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 112 (2000).
46. Farmer E. E., Ryan C. A.: *PNAS* 87 (19), 7713 (1990).
47. Niki T., Mitsuhara I., Seo S., Ohashi Y.: *Plant Cell Physiol.* 39, 500 (1998).
48. Yin Y., Wang Z. Y., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida S., Asami T., Chory J.: *Cell* 109, 181 (2002).
49. Boller T.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 116 (2005).
50. Szekeres M.: *Trends Plant Sci.* 8, 102 (2003).
51. Bishop G. J., Koncz C.: *Plant Cell* 14(S1), S97 (2002).
52. Caño-Delgado A., Yin Y., Yu C., Vafeados D., Mora-García S., Cheng J.-C., Nam K. H., Li J., Chory J.: *Development* 131, 5341 (2004).
53. Zhou A., Huachun H., Walker J. C., Li J.: *Plant J.* 40, 399 (2004).
54. Clay N. K., Nelson T.: *Plant Cell* 14, 2707 (2001).
55. Sato S., Kaneko T., Nakamura Y., Kato T., Tabato S.: *DNA Res.* 8, 311 (2001).
56. Rossberg M., Theres K., Acarkan A., Herrero R., Schmitt T., Schumacher K., Schmitz G., Schmidt R.: *Plant Cell* 13, 979 (2001).
57. Iwasaki T., Shibaoka H.: *Plant Cell Physiol.* 32, 1007 (1991).
58. Wang Z. Y., Seto H., Fujioka S., Yoshida S., Chory J.: *Nature* 410, 380 (2001).
59. Nam K. H., Li J.: *J. Cell* 110, 203 (2002).
60. Li J., Wen J., Lease K. A., Doke J. T., Tax F. E., Walker J. C.: *Cell* 110, 213 (2002).
61. Hecht V., Vielle-Calzada J. P., Hartog M. V., Schmidt E. D., Boutilier K., Grossniklaus U., de Vries S. C.: *Plant Physiol.* 127, 803 (2001).
62. Schlessinger J.: *Cell* 103, 211 (2000).
63. He K., Gou X., Yuan T., Lin H., Asami T., Yoshida S., Russell S. D., Li J.: *Curr. Biol.* 17, 1109 (2007).
64. Zipfel C.: *Curr. Opin. Immunol.* 20, 10 (2008).
65. Westphal U. (ed.): *Steroid-Protein Interactions II*. Springer-Verlag, Berlin 1986.
66. Cherbas L., Lee K., Cherbas P.: *Genes Dev.* 5, 120 (1991).
67. Yao T. P., Forman B. M., Jiang Z., Cherbas L., Chen J.-D., McKeown M., Cherbas P., Evans R. M.: *Nature* 336, 476 (1993).
68. Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie*, str. 467 a 470. S. Rosypal, 3. vyd., Brno 1999.
69. Aranda A., Pascual A.: *Physiol. Rev.* 81, 1269 (2001).
70. Sluder A. E., Maina C. V.: *Trends Genet.* 17, 206 (2001).
71. Thomas H. E., Stunnenberg H. G., Stewart A. F.: *Nature* 362, 471 (1993).
72. Oro A. E., McKeown M., Evans E. M.: *Nature* 347, 298 (1990).
73. Giguere V.: *Endocr. Rev.* 20, 689 (1999).
74. Maki A., Sawatsubashi S., Ito S., Shirode Y., Suzuki E., Zhao Y., Yamagata K., Kouzmenko A., Kato S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 262 (2004).
75. Jones D., Jones G.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 771 (2007).
76. Hayward D. C., Dhadialla T. S., Zhou S., Kuiper M.

- J., Ball E. E., Wyatt G. R., Walker V. K.: *J. Insect Physiol.* 49, 1135 (2003).
77. Weigel N. L.: *Biochem. J.* 319, 657 (1996).
78. Macek T., Uhlík O., Kamlar M., Harmatha J., Kohout L. (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.): CZ patent 299886 (A 01 H 1/00, C 12 N 15/82).
79. Raghavendra A. S., v knize: *Encyclopedia of Applied Plant Science* (Thomas B., Murphy D. J., Murray B. G., ed.). Elsevier, Oxford 2003.
80. Malkin R., Niyogi K., v knize: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L., ed.), kap. 12. American Society of Plant Physiologists, Rockville 2000.

**M. Kamlar<sup>a,b</sup>, O. Uhlík<sup>a,b</sup>, L. Kohout<sup>a</sup>, J. Harmatha<sup>a</sup>, and T. Macek<sup>a,b</sup>** (<sup>a</sup> *Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, <sup>b</sup> *Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*):  
**Steroid Phytohormones: Function, Mechanism of Action, Significance**

In plants, steroid hormones serve as endogenous signaling molecules. Brassinosteroids act as positive growth regulators or as compounds responsible for plant stress tolerance. Phytoecdysteroids probably show an antifeedant activity. It is assumed that the brassinosteroid signal transduction is mediated by the membrane receptor system whereas the ecdysteroid action is still unclear. This review summarizes possibilities of identifying plant proteins capable of binding to steroid hormones in order to get a better insight into their function. Methods of studying the mechanism of action of steroid phytohormones include gene knock-out or knock-down technologies or direct isolation of steroid-binding proteins. The approach is illustrated by the known mechanisms as well as by identification of the Rubisco enzyme as a steroid-binding protein.

## Děkan přírodovědecké fakulty UK

vypisuje konkurs na přijetí do doktorského studia v následujících oborech:

analytická chemie, anorganická chemie, biochemie, fyzikální chemie, makromolekulární chemie, modelování chemických vlastností nano- a biostruktur, organická chemie a vzdělávání v chemii.

Studium bude zahájeno 1. 10. 2010. Podmínkou přijetí je absolvování VŠ ve shodném nebo blízkém studijním oboru. Přihlášky a podrobné informace jsou na adrese: PŘF UK, oddělení doktorského studia, Albertov 6, 128 43 Praha 2, tel. 221 951 162, 221 951 163. Přihlášky se přijímají do 30. 4. 2010.

## VALIDOVANÉ POČÍTAČOVÉ MODELY – QUANTITATIVE STRUCTURE – ACTIVITY RELATIONSHIP TOOL BOX

MARIÁN RUCKI a MILOŇ TICHÝ

Státní zdravotní ústav, Šrobárova 28, 100 42 Praha 10  
mtichy@szu.cz

Došlo 19.1.09, přijato 20.4.09.

Klíčová slova: QSAR, Tool Box, validace, legislativa, OECD

### Obsah

1. Úvod
2. (Q)SAR Application Tool Box a jeho vývoj
3. Kategorie chemických sloučenin
4. Využití Tool Boxu
5. Budoucnost systému Tool Box
6. Závěr

### 1. Úvod

Tento příspěvek se zabývá legalizací počítačových výsledků o nebezpečnosti chemických sloučenin pro legislativní použití. Co je zapotřebí, aby takové výsledky byly stejně použitelné jako výsledky tradičních testů *in vivo* a *in vitro*? Pro chemické bezpečnostní listy, legislativní posuzování nezávadnosti chemických přípravků a potravin máme nový druh údajů, a to odhady výpočtem *in silico*. Část dětství v historii QSAR (z angl. Quantitative Structure – Activity Relationships, kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou látek a jejich biologickou účinností), začínající koncem 50. let a v 60. letech, tak končí.

V listopadu 2002 na jednání 34. společné schůze organizací Chemicals Committee a Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology v Paříži bylo dohodnuto ustavení skupiny expertů při Organizaci pro hospodářskou spolupráci a rozvoj OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), která se nyní zabývá problematikou legalizace výsledků modelů QSAR. Následovala další setkání v Ispře (Itálie), která organizovalo Evropské centrum pro validaci alternativních metod při Spojených výzkumných ústavech Evropské komise ECVAM/JRC EC (European Centre for Validation of Alternative Methods / Joint Research Centre at European Committee) v roce 2003 a další opět v Paříži v září 2004. Toto poslední setkání organizoval sekretariát OECD spolu s JRC EC/ECVAM. Projednávala se legalizace výsledků analýzy QSAR jako alternativní metody pro testování toxicity *in silico* v návaznosti na jednání dalších skupin o bezpečnosti expozice chemickým látkám a hledání principů

validace metod *in vitro*, které probíhalo ve městě Setubal v Portugalsku v roce 2002 (odtud název Setubalské principy). Závěrem byl formulován návrh principů validace metod (Q)SAR (tzn. metod QSAR i SAR), které musí být splněny, aby výsledky odhadem pomocí modelů QSAR byly přijaty stejně jako výsledky alternativních metod, spočívajících na využití nižších organismů, tkání, buněk apod.

Tato schůzka byla pro další vývoj legalizace výsledků modely QSAR velmi významná. Sešli se zde právníci, úředníci státních a vládních správ z nadnárodních i soukromých organizací s odborníky na výpočetní modely pro odhad toxicity výpočtem (jak zní celý termín), chemiky a toxikology. Státy byly zastoupené v celém spektru OECD, ale i mimo něj: od Kanady přes Evropskou unii, po Japonsko a Koreu. Byly hledány a vybírány alternativní metody rychlejší než metody klasické, zároveň nejméně stejně informativní a levné, již dobře propracované, poznané a vyvinuté.

Po bouřlivé diskusi se podařilo zformulovat pět kritérií „Setubalských principů pro validaci QSAR“, nověji již „QECD principy“. Je vhodné upozornit, že i v takovéto diskusi se projeví obchodní a politické motivy. Principy<sup>1</sup> v tom pořadí, jak jsou uváděny, zní:

1. Musí být přesně definovaný účinek, jehož velikost je odhadována.  
*Potíž je v tom, že odhadovaný účinek může být měřen podle různých experimentálních protokolů a za různých experimentálních podmínek.*
2. Musí být jednoznačně uveden algoritmus, který byl k tvorbě modelu použit.  
*Je známo, že u mnohých komerčních modelů tato informace není, firmy ji nepodávají a veřejně přístupná není. Bez této informace však nemůže být model nezávisle ověřen. To může být omezující při přijetí výsledků pro právní účely.*
3. Musí být definována oblast použitelnosti.  
*QSAR modely jsou bezprostředně spojeny s typy chemické struktury, fyzikálně-chemickými vlastnostmi nebo mechanismem účinku, pro které byly tyto modely vytvořeny. Nejde jen o skupiny chemických látek, o rozsah velikostí fyzikálně-chemických vlastností, experimentální podmínky, ale při měření velikosti biologického účinku i o přesně vymezený biologický objekt, včetně pohlaví, věku, podmínek měření, jako je teplota a tlak.*
4. Musí existovat vhodné míry statistického hodnocení dobré shody, robustnosti a schopnosti odhadovat (predictivity).  
*Jde o vnitřní i vnější validaci. O tomto bodu existuje již řada studií, množství návodů a průvodců, obsahující i doporučené statistické indexy a způsoby validace<sup>2,3</sup> (křížová validace – cross validation, křížová*



korelační koeficient  $Q$  a jeho kvadrát, korelační koeficient  $r$  a jeho kvadrát, indexy schopnosti odhadu, jako jsou  $PRESS = \sum[(exp - cal)(exp - cal)]$  Predictive Residual Sum of Squares a  $PRES D = (PRESS/n)^{1/2}$  Predictive Residual Standard Deviation, což jsou standardní chyba a standardní rozptyl odhadu, apod.).

5. Uvést mechanistickou interpretaci měřeného účinku, pokud ji lze najít.

*Toto kritérium nemá za účel vyčlenit modely bez interpretace účinku, ale přinutit k zamyšlení, jaký mohou mít vztah použité molekulové deskriptory k měřenému účinku, ať jde o fyzikálně-chemické indexy nebo molekulové fragmenty a že tato skutečnost (zamyšlení) je dokumentována.*

## 2. (Q)SAR Application Tool Box a jeho vývoj

Na základě těchto principů se začalo s vývojem „nástroje“, který se nazval (Q)SAR Application Tool Box<sup>4</sup> (dále bude v textu pro zkrácení uváděn jen jako Tool Box). Jde o softwarovou aplikaci, která by měla být využívána vládními úředníky, úředníky chemického průmyslu a dalšími pracovníky, kteří potřebují ke své činnosti znát údaje o toxických a ekotoxických vlastnostech chemických sloučenin a to i pro sloučeniny, které testovány nebyly. Tool Box je soubor nástrojů pro tvorbu validovaných modelů QSAR, který bude tvořen ve více etapách. První verze byla zveřejněna v březnu 2008, aby byl prověřen koncept tohoto nástroje a první upravená verze 1.1 v prosinci 2008. Tvorbě komplexního systému pro vyhledání potřebných toxikologických údajů bylo věnováno již hodně úsilí<sup>5</sup>.

Důvodů, proč hledat alternativní metody pro testování toxicity chemických sloučenin bylo hned několik. Byl to požadavek ukotvený v direktivě 86/609/EEC o ochraně zvířat proti týrání. Impulsem byla práce, kterou publikovali Burch a Russell<sup>6</sup>. Ta obsahovala požadavek 3R (tři er), z angl. Reduction, Refinement, Replacement, tedy snížit, zlepšit, nahradit pokusná zvířata při získávání informací o účincích sloučenin na zdraví. Dále to bylo právní nařízení o omezení testování kosmetických přípravků na zvířatech (76/768/EEC/EEC). V neposlední řadě to je program chemické bezpečnosti REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) č. 1907/2006/EC. Ten ukládá obchodníkům a průmyslovým pracovníkům nejen pravidla o zacházení a distribuci chemických sloučenin, ale požaduje snížení testování na obratlovcích. Tomu mají odpomoci nejen alternativní metody, ale i sdílení výsledků toxikologického testování všemi, kteří je požadují, aby nebylo testování těžé látky nebo přípravku prováděno vícekrát, než je nutné.

Modely (Q)SAR a jiné metody pro odhad toxických účinků výpočtem byly vysvětlovány v několika kurzech. Ty byly zaměřeny zejména na pracovníky ze státního aparátu a z průmyslu členských zemí EU, kteří se zabývají právními předpoklady pro přijetí výsledků testování toxicity. První kurz byl organizován v Sofii v říjnu 2005 a byl zaměřen na teorii i využití modelů pro odhad toxicity

výpočtem – *in silico* technika. Druhý kurz, kterého se zúčastnilo již 39 posluchačů z 13 zemí, následoval v červenci 2006 v Ispře (Itálie). Ve třetím kurzu, který proběhl opět v Ispře v červnu 2007, byly týmem z European Chemical Bureau představeny softwarové systémy, expertní systém a datový soubor AMBIT a organizacemi CEFIC (European Chemical Industry Council, European Committee, Brusel) a OECD navržený a vyvinutý Tool Box. Tool Box je samostatný počítačový program pracující pod Windows, vyžaduje procesor pracující při 2 GHz nebo rychleji, 8 Gb místa na pevném disku a 1 Gb pro operační RAM. Je k dostání bez poplatků, protože jeho vývoj byl hrazený Evropskou unií. Verzi 1.1 (prosinec 2008) lze nalézt na adrese [www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar](http://www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar) spolu s návodem na instalaci nebo přes vyhledávač Internetu pod heslem QSAR Tool Box, kde najdete vysvětlení jeho funkce a jsou uvedeny nejnovější informace a verze.

Smyslem projektu Tool Box je, aby validace a využívání modelů QSAR byly snadno dostupné, transparentní a pro administrativní pracovníky pochopitelné, a zároveň méně nákladné. Tool Box využívá informace a nástroje z různých zdrojů tím, že jsou do něho zabudovány a spojeny do logického celku. Jsou to údaje toxikologických datových souborů, údaje, které byly někdy získány dřívějšími pokusy na zvířatech nebo pokusy *in vitro*, datový soubor a expertní vyhledávací program AMBIT (CEFIC) a údaje, které dosud v souborech zahrnuty nejsou. Řada organizací se zabývá tím, že je vyhledává v literatuře a tvoří nové toxikologické datové soubory (rozšířený AMBIT) (granty podporované OECD a CEFIC). Této práce se zúčastnilo více pracovních skupin, nejenom z OECD. Tak spolupracovaly např. European Chemical Bureau, dánská EPA, US EPA, Environment Canada, NITE Japan, European Chemical Industry Council i velké organizace chemického průmyslu, které poskytovaly experimentální údaje jimi dříve získané, jako jsou ExxonMobil, Unilever a další.

## 3. Kategorie chemických sloučenin

Klíčová část činnosti Tool Boxu je schopnost seskupovat chemické látky do chemických kategorií. Chemická kategorie je skupina chemických sloučenin, jejichž fyzikálně-chemické, toxikologické, ekotoxikologické vlastnosti nebo jejich osud v životním i pracovním prostředí je podobný nebo se chovají podle společného vzoru jako výsledek strukturální podobnosti.

## 4. Využití Tool Boxu

Uživatel může Tool Box využívat nejen pro popis chemické struktury sloučeniny, ale i pro nalezení vhodných experimentálních výsledků, pro vyhledávání, zda sloučenina již není v národních seznamech nebo v existujících chemických kategoriích nebo zda nebyla hodnocena nějakou jinou organizací. Tool Box vyhledá v seznamech možné analogy, seskupí sloučeniny podle mechanismu účinku nebo na základě strukturální podobnosti

a podle společného metabolitu. Z těchto skupin vybere chemické sloučeniny s anomálním metabolismem nebo anomálním mechanismem toxického působení.

Chybějící údaje v kategoriích doplní pomocí modelů QSAR, analýzy trendů nebo pomocí techniky „read-across“ nebo pomocí knihovny modelů QSAR. V kategoriích nemusí být údaje pro všechny měřené účinky sloučenin, které jsou v kategorii obsažené, ale ostatních musí být dostatek, aby chybějící mohly být odhadnuty. Tool Box uspořádá odpovědi i pro tisk nebo export svých výsledků.

Tool Box tak dovoluje uživateli systematicky kategorizovat chemické sloučeniny do skupin podle jednotlivých účinků pro všechny členy kategorie za předpokladu obecného chemického nebo toxického účinku nebo typu účinku nebo strukturní podobnosti nebo společného metabolitu. Stejným způsobem je Tool Box schopen rychle vyhodnotit obecné toxikologické chování pro všechny členy kategorie nebo odhadnout shodné trendy mezi důležitými účinky, a to i pro legislativní použití.

Technika kategorizace v Tool Boxu přináší možnost soustředit se na vlastnosti chemických látek, jako je toxický efekt nebo typ mechanismu účinku, dovoluje provést odhad pro všechny členy kategorie, aniž by všechny požadované údaje existovaly. Tím šetří náklady finanční, časové i pokusná zvířata. Spolehlivý odhad nebezpečnosti chemických sloučenin umožňuje mechanistickým porovnáváním analogů bez nutnosti dalších pokusů.

To je umožněno tím, že Tool Box obsahuje velké množství datových souborů a experimentálních i odhadnutých výsledků fyzikálně-chemických vlastností sloučenin, údajů o osudu látek v životním i pracovním prostředí a o toxikologických i ekotoxikologických účincích sloučenin. Tool Box je otevřený systém, do kterého lze importovat další datové soubory v případě, že jsou pro účely Tool Boxu poskytnuty. Čerpá výhody z příspěvků expertů ve vládách, státních i soukromých organizacích, ale i nevládních neziskových organizací, jako jsou různá občanská sdružení, ekologické organizace nebo nadace. Tím je splněna i podmínka, aby systém byl rychle veřejně přístupný a použitelný.

## 5. Budoucnost systému Tool Box

Druhá fáze činností spojených s QSAR Tool Boxem bude probíhat po čtyři roky v letech 2008 až 2012 a nové verze 2.0 a 3.0 se poskytnou veřejnosti v roce 2010 a 2012. Budou nalezeny na již výše uvedené adrese [www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar](http://www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar). Činnost bude zaměřena na vývoj potřebných informačních technologií, na rozšíření a vývoj nových schopností systému, na doplňování datových souborů, na vytvoření (Q)SAR knihovny a expertního systému na vyhledávání dat a zejména na osvětu, školení, kurzy a výuku o jeho využívání pro legislativní účely pro potřebné pracovníky. Dlouhodobým cílem je zajištění techniky kategorizace pro doplňování údajů o všech organických sloučeninách a pro všechny toxické účinky, které legislativa požaduje. Při OECD se

proto tvoří samostatná skupina, zabývající se rozvojem a využitím Tool Boxu.

## 6. Závěr

V příspěvku je popsán způsob, jak dospět k validaci výsledků modelů Quantitative Structure – Activity Relationships (QSAR) pro legislativní účely. Základní impuls k vytvoření systému QSAR Application Tool Box přišel od OECD. Jde o otevřený systém, který umožňuje vytvářet modely QSAR validované pro legislativní použití a který bude dále rozvíjen.

*Tato práce byla podpořena granty GA ČR 203/06/1265, IGA MZ ČR NS/9647-4 a MŠMT 2B008075 a Státním zdravotním ústavem v Praze.*

*QSAR Tool Box byl vyvinut v Laboratory of Mathematical Chemistry, University „Prof. Assen Zlatarov“, Burgas, Bulharsko za podpory OECD, CEFIC, European Chemical Bureau, dánské EPA, US EPA, Environment Canada, NITE Japan jako zdrojů informací a krytí nákladů.*

## LITERATURA

1. Report from the Expert group on (quantitative structure – activity relationships(Q)SAR) on the principles for the validation of (Q)SARs. (ENV/JM/MONO), Series on Testing and Assessment, No. 49, OECD, Environment Directorate, 2004.
2. Eriksson L., Jaworska J., Worth A. P., Cronin M. T. D., McDowel R. M., Gramatica P.: *Environ. Health Persp.* 111, 1361 (2003).
3. Wold S.: *Quant. Str. Act. Relat.* 10, 191 (1991).
4. US EPA/EC Joint project on the evaluation of (Quantitative Structure Activity Relationships. (ENV/JM/MONO), Series on Testing and Assessment, No. 88, OECD, Environment Directorate, 2008.
5. LRI LandmarkProjects: Alternatives to animal testing (AMBIT and OECD Toolbox) (Watzel de Wolf, Dupont Coordination Centre), CEFIC Annual Workshop, Brussels, November 20-21, 2008.
6. Russell W. M. S., Burch R. L.: *The Principles of Human Experimental Techniques*. Methuen, London 1959.

**M. Rucki and M. Tichý** (*National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic*): **Tools for Development of Validated Computer Models – QSAR Application Tool Box**

A way to legalization results of Quantitative Structure – Activity Relationships (QSAR) models is described. A basic impulse has come from OECD followed by the other countries of the world. Final tool, QSAR Application Tool Box, has been developed and as an open system will be developed in the future, too.

## PROTIRAKOVINOVÉ TAXÁNOVÉ PRÍRODNÉ LÁTKY

MICHAL MARUNA, MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ  
a PETRA ONDREJÍČKOVÁ

Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej  
a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita,  
Radlinského 9, 812 37 Bratislava  
maria.sturdikova@stuba.sk

Došlo 12.2.08, prepracované 14.5.09, prijaté 4.6.09.

Kľúčové slová: diterpény, paclitaxel, taxány, *Taxus* sp.,  
rakovina

### Obsah

1. Úvod
2. Charakterizácia taxánových diterpénov
  - 2.1. Biologická aktivita a terapeutické využitie analógov paclitaxelu
  - 2.2. Mechanizmus účinku taxánových zlúčenín
  - 2.3. Formy aplikácie taxánov v liečbe
3. Tvorba a získavanie taxánov z prírodných a alternatívnych zdrojov
  - 3.1. Biosyntéza
  - 3.2. Izolácia z rastlinného materiálu
  - 3.3. Semisyntéza
  - 3.4. Chemická syntéza
  - 3.5. Biotechnologická produkcia
4. Záver

### 1. Úvod

Prírodné produkty sa oddávna používali ako účinné prostriedky na liečenie rôznych chorôb či už v tradičnej alebo v dnešnej novodobej medicíne. V súčasnosti sa čoraz viac do popredia dostávajú ťažko liečiteľné civilizačné choroby ako napr. rakovina. Preto sa vedci intenzívne zaoberajú vývojom nových liečiv a inšpiráciu častokrát hľadajú v prírode. Mnohé farmaceuticky významné látky boli izolované z rastlín, živočíchov, húb, morských organizmov a mikroorganizmov. Aj diterpenoidné taxány s hlavným zástupcom paclitaxelom boli objavené pri štúdiách viac ako 12 000 prírodných látok s protirakovinovou aktivitou.

Skúmania fytochemického profilu extraktov kôry *Taxus* sp. (tis) viedli k izolácii cytotoxických diterpenových taxánov, spomedzi ktorých najúčinnější je paclitaxel. V poslednom desaťročí je paclitaxel významným príro-

som v chemoterapii malígnych ochorení. Je účinný na rôzne druhy nádorov, špeciálne vaječníkov a prsníkov. Skúma sa aj ako potenciálne liečivo voči skleróze multiplex, psoriáze, reumatoidnej artritíde. Doteraz je známych viac ako 300 taxánov (prírodných aj semisyntetických), z nich mnohé sú dnes v preklinickom výskume ako potenciálne protirakovinové liečivá. Farmaceutický význam, intenzívny výskum a nízky obsah tejto zložitej látky v rastline (do 600 ppm v suchých častiach) viedli k hľadaniu možností biotechnologickej produkcie, pretože priemyselne zatiaľ dominuje finančne náročná chemická semisyntéza spojená s izoláciou z mezoproduktov rastlín *Taxus* sp. Alternatívne produkčné systémy pre taxány sú najmä rastlinné bunky *Taxus* sp. a mikroorganizmy. V tejto súvislosti boli začaté intenzívnejšie štúdie endofytických a epifytických fungálnych a bakteriálnych komunit hostiteľských farmaceuticky významných rastlín.

### 2. Charakterizácia taxánových diterpénov

Diterpény sú veľkou podskupinou terpénov, ktoré tvoria jednu z najväčších skupín prírodných produktov. Viac ako 30 000 zlúčenín patriacich do tejto skupiny zahŕňa aj medicínsky významné látky ako vitamíny, hormóny a cytostatické liečivá.

Taxány sú vo vode málo rozpustné diterpény, ktorým sa v poslednej dobe venuje veľa pozornosti, pretože sú účinnými protinádorovými látkami. Paclitaxel, komplexný amidový diterpenový derivát izolovaný z pacifického tisu (*Taxus brevifolia*), bol popísaný Národným rakovinovým inštitútom (NCI) v USA v roku 1962. V deväťdesiatych rokoch 20. storočia bol spoločnosťou Bristol-Myers Squibb patentovaný obchodný názov paclitaxelu Taxol®. V súčasnosti je považovaný za jeden z najdôležitejších protirakovinových prostriedkov<sup>1</sup>. Záujem o paclitaxel začal okolo roku 1962, keď extrakt z kôry *Taxus brevifolia* bol testovaný v rastlinnom skríningu NCI (National Cancer Institute, USA). Klinický výskum paclitaxelu bol však oneskorený pre ťažkosti, ktoré súviseli s jeho toxicitou, určením presnej chemickej štruktúry a hlavne výskytom v prírodných zdrojoch vo veľmi malých množstvách. Diterpenový pseudoalkaloid so sumárnym vzorcom  $C_{47}H_{51}NO_{14}$  a molekulovou hmotnosťou 852 Da bol prvýkrát získaný v čistej forme v roku 1969 a jeho komplikovaná štruktúra bola publikovaná v roku 1971 (cit.<sup>2</sup>). História paclitaxelu je prehľadne sumarizovaná v tabuľke I.

#### 2.1. Biologická aktivita a terapeutické využitie analógov paclitaxelu

Taxánové zlúčeniny disponujú viacerými funkciami priaznivými ale aj nevhodnými pre organizmus. Toxicita

Tabuľka I  
História paclitaxelu (Taxolu®) ako protirakovinovej látky<sup>3</sup>

Rok	Udalosť
1963	Objavenie protirakovinovej aktivity extraktu kôry <i>Taxus brevifolia</i> počas skríningu 35 000 rastlín.
1971	Identifikácia paclitaxelu ako aktívnej súčasti protinádorovej aktivity extraktu.
1979	Zistenie unikátneho mechanizmu paclitaxelu na stabilizáciu tubulínu.
1983	Zahájenie klinickej skúšky bezpečnosti a účinnosti paclitaxelu voči rôznym typom rakoviny (NCI).
1989	Dosiahnutie 30 % úspešnosti liečby rozvinutej rakoviny vaječníkov.
1991	Spoločnosť Bristol-Myers Squibb je vybraná ako komerčný partner NCI vo vývoji injekčnej formy a aplikácií paclitaxelu.
1992	Úradné schválenie používania paclitaxelu na liečbu ťažko liečiteľnej rakoviny vaječníkov. Klinické testy ukázali, že toto liečivo je účinné aj na pokročilé štádium rakoviny prsníkov.
1993	Spoločnosť Bristol-Myers Squibb končí s ťažbou <i>Taxus brevifolia</i> pre výrobu paclitaxelu a začína skúmať iné obnoviteľnejšie zdroje tejto zlúčeniny.
1994	Úradné schválenie používania paclitaxelu na liečbu rakoviny prsníkov v štádiu, keď počiatočná chemoterapia po šesť mesačnej liečbe nebola účinná alebo na liečbu metastázujúcej rakoviny prsníkov, ktorá sa nedá liečiť chemoterapeutickou kombináciou.
1995	Prehodnocovanie schválenia používania semisyntetickej formy paclitaxelu.
1997	Úradné schválenie používania semisyntetického paclitaxelu na liečbu Kaposiho sarkómu spojeného s AIDS v druhej línii liečby. Schválenie produkcie paclitaxelu pomocou rastlinných bunkových kultúr <i>Taxus sp.</i> v Kórei a dovoz do iných krajín spoločnosťou Samyang Genex.
1998	Úradné schválenie používania semisyntetického paclitaxelu v kombinácii s cisplatinou na liečbu rozvinutého karcinómu vaječníkov v prvej línii liečby.
1999	Úradné schválenie používania semisyntetického paclitaxelu v kombinácii s cisplatinou na liečbu rakoviny pľúc u pacientov, ktorí nie sú vhodní kandidáti na operáciu alebo rádioterapiu.
2000	Zisk z predaja paclitaxelu dosiahol 1,6 miliardy USD.
2001	Patent na výrobu a predaj semisyntetického derivátu paclitaxelu docetaxelu (obchodný názov Taxotere, firma Sanofi-Aventis).
2005	Povolenie používania Abraxanu (paclitaxel naviazaný na albumín) na liečbu rakoviny prsníkov.
Súčasnosť	Produkcia paclitaxelu firmou Phyton pomocou explantátových kultúr <i>Taxus sp.</i>

rastlín *Taxus* bola už dlho známa, pripisovali ju hlavne taxínom, zmesi látok získanej z ich ihličia prvýkrát v roku 1856. Neskôr sa ukázalo, že taxíny sú zmesou siedmich alkaloidov a k toxicite tisu prispievajú nemalou mierou aj odlišné cytotoxické diterpénové taxány. Aj mnohé iné viac rozšírené rastliny sú bohaté na taxíny, ktoré môžu byť alternatívnymi štartovacími látkami pre semisyntézu paclitaxelu<sup>4</sup>.

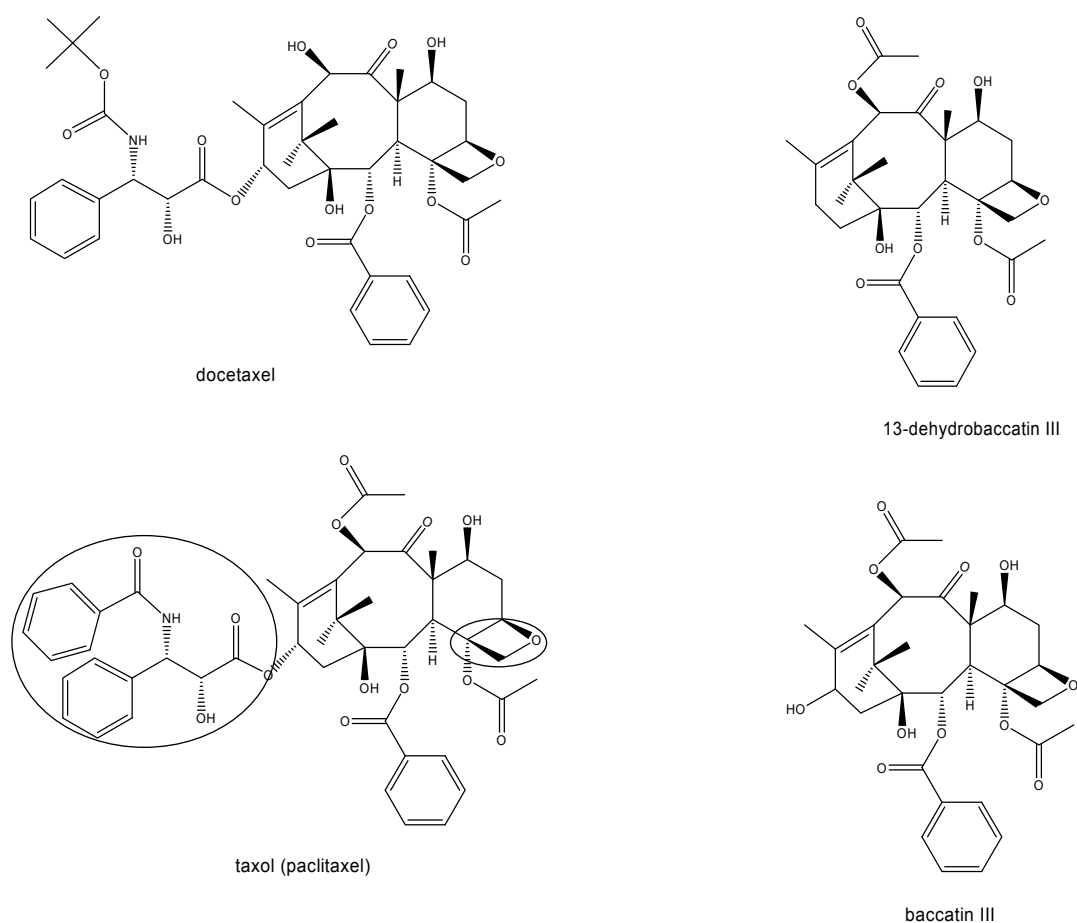
Najdôležitejšiou vlastnosťou taxánov je ich cytotoxický účinok. Touto vlastnosťou sa vyznačuje hlavný zástupca paclitaxel a niekoľko jeho prírodných i semisyntetických derivátov s postranným C-13 reťazcom v taxánovej molekule (docetaxel, 7-epitaxol alebo IDN 5109). Taxány sú v dnešnej dobe prototypom novej triedy chemoterapeutík. Ich biologická aktivita bola dokázaná už dávnejšie na viacerých modeloch rakovinových buniek: L1210, Walker 256, P 1534, P 388 a B 16 (cit.<sup>5</sup>).

Podaktoré taxány vykazujú antifungálnu aktivitu, sú schopné inhibovať rast niektorých parazitických húb, napr.

*Plasmodium falciparum*, alebo *Toxoplasma gondii*<sup>6</sup>. Taxány majú ďalej význam pri ochrane rastlín *Taxus sp.* pred patologickými zmenami koreňa spôsobenými fytopycétami *Pythium* a *Phytophthora*. Hoci rastú pri močiaroch a jazerách, veľmi zriedka trpia hnilobou koreňov<sup>7</sup>.

Schopnosť zastaviť rast nádorových buniek má niekoľko taxoidov. Sú vhodné a veľmi účinné najmä voči rakovine prsníkov a vaječníkov. Výskumy ukázali, že ich biologická aktivita sa prejavuje i na bunkách rakoviny hrdla (regresia tumoru 20–40 %), žalúdka a kože<sup>8,9</sup>. Dnes sa už úspešne aplikujú liečivé preparáty, ktoré obsahujú docetaxel (taxotere), semisyntetický člen taxánových zlúčenín. Efektívne pôsobí pri liečbe pacientiek s pokročilou (lokálnou i metastázovou) rakovinou prsníkov s účinnosťou 54–69 % v prvej línii monoterapie<sup>10</sup>. V štádiu výskumu je jeho použitie pri liečbe ďalších ochorení, napr. pokročilého štádia rakoviny žalúdka, hrubého čreva (HCT 116) alebo močových ciest<sup>11–13</sup>.

Prípravok TAXOL je indikovaný na liečbu nasledujú-



Obr. 1. Štruktúry najznámejších taxánov (paclitaxel a jeho za cytotoxicitu zodpovedný reťazec na 13. uhlíku a oxetánový kruh na 4. a 5. uhlíku)

cich ochorení:

- Karcinóm ovárií: aplikuje sa samostatne alebo v kombinácii s cisplatinou v pokročilom štádiu ochorenia. Pri sekundárnej liečbe sa používa na terapiu metastázujúceho karcinómu vaječníkov po zlyhaní štandardnej terapie.
- Karcinóm prsníkov: nasadzuje sa po zlyhaní štandardnej terapie alebo v adjuvantnej liečbe karcinómu prsníka s metastázami do uzlín po predchádzajúcej štandardnej kombinovanej terapii.
- Nemalobunkový karcinóm pľúc: využíva sa pri liečbe pacientov, u ktorých primárne nie je možné uskutočniť radikálny spôsob liečby (chirurgický výkon alebo ožiarenie).
- Kaposiho sarkóm: ide o sekundárnu terapiu u pacientov s AIDS<sup>14</sup>.

Z farmaceutického hľadiska významnými derivátmi paclitaxelu sú 7-epitaxol alebo derivát 14-hydroxy-10-deacetylbaaccatinu III označený ako IDN 5109, ktorý vykazuje vysokú účinnosť na bunky karcinómu vaječníkov

(modely 1A9, HOC 18), pričom spôsobuje 90–100% nádorovú regresiu. Navyše je zatiaľ jediným taxánom, ktorý by bol vhodný i na perorálnu aplikáciu<sup>9</sup>.

Protinádorové deriváty paclitaxelu sa môžu aplikovať buď ako jediná terapeutická zložka (monoterapia) alebo spolu s niektorými inými cytostatickými látkami, ako sú doxorubicín, vinblastín, vinkristín atď. Napríklad boli zaznamenané úspechy pri sledovaní inhibície rastu buniek rakoviny prostaty na modeloch LN Cap a PC-3, kedy sa použila kombinácia paclitaxelu so selénom<sup>15</sup>.

Paclitaxel má predpokladané terapeutické využitie aj pri liečbe psoriázy, reumatoidnej artritídy, Alzheimerovej choroby ako aj pri liečbe polycystickej autozomálnej choroby obličiek. Okrem uvedených aktivít sú známe aj jeho antiproliferačné a protizápalové vlastnosti. Štyri taxánové zlúčeniny izolované z *Taxus baccata L.* taxusin, baccatin VI, baccatin III a 1-hydroxybaccatin I majú protizápalovú a antinociceptívnu aktivitu<sup>16</sup>. Chemické vzorce najznámejších taxánov sú uvedené na obr. 1.

## 2.2. Mechanizmus účinku taxánových zlúčenín

V roku 1979 Fuchs a Johnson popísali biologicky aktívne taxány ako látky pôsobiace antimitoticky na bunky<sup>17</sup> a v tom istom roku Horwitz objasnil, že napomáhajú ireverzibilnému zhlukovaniu tubulínu, ktorý je súčasťou mikrotubulov<sup>18</sup>.

Chemická štruktúra jednotlivých taxánov zodpovedá za ich, či už väčšiu alebo menšiu, biologickú účinnosť. Dokázalo sa, že je to predovšetkým oxetánový kruh a postranný reťazec na C-13 (obr. 1), ktoré sú nevyhnutné pre zabezpečenie ich cytotoxicity. Oxetánový kruh je nielen akceptorom protónov, ale zaisťuje aj pružnosť tetra-cyklického jadra taxánového skeletu, čím sú taxány schopné zapojiť do reakcie s proteínmi bočné reťazce v polohách C-2, C-4 a C-13 (cit.<sup>19</sup>).

Mikrotubuly sú vnútrobunkové polymérne útvary, ktorých dynamika má rozhodujúcu úlohu v tvorbe mitotického vretienka, pri kontrole mitózy a v pohybe chromozómov. Predpokladá sa schopnosť paclitaxelu potlačiť dynamiku mikrotubúl a tým inhibovať mitózu v bunkovom cykle, čiže aj proliferáciu. Zistené to bolo na dvoch druhoch ľudských nádorových buniek, konkrétne vaječnickových Caov-3 a obličkových A-498. Mitotické vretienko bolo abnormálne u 30 % buniek Caov-3 z celkového počtu a až 58 % v prípade A-498 buniek po aplikácii paclitaxelu<sup>20</sup>.

Biologická aktivita taxánov spočíva v schopnosti navzájom pútať tubulínové vlákna a iniciovať koaguláciu mikrotubulov, čo znemožňuje ich depolymerizáciu späť na tubulín. Tak vznikajú nefunkčné, abnormálne proteínové štruktúry, ktoré zapríčinia zastavenie bunkového cyklu v G<sub>2</sub>/M fáze, čo inhibuje rast nádorových buniek. Paclitaxel je jedným z mála zlúčenín, ktoré sa vyznačujú takýmto cytotoxickým účinkom<sup>21</sup>.

## 2.3. Formy aplikácie taxánov v liečbe

Pri vývoji a výrobe liečiv na báze taxánov sa stretávajú s dvoma vážnymi problémami. V prvom rade je to ich veľmi slabá rozpustnosť vo vode (približne 4 µg ml<sup>-1</sup>), čo spôsobuje značné ťažkosti s aplikáciou pacientom pri liečbe. Druhým problémom je vyčerpatelnosť prírodného zdroja, nízke výťažky a vysoká náročnosť prípravy v purifikovanej forme vyhovujúcej klinickým potrebám<sup>5</sup>. Taxány používané v medicíne sú 3 až 10× menej rozpustné ako iné látky s podobným účinkom (doxorubicín, daunorubicín). Pretože ich funkčné skupiny sú ionizované v rozmedzí hodnôt pH nevhodných pre farmaceutické použitie, zmenou pH sa rozpustnosť nezmení. Výskumy zamerané na zvyšovanie solubility zahŕňali aplikácie rôznych komplexov (kladne alebo záporne nabitých), prípravu ich solí, atď. Pozitívnejšie výsledky priniesli pokusy chemicky modifikovať polohy C-2 a C-7, čím vznikli syntetické deriváty taxánov nazývané ako „prodrugs“. Takéto zlúčeniny už mali dostatočnú rozpustnosť a tým primerané farmaceutické vlastnosti, vyhovujúce prísnyim požiadav-

kám na použitie v humánnej medicíne. Tieto deriváty nevykazovali biologickú aktivitu, avšak po aplikácii do organizmu sa hydrolyzovali za vzniku pôvodného účinného taxánu<sup>22</sup>. Skúma sa ďalej naviazanie xylozylových, glukozylpyranozylových, sukcinátových, glutarátových zvyškov, prípadne ich esterov a solí, niektorých aminokyselín v polohe C'-2. Veľká pozornosť sa venuje v dnešnej dobe konjugátu kyseliny glutámovej s paclitaxelom v polohe C-2 (paclitaxel poliglumex, nazývaný tiež XYOTAX). Je to inaktívny, dostatočne rozpustný komplex, paclitaxel sa z neho uvoľňuje po pôsobení proteázy katepsínu B, ktorá sa vo väčšej miere nachádza v rakovinových bunkách a tým je zaručený účinok paclitaxelu len na nádorové bunky<sup>23</sup>.

Druhá generácia taxoidov bola pripravená systematickou modifikáciou na C-2, C-10 a C-3'N pozíciách a bol študovaný vzťah ich štruktúry a biologickej aktivity. Vyvíjanie taxánov s lepšími farmakologickými vlastnosťami a zvýšenie aktivity špeciálne proti rakovine rezistentnej na terapeutiká viedol k vývoju tretej generácie taxoidov. Niektoré taxoidy tretej generácie prejavujú excelentnú toxicitu voči línii pankreatických buniek expresiou „multidrug“ rezistentných génov<sup>24,25</sup>.

V súčasnosti sa tiež študujú nanočastice s enkapsulovaným paclitaxelom samotným a enkapsulovaným paclitaxelom spolu s inhibítorom P-glykoproteínu (P-gp), kľúčovým faktorom rezistencie na nádorové liečivá<sup>26</sup>.

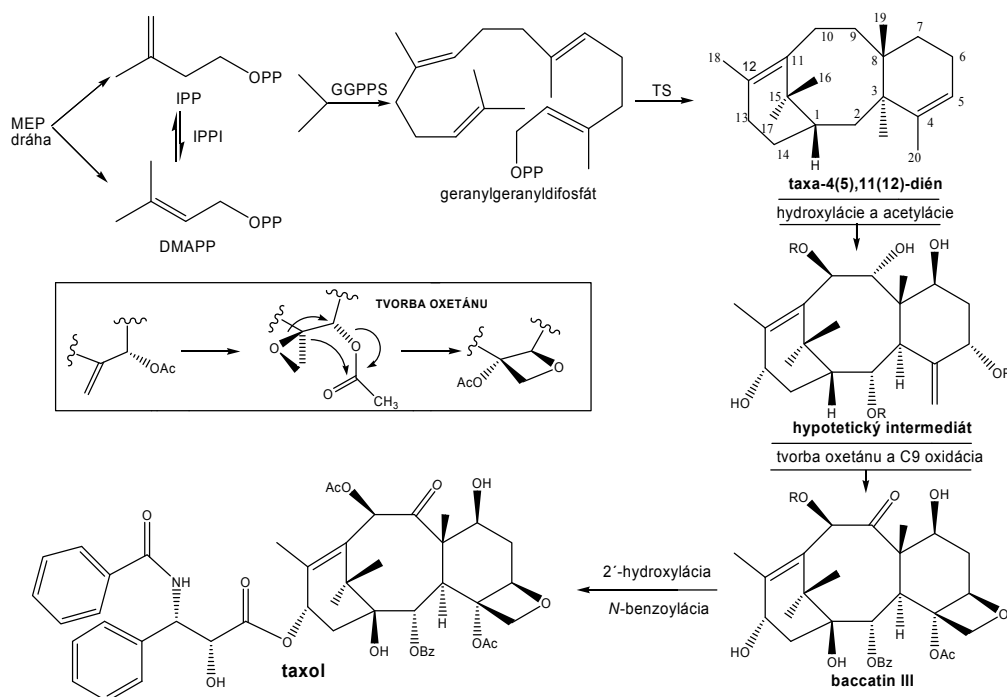
Ďalej sa výskum zamerával na iné látky (prípadne ich zmesi), ktorých prítomnosť v preparáte by zvýšila hydrofilnosť taxánov (etanol, dimetylsulfoxid, Tween 80, karboxymetylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, polyetylén-glykol, lecitín, polyoxyetylovaný ricínový olej – Cremofor EL). Nakoniec sa ako najvhodnejší pre klinický vývoj ukázal polyoxyetylovaný ricínový olej (50%) a dehydrátovaný alkohol s koncentráciou účinného taxánu 6 mg ml<sup>-1</sup>. Bežné balenie vyvinutého preparátu obsahuje 5 ml tejto zmesi. Pri aplikácii je liek 5 až 20× zriedený fyziologickým roztokom alebo 5% roztokom dextrózy, takže koncentrácia účinnej látky je 1,2–0,3 mg ml<sup>-1</sup>. Nemenej významnú úlohu zohrávajú i fosfolipidové nosiče taxánových liečiv, lipozómy. Biologicky aktívny taxán, ktorý je inkorporovaný do lipozómov, penetruje do nepolárnej časti lipidickej dvojvrstvy<sup>27</sup>.

Nedávno bol vyvinutý biodegradovateľný polymérny systém na báze poly-(kyselina sebaková – kyselina ricínolejová) na prenos paclitaxelu priamo do miesta proliferácie. Takto zavedený paclitaxel do polyméru a injektovaný do vnútra nádora bol efektívny v liečbe lokalizovaných nádorov<sup>28</sup>.

## 3. Tvorba a získavanie taxánov z prírodných a alternatívnych zdrojov

### 3.1. Biosyntéza

Dve základné metabolické cesty sú známe pre biosyntézu izoprenoidov a to mevalonátová a ne-mevalonátová

Obr. 2. Schéma biosyntézy paclitaxelu<sup>29</sup>

dráha. Prvým prekuzorom mevalonátovej dráhy je acetát aktivovaný ako acetylkoenzým A. Dve následné kondenzácie vytvárajú acetoacetyl-CoA a 3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzým A (HMG CoA), ktorý je potom redukovaný na mevalonát. Reakcia je katalyzovaná HMG-CoA-reduktázou. Dve ďalšie fosforylácie mevalonátu nasledované dekarboxyláciou za účasti ATP vedú k vzniku izopentenylfosfátu, pre ktorý je charakteristický päťuhlíkatý reťazec všetkých izoprenoidov. Nemevalonátová dráha je rozšírená v baktériách a vyšších rastlinách. Reakciu pyruvátu a glyceraldehyd-3-fosfátu cez sériu katalytických krokov vznikne izopentenylidifosfát (IPP). Za kľúčový prekuzor izoprenoidov je teda považovaný IPP a nie mevalonát. IPP vystupuje ako prekuzor izoprenoidov tak u organizmov obsahujúcich mevalonátovú, ako aj glyceraldehyd-pyruvátovú dráhu. Z IPP ďalej vzniká geranylgeranylidifosfát (GGPP), prekuzor protirakovinových taxoidných liečiv<sup>29</sup>. Na objasnenie celej biosyntézy sa použilo náhodné sekvenovanie cDNA knižnice buniek *Taxus cuspidata*, v ktorých bola biosyntéza taxánov indukovaná metyljasmonátom<sup>30</sup>. Kľúčovým krokom biosyntézy je zacyklenie univerzálneho prekuzora GGPP na taxa-4, (5),11(12)-dién (obr. 2). Reakciu katalyzuje enzým taxadiénsyntáza. Z hľadiska stereochemie mechanizmus tohto kroku spočíva v tom, že GGPP sa uzatvára do cyklickej formy za vzniku prechodného verticilénového intermediátu, nasleduje transfer  $\alpha$ -protónu z polohy C-11 na C-7, čo iniciuje vznik B/C kruhu (vytvorená zlúčenina je taxanylovy kation). Nasleduje deprotonizácia na C-5 (cit.<sup>31</sup>). Bol

zaznamenaný vysoký stupeň expície génu pre taxadiénsyntázu (TS). Aj napriek značnému množstvu enzýmu TS (jeho koncentrácia je najvyššou zo všetkých enzýmov biosyntézy taxánov), cykлизácia GGPP je pomalý krok tvorby taxánov. V ďalšom formovaní molekuly taxánov zohrávajú dôležitú úlohu cytochróm P450 oxygenázy. Príslušné oxygenácie zahŕňajú takmer polovičný počet reakcií taxánovej biosyntetickej dráhy. Katalyzuje ich skupina enzýmov, ktorá v *Taxus cuspidata* obsahuje 2 $\alpha$ -, 5 $\alpha$ -, 7 $\beta$ -, 10 $\beta$ -, 13 $\alpha$ - a 14 $\alpha$ -hydroxylázy<sup>32</sup>. Acylácia hydroxylových skupín patrí do ďalšej série úprav postranných reťazcov taxánov. CoA dependné acyl- a aryl-transferázy sú tiež dôležitou súčasťou biosyntézy paclitaxelu. Katalyzujú 5 z 19 krokov dráhy tvorby taxánov<sup>33</sup>. Je známy veľký počet taxánov, ktoré sa líšia polohou hydroxylov na taxánovom jadre a tiež typom acylu alebo arylu. Rekombinantné transferázy umožnili počiatočnú acetyláciu na C-5 taxánového jadra, následne benzoyláciu na C-2, acetyláciu na C-10. N-benzoylácia na C-13 prebieha pomocou fenylalanínaminomutázy. Otvárajúce úpravy reťazca pozostávajú z C-1 a C-9 hydroxylácie, C-4 a C-20 epoxidácie. Tieto úpravy vedú k vzniku baccatinu III (obr. 2, cit.<sup>34</sup>).

### 3.2. Izolácia z rastlinného materiálu

Taxány možno získať priamou izoláciou z rastlinného materiálu, čo je však najmä z ekologického hľadiska nepri-

puštné, pretože dochádza k ničeniu vzácnych tisových stromov. Získanie 2 g čistého paclitaxelu vyžaduje vyhubenie približne 12 veľkých stromov tisu a stojí 10 000 USD (cit.<sup>35</sup>). Výťažky taxánov získaných týmto procesom sú veľmi nízke, pohybujú sa v rozmedzí 100–300 ppm purifikovanej látky vzhľadom na hmotnosť suchého floému. Taxány sa extrahujú tiež z ihličiek *Taxus sp.*, kde ich obsah je vyšší, do 500 ppm hmotnosti suchého ihličia pre cephalomanin a baccatin III, do 480 ppm hmotnosti suchých ihličiek pre brevifoliol a 10-deacetyl-baccatin III. Problém spojený s izoláciou z pletív predstavuje i fakt, že zastúpenie taxánov počas jednotlivých ročných období u toho istého druhu sa značne mení<sup>36</sup>.

*Taxus sp.* môžeme najčastejšie nájsť na území Severnej Ameriky a Euroázie, ide o veľa vzácnych druhov. Vo všeobecnosti sa tieto ihličnaté stromy vyskytujú vo vlhkom prostredí pralesov severnej hemisféry, ale rastú tiež v subtropickom a tropickom pásme na juhu a juhovýchode Ázie a Strednej Ameriky, aj na južnej pologuli na ostrovoch Sumatra a Celebes.

Podľa geografickej lokality rozoznávame niekoľko prirodzených sa vyskytujúcich druhov:

- *Taxus brevifolia* rastie v západnej časti Kanady a USA,
- *Taxus globosa* sa vyskytuje v Mexiku, El Salvadore, Hondurase a Guatemale,
- *Taxus floridana* je endemickým ihličnanom na severe Floridy,
- *Taxus canadensis* je rozšírený od Newfoundlandu až k Manitobe a od Iowy k Severnej Karolíne,
- *Taxus baccata* má domov v Európe a na severe Afriky,
- *Taxus cuspidata* je typickou rastlinou v Číne, Japonsku, Kórei,
- *Taxus wallichiana* rastie vo východnom Afganistane, Tibete, Číne.

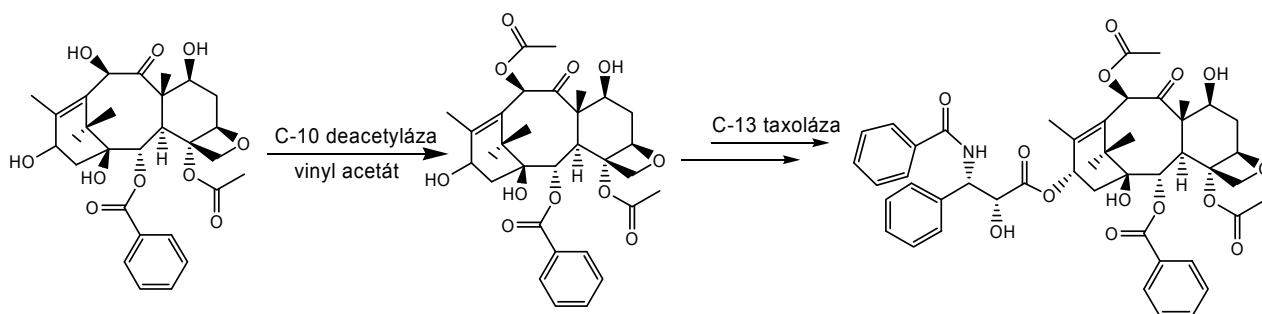
Z ďalších druhov možno spomenúť *Taxus chinensis*, *Taxus celebica*, *Taxus x media*, *Taxus yunnanensis*, *Taxus maire* a *Taxus sumatrana*<sup>37</sup>. Na zastúpenie jednotlivých taxánov v ihličnanoch majú vplyv okrem geografickej lokality i ekologické a poľnohospodárske faktory aj podmienky skladovania. V experimente, ktorý uskutoč-

nil van Rozendaal a spol. v roku 2000, bolo analyzované ihličie niekoľkých druhov a kultivarov tisu metódou HPLC. Sledovali prítomnosť paclitaxelu, 10-deacetyl-paclitaxelu, cefalomanínu, baccatinu III, 10-deacetyl-baccatinu III a brevifoliolu. Z piatich rôznych lokalít v Holandsku a vo Veľkej Británii bolo odobratých okolo 750 rôznych vzoriek. Výsledky skriningu ukázali veľkú variabilitu v obsahu taxánov medzi rôznymi druhmi a kultivarmi. Obsah paclitaxelu a 10-deacetyl-baccatinu III sa pohyboval v rozmedzí 0–500 ppm a 0–480 ppm hmotnosti suchého ihličia. Brevifoliol sa vo vysokej koncentrácii našiel u *Taxus brevifolia*. 10-deacetylpaclitaxel, cefalomanín a baccatin III sa vyskytovali v koncentráciách v rozsahu 0–500 ppm hmotnosti suchého ihličia. Obsah paclitaxelu je najviac 100 ppm v suchom ihličí. Storočný strom tisu obsahuje okolo 300 mg tejto zlúčeniny<sup>36</sup>. Ďalším primárnym zdrojom taxánov je cyprus *Taxodium distichum*, pre ktorý je typické podobné prostredie ako pre *Taxus sp.* Ide taktiež o neopadávy ihličnan s lineárnym dvojradom ihličiek, ktorý preferuje vlhké podnebie. Má výšku 30–40 m a je charakteristickou drevinou v oblasti močiarov na juhovýchode USA<sup>35</sup>.

### 3.3. Semisyntéza

Semisyntéza je v súčasnosti jedným z hlavných postupov, ktorými sa pripravujú taxány. Tento proces zahŕňa limitované množstvo syntetických krokov (napr. pripojenie C-13 postranného reťazca) potrebných na konverziu taxánových intermediátov extrahovaných z rastlinných pletív *Taxus sp.* na 10-deacetyl-baccatin III. Táto zlúčenina je potom použitá na prípravu finálnych taxánových produktov ďalšími úpravami jej postranných reťazcov za vzniku želáných produktov. Vo farmaceutickej výrobe paclitaxelu zatiaľ prevláda chemicko-organický spôsob pripájania postranných reťazcov na základný taxánový skelet aj napriek tomu, že sú známe biologické produkčné systémy, čo je pravdepodobne dané ekonomickým hľadiskom.

Medzi príklady firiem používajúcich biologický systém patrí spoločnosť Bristol-Myers Squibb. Ide o kmeň



Obr. 3. Enzymová konverzia 10-deacetyl-baccatinu III cez baccatin III na paclitaxel<sup>38</sup>



Tabuľka II

Produkcia taxánov rôznymi bunkovými kultúrami *Taxus* sp. za rôznych kultivačných podmienok, baničkové kultivácie<sup>43</sup>

Druh	Taxán	Produkcia [mg l <sup>-1</sup> ]	Stratégia kultivácie
<i>Taxus canadensis</i>	paclitaxel	117	elicitácia metyljasmonátom
	celkové taxány	506	
<i>Taxus media</i>	paclitaxel	110,3	elicitácia metyljasmonátom
	celkové taxány	145,3	
<i>Taxus chinensis</i>	paclitaxel	153	optimalizácia média, elicitácia, dovojpasážová kultivácia
	celkové taxány	295	
	paclitaxel	67	prerušené prítokovanie maltózy
	paclitaxel	78,5	regulácia osmotického tlaku
	paclitaxel	49,6	elicitácia AgNO <sub>3</sub>
	taxuyunnanin C	885,9	
	paclitaxel	82,4	elicitácia AgNO <sub>3</sub> a teplotný posun
	taxuyunnanin C	512,9	
	paclitaxel	137,5	elicitácia AgNO <sub>3</sub> a teplotný posun
	taxuyunnanin C	274,4	prítokovanie sacharózy
	taxuyunnanin C	527	elicitácia metyljasmonátom a teplotný posun

Tabuľka III

Produkcia taxánov rôznymi bunkovými kultúrami *Taxus* sp. za rôznych kultivačných podmienok, kultivácie v bioreaktoroch<sup>43</sup>

Druh	Taxán	Produkcia [mg l <sup>-1</sup> ]	Stratégia kultivácie
<i>Taxus cuspidata</i>	Paclitaxel	22	kinetická štúdia
	Celkové taxány	74	prítokované médium
<i>Taxus chinensis</i>	Taxuyunn-anin C	229	prídavok etylénu
	Taxuyunn-anin C	336	elicitácia metyljasmonátom, prítokovanie sacharózy, pridávanie etylénu
	Taxuyunn-anin C	612	opakovaná elicitácia metyljasmonátom, pridávanie sacharózy
<i>Taxus media</i>	Paclitaxel	21,1	použitie prekurzorov metyljasmonátu,
	Baccatin III	56	dve pasáže

*Nocardia lutenis*, realizujúci biotransformáciu 10-deacetyl-baccatinu III na baccatin III (obr. 3, cit.<sup>38</sup>). Ďalšia konverzia baccatinu III na paclitaxel prebieha vo výrobe chemickou syntézou. V literatúre sú popísané aj enzýmy, ktoré nahrádzajú chemickú katalýzu 10-deacetyl-baccatinu III na paclitaxel. Sú to C-13 taxoláza, C-10 deacetyláza. Enzýmy sa získavajú pomocou mikroorganizmov, napr. *Nocardioides albus*, *Moraxella* sp.<sup>38</sup>.

Bola zistená aj biotransformácia taxánov produkovaných *Taxomyces andreanae*, ktorá zahŕňa hydroxyláciu, deacetyláciu, hydrolyzu, epimerizáciu, a to viacerými hubami napr. *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegans*, *Absidia coerulea*, *Microsphaeropsis onychiuri*, *Mucor* sp., *Alternaria alternata* a *Aspergillus niger*<sup>39</sup>. Napriek tomu, že proces semisyntézy je efektívny, purifikácia prekurzorov z rastlinného pletiva je náročná a zdĺhavá

vďaka veľkému množstvu fenolických, lipidických a ďalších kontaminantov vyskytujúcich sa v rastlinách. Nevýhodou pri extrakcii prekurzorov biosyntézy taxánov z rastlinného materiálu je aj variabilita obsahu taxánov v závislosti od epigenetických a environmentálnych faktorov, ako aj pomalý rast *Taxus* sp.<sup>40</sup>.

### 3.4. Chemická syntéza

Keďže taxány sú pomerne zložité štruktúry, totálna syntéza predstavuje finančne veľmi náročnú cestu ich prípravy, a preto je nevýhodná. Napriek tomu už boli navrhnuté všetky kroky syntézy, ktorej princípom je konvergentná stratégia, čím sa otvorila nová možnosť výroby taxánov<sup>41</sup>.

## 3.5. Biotechnologická produkcia

Biotechnologický proces prípravy taxánov je založený na kultivačných postupoch s rastlinnými bunkovými kultúrami alebo na mikrobiálnom princípe, kde sa môžu uplatniť i metódy génového inžinierstva, prípadne nahradenie niektorého kroku tvorby produktu chemickými syntézami alebo aplikáciou enzýmov. Väčšina takýchto procesov je v ďalšom štádiu výskumu, postupne sa však predpokladá aj ich využitie v priemysle.

*Využitie explantátových kultúr*

Taxánové metabolity sú izolované z podkôry ihličnana procesom, ktorý rastliny ničí. *Taxus* sp. nie je bežnou drevinou a rastie veľmi pomaly. Jednou z alternatív, čo rieši tento problém, je kultivácia rastlinných buniek rôznych línií schopných produkovať väčšie množstvá taxánových sekundárnych metabolitov v závislosti od zloženia kultivačného média<sup>4</sup>. Rastlinné bunkové a pletivové kultú-

ry nazývané explantáty z intaktných rastlín sa získavajú selekciou a izoláciou živých rastlinných pletív. Prostredie pre explantáty je prísne kontrolované, sú dodržiavané striktné aseptické podmienky, dôležité je zloženie média a fyzikálne faktory (teplota, svetlo, vlhkosť). Pre bunkové kultúry *Taxus* sp. sú už vyvinuté techniky využívajúce diferencované aj nediferencované bunky. Kalusové kultúry boli úspešne vytvorené z kôry, mladých kmeňov a z ihličia rôznych druhov *Taxus*. Pojem kalus predstavuje neorganizovanú, množiacu sa masu nediferencovaných buniek. Prenosom kalusov do vhodného tekutého živného média sa dajú vytvoriť bunkové suspenzie. Suspenzné kultúry sú výhodné, pretože v takomto systéme sa ľahšie ovplyvňujú podmienky rastu a produkcie látok<sup>5</sup>. Na syntézu taxánov sa využívajú rovnako aj diferencované bunkové kultúry obsahujúce organizované pletivá, v ktorých sú zachované interakcie medzi bunkami, pletivami a orgánmi, podobné tým v intaktných rastlinách. Diferencované bunkové kultúry môžu byť výhodné z hľadiska tvorby sekundárnych metabolitov, pretože tu existuje predpoklad zachovania dočasnej schopnosti priestorovej expresie génov, esenciál-

Tabuľka IV

Mikroorganizmy produkujúce taxány

Metabolit	Produkčný mikroorganizmus	Hostiteľský organizmus	
Taxány	<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i> <sup>44</sup>	
	<i>Pestalotiopsis quepinii</i>	<i>Wollemia nobilis</i> <sup>45</sup>	
	<i>Pestalotia heterocornis</i>	<i>Taxus</i> sp. <sup>45</sup>	
	<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Taxus</i> sp. <sup>19</sup>	
	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Taxus</i> sp. <sup>44</sup>	
	<i>Pestalotia bicilia</i>	<i>Taxus</i> sp. <sup>19</sup>	
	<i>Pithomyces</i> sp.	<i>Taxus</i> sp. <sup>19</sup>	
	Paclitaxel	<i>Sporormia minima</i>	<i>Taxus</i> sp. <sup>19</sup>
		<i>Trichothecium</i> sp.	<i>Taxus</i> sp. <sup>19</sup>
		<i>Tubercularia</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> <sup>17,46</sup>
<i>Mucor rouxianus</i>		<i>Taxus chinensis</i> <sup>49</sup>	
<i>Monochaetia</i> sp.		<i>Taxus</i> sp. <sup>19</sup>	
<i>Nodulisporium sylviforme</i>		<i>Taxus brevifolia</i> <sup>48</sup>	
<i>Seimatoantlerium tepuiense</i>		<i>Maguireothamnus Speciosus</i> <sup>46</sup>	
<i>Sporormia minima</i>		<i>Taxus</i> sp. <sup>46</sup>	
<i>Trichothecium</i> sp.		<i>Taxus wallichiana</i> <sup>46</sup>	
<i>Corylus avellana</i>		<i>Taxus wallichiana</i> <sup>46</sup>	
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus wallichiana</i> <sup>35</sup>		
<i>Ozonium</i> sp.	<i>Taxus chinensis</i>		
<i>Fusarium mairei</i>	<i>Taxus yunnanensis</i> <sup>47</sup>		
<i>Pestalotiopsis terminaliae</i>	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>Mairei</i> <sup>50</sup>		
<i>Nodulisporium sylviform</i>	<i>Terminalia arjuna</i> <sup>51</sup>		
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	<i>Taxus</i> sp. <sup>52</sup>		
<i>Fusarium solani</i>	<i>Citrus medica</i> <sup>53</sup>		
<i>Phyllosticta tabernaemontanae</i>	<i>Taxus celebica</i> <sup>54</sup>		
<i>Chaetomella raphigera</i>	<i>Wrightia tinctoria</i> <sup>55</sup>		
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	<i>Terminalia arjuna</i> <sup>56</sup>		
<i>Aspergillus fumigates</i>	<i>Cardiospermum helicacabum</i> <sup>57</sup>		
	<i>Podocarpus</i> <sup>58</sup>		

nych pre syntézu žiadaných látok<sup>42</sup>. Príklady produkcie taxánov explantátovými kultúrami *Taxus* sp. v baničkách, resp. v bioreaktoroch sú uvedené v tab. II a tab. III.

#### Mikrobiálna príprava taxánov

Dôkaz, že aj iný organizmus ako bunky *Taxus* sp. dokáže produkovať taxány, bol uskutočnený u mikroorganizmu *Taxomyces andreanae*, endofytickej huby, izolovanej z floému *Taxus brevifolia*. Huba patrí do triedy *Hyphomycetes* (pododdelenie *Deuteromycotina*) a je schopná syntetizovať taxánové metabolity kultiváciou na semisynetickom kvapalnom médiu. Výťažky boli pôvodne veľmi malé, 25–50 ng l<sup>-1</sup> (cit.<sup>44</sup>).

Súčasná poznatky naznačujú možnosť horizontálneho transferu génov zodpovedajúcich za tvorbu taxánov, ku ktorému môže dochádzať medzi jednotlivými druhmi *Taxus* sp. i medzi nimi a hosťujúcimi endofytmi. Prenos genetickej informácie súvisí pravdepodobne s tým, že niektoré mikroorganizmy rastlín *Taxus* sp. tvoria taxány, aby mohli prežiť v pletivách týchto ihličnanov<sup>35</sup>. Jednoznačným dôkazom tohoto tvrdenia bolo objavenie endofytu *Pestalotiopsis microspora*. Bol potvrdený jeho výskyt v istom druhu *Taxus*, z ktorého bol získaný aj produkčný kmeň *Taxomyces andreanae*. Rod *Pestalotiopsis* je zrejme geneticky veľmi flexibilná skupina mikroorganizmov. Je to evidentné tak zo značnej variabilnosti v tvorbe produktov, ako aj z ich kultivačných charakteristík<sup>7</sup>. Okrem uvedených mikroorganizmov ako producentov taxánov je už známych viacero ďalších, ktorých prehľad obsahuje tab. IV.

#### 4. Záver

Rastliny produkujú široké spektrum chemických látok, ktoré majú veľký ekonomický význam. Známých je takmer sto tisíc zlúčenín rastlinného pôvodu, pričom najväčšiu skupinu tvoria terpenoidy zahŕňajúc viac ako jednu tretinu všetkých poznaných látok. Najúspešnejšie prírodné liečivá s protinádorovým účinkom posledných rokov sú rastlinné fytochemikálie paclitaxel a kamptotecín. Objemovo produkcia týchto rastlinných látok pre farmaceutický priemysel je nízka. Ide o kilogramové až sto kilogramové množstvá. Cena týchto produktov nie je stála, závisí od rôznych činiteľov, ako sú klimatické i pestovateľské podmienky a je veľmi vysoká. To vedie k zvýšenému záujmu vyvíjať biotechnologické procesy pre priemyselnú produkciu týchto liečiv. Existujú viaceré možnosti pre biotechnologickú produkciu konkrétne explantátové kultúry rastlín, transgénné mikroorganizmy a endofytické a epifytické mikroorganizmy. Možnosť riešiť produkciu bioaktívnych látok rastlín mikroorganizmami je zvlášť perspektívna, nakoľko kultivácia mikroorganizmov je jednoduchšia a výhodnejšia v porovnaní s pestovaním vyšších rastlín, resp. s využitím explantátových kultúr alebo chemickej semisyntézy, ktorá zatiaľ dominuje v priemyselnom merítku.

*Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja SR v rámci projektu Zmluvy č. APVV-20-014105 a Grantovou agentúrou VEGA 1/0747/08.*

#### LITERATÚRA

1. Yuan H., Miao J., Du Y., You J., Hu F., Zeng S.: Int. J. Pharm. 348, 137 (2008).
2. Singla A. K., Garg A., Aggar W.: Int. J. Pharm. 235, 179 (2001).
3. Tabata H.: Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 7, 1 (2004).
4. Theodoridis G., Laskaris G., Jong C. F., Hofte A. P. J., Verpoorte R.: J. Chromatogr. 802, 297 (1998).
5. Ramesh N. P.: Ann. Rev. Microbiol. 98, 361 (1998).
6. Estes R., Vogel N., Mack D., McLeod R.: Antimicrob. Agents Chemother. 8, 2036 (1998).
7. Li J., Stobel G., Sidhu R., Hess W. M., Ford E. J.: Microbiology 142, 2223 (1996).
8. Schrijvers D., Vermorken J. B.: Oncology 5, 199 (2000).
9. Nicoletti M. I., Colombo T., Rossi C., Monardo C., Stura S., Zucchetti M., Riva A., Morazzoni P., Donati M. B., Bombardeli E., D'incalci M., Giavazzi R.: Cancer Res. 60, 842 (2000).
10. Figgitt D. P., Wiseman L. R.: Drugs 59, 621 (2000).
11. Miller V. A., Kris M. G.: Semin. Oncol. 27, 3 (2000).
12. Yang L. X., Wang H. J., Holton R. A.: Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 46, 159 (2000).
13. Bajorin D. F.: Oncology 14, 43 (2000).
14. <http://www.bristol-myers-squibb.cz>, stiahnuté 8.2.2008.
15. Vadgama J. V., Wu Y., Shen D., Hsia S., Block J.: Anticancer. Res. 20, 1391 (2000).
16. Küpeli E., Erdemoglu N., Yesilada E., Sener B.: J. Ethnopharmacol. 89, 265 (2003).
17. Fuchs D. A., Johnson, R. K.: Cancer Treat. Rep. 62, 1219 (1978).
18. Kingston D. G. I.: J. Nat. Prod. 63, 726 (2000).
19. Wang M., Cornett B., Nettles J., Liotta D. C., Snyder J. P.: J. Org. Chem. 65, 1059 (2000).
20. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.: *Molecular Biology of The Cells*. New York & London, Garland Publishing, Inc. 1983.
21. Sharma S., Ganesh T., Kingston D. G. I., Bane S.: Anal. Biochem. 360, 56 (2007).
22. Shimoda K., Hamada H., Hamada H.: Tetrahedron Lett. 49, 601 (2008).
23. Shaffer S. A., Baker-Lee C., Kennedy J., Shun Lai M., de Vries P., Buhler K., Singer J. W.: Cancer Chemother. Pharmacol. 59, 37 (2007).
24. Ojima I., Das M.: J. Nat. Prod. 72, 554 (2009).
25. Ojima I., Chen J., Sun L., Borella C. P., Wang T., Miller M. L., Lin S., Geng X., Kuznetsova L., Qu C., Gallager D., Zhao X., Zanardi I., Xia S., Horwitz S. B., Mallen-St Clair J., Guerriero J. L., Bar-Sagi D., Veith J. M., Pera P., Bernacki R. J.: J. Med. Chem. 51, 3203 (2008).

26. Patil Y., Sadhukha T., Ma L., Panyam J.: *J. Controlled Release* 136, 21 (2009).
27. Guo W., Johnson J. L., Khan S., Ahmad A., Ahmad I.: *Anal. Biochem.* 336, 213 (2005).
28. Shikanov A., Vaisman B., Shikanov S., Domb A. J.: *J. Biomed. Mater. Res. A.*, v tisku. DOI: 10.1002/jbm.a.32429 (2009).
29. Jennewein S., Wildung M. R., Chau M., Walker K., Croteau R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9149 (2004).
30. Croteau R., Ketchum R. E. B., Long R. M., Wildung K. R., Wildung M. R.: *Phytochem. Rev.* 5, 75 (2006).
31. Williams D. C., Wildung M. R., Jin A. Q., Dalal D., Oliver J. S., Coates R. M., Croteau R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 137 (2000).
32. Chau M., Croteau R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 427, 48 (2004).
33. Fang J., Ewald D.: *Protein Expression Purif.* 35, 17 (2004).
34. Nims E., Dubois C. P., Roberts S. C., Walker E. L.: *Metab. Eng.* 8, 385 (2006).
35. Strobel G., Yang X., Sears J., Kramer R., Sidhu R. S., Hess W. M.: *Microbiology* 142, 435 (1996).
36. van Rozendaal E. L., Lelyveld G. P., van Beck T. A.: *Phytochemistry* 53, 383 (2000).
37. Bala S., Uniyal G. C., Chattopadhyay S. K., Tripathi V., Sashidhara K. V., Kulshrestha M., Sharma R. P., Jain S. P., Kukreja A. K., Kumar S.: *J. Chromatogr.* 858, 239 (1999).
38. Zaks A.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 130 (2001).
39. Shen Y., Lo K. L., Lin C. L., Chakraborty R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 4493 (2003).
40. Ketchum R. E. B., Croteau R.: *Biotechnol. Bioeng.* 62, 97 (1998).
41. Ganesh T., Norris A., Sharma S., Bane S., Alcaraz A. A., Snyder, J. P., Kingstona D. G. I.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 3447 (2006).
42. Fett-Neto A. G., Zhang W. Y., DiCosmo F.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 966 (1994).
43. Zhong J. J.: *J. Biosci. Bioeng.* 94, 591(2002).
44. Stierle A., Strobel G., Stierle D.: *Science* 260, 214 (1993).
45. Noh M. J., Yang J. G., Kim K. S., Yoon Y. M., Kang K. A., Shim S. B., Park H. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 64, 620 (1999).
46. Strobel G., Daisy B.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, 491.
47. Guo B. H., Kai G. Y., Jin H. B., Tang K. X.: *Afr. J. Biotechnol.* 5, 15 (2006).
48. Yuan J., Jian-Nan B., Bing Y., Xu-Dong Z.: *Chin. J. Biotechnol.* 22, 1 (2006).
49. Miao Z., Wang Y., Yu X., Guo B., Tang K.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 45, 92 (2009).
50. Li Y. C., Tao W. Y., Cheng L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 233 (2009).
51. Gangadevi V., Muthumary J.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 52, 9 (2009).
52. Zhao K., Ping W., Zhang L., Liu J., Lin Y., Jin T., Zhou D.: *Sci. China C. Life Sci.* 51, 222 (2008).
53. Kumaran R. S., Muthumary J., Hur B. K.: *J. Biosci. Bioeng.* 106, 103 (2008).
54. Chakravarthi B. V., Das P., Surendranath K., Karande A. A., Jayabaskaran C.: *J. Biosci.* 33, 259 (2008).
55. Kumaran R. S., Muthumary J., Hur B. K.: *J. Microbiol.* 47, 40 (2009).
56. Gangadevi V., Muthumary J.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 52, 2 (2009).
57. Gangadevi V., Murugan M., Muthumary J.: *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 24, 1433 (2008).
58. Sun D., Ran X., Wang J.: *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 48, 589 (2008).

**M. Maruna, M. Šturdíková, and P. Ondřejíčková**  
*(Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava):* **Natural Anticancer Taxane Compounds**

Paclitaxel is a valuable plant drug produced by *Taxus* species, showing anticancer activity in various cancer types. Its action consists in preventing depolymerization of tubulin in cell division. Unfortunately, its isolation from the bark of slow-growing yew trees is limited. Although paclitaxel has been totally synthesized, its production currently depends, completely or in part, on supply of *Taxus* sp. Plant cell cultures, endophytic and epiphytic microorganisms as well as chemical and biotechnological synthesis are currently investigated for the production of taxanes (paclitaxel and docetaxel).

NEBEZPEČNÝ PATOGEN *Enterobacter sakazakii* A JEHO DETEKCE

MARTINA BLAŽKOVÁ, LADISLAV FUKAL  
a PAVEL RAUCH

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo 3.8.09, přijato 15.10.09.

Klíčová slova: *Enterobacter sakazakii*, dětská výživa, polymerázová řetězová reakce, chromogenní a fluorogenní média, *Cronobacter* spp.

## Obsah

1. Úvod
2. Legislativa
3. Metody detekce *Enterobacter sakazakii*
  - 3.1. Kultivační metody
  - 3.2. Chromogenní a fluorogenní média
  - 3.3. Biochemické soupravy
  - 3.4. Molekulární metody
  - 3.5. Porovnání metod detekce
4. Závěr

## 1. Úvod

„Žlutě pigmentovaný *Enterobacter cloacae*“ byl v roce 1980 rozpoznán jako nový druh mikroorganismu<sup>1</sup> a přejmenován na *Enterobacter sakazakii*. Od té doby se tento patogen stal předmětem mnoha studií. Pojem *Enterobacter sakazakii* zahrnuje skupinu bakterií, gramnegativních, mobilních, tyčinkového tvaru, které jsou velice přizpůsobivým patogenem. *Enterobacter sakazakii* způsobuje infekční onemocnění zvláště u předčasně narozených dětí a dětí v prvních týdnech života, která velmi často končí úmrtím. Mikrobiologický přehled této problematiky přehledně zpracovaly Demnerová a Pazlarová<sup>2</sup>. V roce 2007 bylo zjištěno, že *Enterobacter sakazakii* se skládá z více druhů s rozlišným genotypem a fenotypem<sup>3</sup>. Zmatek v taxonomii se stal výzvou pro velký kolektiv autorů, který hlubokou analýzou izolovaných 210 kmenů *E. sakazakii* s využitím molekulárně-biologických technik (např. analýzy genu pro malou ribosomální podjednotku 16S rRNA a DNA-DNA hybridizace) navrhl reklasifikaci tohoto organismu do nového rodu *Cronobacter*, jenž podle autorů<sup>4</sup> obsahuje nejméně šest různých druhů a řadí se mezi *Enterobacteriaceae*. Rod *Cronobacter* zahrnuje, podle této

práce, *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonicus*, *Cronobacter muytjensi*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter dublinensis* (*C. dublinensis* subsp. *dublinensis*, *C. dublinensis* subsp. *lausannensis*, *C. dublinensis* subsp. *lactardi*) a *Cronobacter genomospecies 1*.

Současná platná potravinářská legislativa vycházející z nařízení Evropské komise však dosud používá název *Enterobacter sakazakii*, místo *Cronobacter* spp. V literatuře se však zatím používají nejednotně oba názvy, *Enterobacter sakazakii* a *Cronobacter* spp., jako synonyma, mimo jiné proto, že zatím nejsou propracovány metody detekce *Cronobacter* spp. a rovněž není prozkoumána patogenita jednotlivých druhů tohoto nového rodu. Podařilo se však izolovat několik virulentních faktorů<sup>5</sup>. Jedná se o látky podobné enterotoxinům, které byly také purifikovány<sup>6</sup>. Kromě toho byl izolován protein<sup>7</sup>, který byl identifikován jako metaloproteasa obsahující Zn<sup>2+</sup>. Podařilo se rovněž získat proteiny z povrchu<sup>8</sup> *Enterobacter sakazakii*. Některé z nich byly identifikovány<sup>9–11</sup>. Jsou to: enzym  $\alpha$ -glukosidasa, proteiny, které mohou vázat aminokyseliny a sacharidy a proteiny vnější membrány (OmpA, OmpC, Protein A). Tyto poznatky slouží také jako základ pro vývoj nových metod detekce *Enterobacter sakazakii*.

Vzhledem k nebezpečnosti *Enterobacter sakazakii* je nezbytné mít k dispozici vhodné metody jeho detekce. Vedle klasických kultivačních technik se postupně prosazují rychlé metody založené na biochemických a molekulárně-biologických principech. V tomto přehledu je podán jejich výčet a stručná charakteristika.

## 2. Legislativa

Bezpečností potravin se v rámci EU zabývá Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority, EFSA), vlastními biologickými riziky pak vědecká skupina pro sledování biologického rizika (BIOHAZ Panel). Do mikrobiologického rizika dětské výživy byl v roce 2004 zahrnut také *Enterobacter sakazakii*. Bylo konstatováno, že možný výskyt tohoto patogenu v dětské výživě představuje pro konzumenty velké zdravotní riziko. Rod *Enterobacteriaceae*, který se všeobecně vyskytuje v potravinách, může sloužit jako indikátor rizika. Proto EFSA doporučila sledování přítomnosti patogeních mikroorganismů jak při výrobě potravin, tak v potravinářských výrobcích<sup>12</sup>.

V listopadu 2005 přijala Evropská komise regulační opatření č. 2073/2005, kterým se stanovují mikrobiologická kritéria pro potraviny. Cílem tohoto nařízení bylo snížit množství určitých mikroorganismů a zavést pravidla, která musí výrobci potravin dodržovat. Toto regulační opatření Evropské komise vyžaduje nepřítomnost *Enterobacter sakazakii* v 10 g vzorku sušené počáteční kojenecké výži-

vy a v sušených dietních potravinách pro zvláštní léčebné účely určené pro kojence do šesti měsíců věku. Zmíněné nařízení bylo upraveno novým regulačním opatřením č. 1441/2007 vydaným v prosinci 2007, avšak limity pro *Enterobacter sakazakii* zůstaly stejné. Jako referenční analytická metoda<sup>13</sup> se používá klasická kultivační mikrobiologická metoda ISO/TS 22964 (2006).

### 3. Metody detekce *Enterobacter sakazakii*

V posledních letech byla věnována intenzivní výzkumná činnost vývoji metod detekce *Enterobacter sakazakii*. Hlavní obtíž při detekci *Enterobacter sakazakii*, a také jiných patogenů, je potřeba splnit legislativní nároky (viz kap. 2) a prokázat jednu mikrobiální buňku v několikogramovém vzorku potravin, resp. naopak dokázat, že se v tomto vzorku žádný patogen nevyskytuje. Proto se osvědčují zvláště klasické kultivační techniky, které umožní po několikadenní kultivaci namnožit a izolovat mikrobiální patogen, jehož identita je následně určena na základě morfologických a biochemických vlastností. Takový postup trvá obvykle 5 až 7 dní. Z hlediska hygienických opatření (HACCP) je však potřebné vědět co nejrychleji, zda je potravina kontaminována, nikoliv až v horizontu více dnů.

Proto jsou vyvíjeny tzv. rychlé metody, využívající různé principy detekce. Cílem je získat výsledek detekce patogenních mikroorganismů<sup>14</sup> co nejdříve, nejpozději za 24 až 48 h. Tyto metody by navíc měly být i uživatelsky snadno a lehce použitelné (friendly use).

Avšak ani použitím rychlých metod se nevyhneme kultivačnímu kroku, který musí umožnit pomnožení třeba jediné buňky mikroorganismu v analyzovaném vzorku o několik řádů. Mnohdy je třeba ještě mikrobiální buňky revitalizovat kultivací ve vhodném kultivačním médiu<sup>15,16</sup>. Obvykle takové kultivace trvají 24 h. Po tomto kroku často následují izolační postupy, které vedou k dalšímu zvýšení množství mikroorganismů v analyzovaném vzorku. Využívá se např. imunomagnetické separace nebo adsorbce mikroorganismů na vhodný nosič, např. hydroxidy zirkonia<sup>17</sup>. Takto se získají vzorky, ve kterých lze dále uvedenými metodami již prokázat *Enterobacter sakazakii* v 10 g vzorku.

#### 3.1. Kultivační metody

Mikrobiologické kultivační metody používané pro detekci *Enterobacter sakazakii* jsou založeny na selektivní kultivaci mikroorganismu po jeho kultivačním nabohacení.

Jako standardní ISO metoda akceptovaná také Mezinárodní mlékařskou federací (IDF) byl nedávno přijat postup (ISO/TS 22964:2006) definující metodu detekce *E. sakazakii* v mléce a mléčných výrobcích. Podstatou zkoušky je pomnožení nejprve v neselektivní (pufovaná peptonová voda) a posléze v selektivní (tryptózová půda s laurylsulfátem) půdě. Následuje izolace na chromogenním agaru pro *Enterobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii* isolation agar, ESIA) a na sojovém agaru (*Trypton*

soya agar, TSA). Podezřelé kolonie (žluté kolonie na TSA, modré kolonie na ESIA) z obou agarů jsou identifikovány biochemickými testy.

Vyhledávání vhodných kultivačních médií však stále pokračuje. Cílem je získat vyšší obohacení kultivovaných vzorků, lepší specifitu detekce a snížit počet používaných kultivačních médií. Nedávno byly popsány postupy využívající pouze jedno kultivační médium<sup>18,19</sup>. Dokonce byl popsán postup umožňující rozlišení živých buněk *Enterobacter sakazakii* od mrtvých<sup>20</sup>.

#### 3.2. Chromogenní a fluorescenční média

Tato média jsou používána zvláště po kultivačním obohacení vzorku jako první kritérium výskytu *Enterobacter sakazakii*. Jedním z nejvýznamnějších znaků *Enterobacter sakazakii* je přítomnost enzymu  $\alpha$ -glukosidasy. Tento enzym ostatní zástupci enterobakterů nemají<sup>21</sup>. Přítomnost  $\alpha$ -glukosidasy byla využita pro vývoj selektivních chromogenních/fluorogenních substrátů pro detekci *Enterobacter sakazakii*. Mezi chromogenní substráty patří např. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid, který je přeměňován  $\alpha$ -glukosidasou na pigment, který obarví kolonie *Enterobacter sakazakii* na charakteristické modrozelené zbarvení<sup>22</sup>. Substrát není selektivní a poskytuje falešně pozitivní výsledky také s *Escherichia vulneris*, *Pantoea sp.* a *Citrobacter koseri*. Jiným chromogenním substrátem, který může být použit pro detekci *Enterobacter sakazakii*, je využití trypsinových štěpů sojového agaru a  $\alpha$ -D-glukopyranosidu. Působením přítomné  $\alpha$ -glukosidasy vznikají přeměnou přidaného substrátu žluté zóny  $p$ -nitrofenylového hydrolyzátu<sup>23</sup>.

Nejspolehlivější výsledky, ověřené v rozsáhlé studii<sup>20</sup>, byly získány při použití selektivních chromogenních médií podle Druggan-Forsythe-Iversen (DFI) agaru<sup>24</sup> a Chromocult® *E. sakazakii* (CES) agaru fy Merck. Případně falešně pozitivní výsledky poskytují vzorky obsahující mikroorganismy, které mají  $\alpha$ -glukosidasu. Hledání nových médií pro skrínigové metody pokračuje<sup>25</sup>.

Nejnámějším fluorogenním substrátem pro detekci *Enterobacter sakazakii* je methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-glukosid<sup>26</sup>. Přítomná  $\alpha$ -glukosidasa přeměňuje substrát za vzniku třpytivých fluoreskujících kolonií *Enterobacter sakazakii*.

Fluorescenčně značené vybrané sekvence genů pro ribosomální RNA *Enterobacter sakazakii* lze detegovat soupravou VIT-E.sakazakii, fy Vermicon Identification Technology. Fluoreskující buňky *Enterobacter sakazakii* jsou viditelné pod fluorescenčním mikroskopem. Velkou výhodou tohoto postupu je, že jsou viditelné pouze vitální buňky s vysokým obsahem ribosomů a že celá detekce trvá méně než tři hodiny. Detekční limit je 10<sup>3</sup> kolonie tvořících jednotek<sup>27</sup> (KTJ)/ml. Fluorescenční techniky však zatím nedosáhly většího rozšíření.

#### 3.3. Biochemické soupravy

Mikroorganismy, které mají být identifikovány, se musí napřed izolovat ve vhodném kultivačním médiu

podle standardních mikrobiologických technik. K detekci *Enterobacter sakazakii* jsou používány biochemické soupravy, založené na průkazu přítomnosti určitých enzymů, charakteristických pro tento mikroorganismus. Příkladem takové soupravy je API 20 E panel<sup>28</sup>. Prokázalo se však, že tato souprava poskytuje jak falešně pozitivní, tak i falešně negativní výsledky, a proto byl test modifikován<sup>29</sup> a počet identifikačních reakcí rozšířen na 32. Souprava je komerčně dostupná pod názvem API Rapid ID 32 E, výrobce firma bioMérieux SA. Tento test je standardizovaný identifikační systém pro *Enterobacteriaceae* a další gramnegativní tyčinky, který využívá 32 miniaturizovaných biochemických testů a specifickou databázi. Úplný přehled mikroorganismů, které je možné pomocí tohoto systému identifikovat, je uveden v identifikační tabulce přiložené k testu. Proužek ID 32 E sestává z 32 jamek, které obsahují dehydratované testovací substráty. Po 24 hodinách inkubace se reakce v jednotlivých jamkách vyhodnocují buď pomocí přístrojů ATB Expression, nebo *mini API*. Výsledky je možné získat i vizuálně. Jednou z nejvýraznějších biochemických charakteristik *Enterobacter sakazakii* je

přítomnost  $\alpha$ -glukosidasy. Jako substrát se používají syntetické sloučeniny D-glukosy s *p*-nitrofenylovými deriváty. Produkce žlutého *p*-nitrofenylu odlišuje *Enterobacter sakazakii* od dalších druhů rodu *Enterobacter*.

Pro aplikaci biochemických testů je základním požadavkem mít k dispozici čistou bakteriální kulturu a zručného a zkušeného pracovníka vyšetřujícího daný vzorek.

### 3.4. Molekulární metody

Velké naděje jsou v posledních letech vkládány do tzv. molekulárních metod, tedy postupů, které v našem případě využívají molekulárně-genetických technik, které jsou rychlejší, spolehlivější a hlavně specifitější než klasické metody kultivační<sup>30</sup>.

První (a zatím jediný) sekvenovaný genom *Enterobacter sakazakii* byl zveřejněn v druhé polovině roku 2007. Jednalo se o sbírkový kmen *Enterobacter sakazakii* ATCC BAA-894, který pocházel z infikované kojenecké výživy. Jeho genom je tvořen cirkulární DNA délkou 4,4 Mbp, kódující 4277 proteinů a dvěma plazmidy<sup>2</sup>.

Tabulka I  
Seznam primerů používaných k detekci *Enterobacter sakazakii*

Název primeru	Sekvence primeru 5'-sekvence-3'	Cílový úsek	Velikost produktu	Metoda <sup>a</sup>	Lit.
Esakf	GCTYTGCTGACGAGTGGCGG	<i>16S rDNA</i>	929 pb	PCR	31
Esakr	ATCTCTGCAGGATTCTCTGG				
Esak2	CCCGCATCTCTGCAGGATTCTC	<i>16S rDNA</i>	900 pb	PCR	54
Esak3	CTAATACCGCATAACGTCTACG				
Saka1	ACAGGGAGCAGCTTGCTGC	<i>16S rDNA</i>	952 pb	PCR	32
Saka2b	TCCCGCATCTCTGCAGGA				
EsAgf	TGAAAGCAATCGACAAGAAG	gen zodpovědný za $\alpha$ -glukosidasovou aktivitu	1680 pb	PCR	27
EsAgr	ACTCATTACCCCTCTGATG				
SG-F	GGGTTGTCTGCGAAAGCGAA	úsek mezi <i>16S a 23S rDNA</i>	282 pb	PCR	55
SG-R	GTCTTCGTGCTGCGAGTTTG				
SI-F	CAGGAGTTGAAGAGGTTTAACT	úsek mezi <i>16S a 23S rDNA</i>	251 pb	PCR	55
SI-R	GTGCTGCGAGTTTGAGAGACTC				
Es-ProF	GAAAGCGTATAAGCGCGATTTC	gen zodpovědný za $Zn^{2+}$ metaloproteasu	350 pb	PCR	7
Es-ProR	GTTCCAGAAGGCGTTCTGGT				
E1	CCCAGACGAAACTCGCCGAG	**	634 pb	PCR	42
E2	GGGATAAGCAGATAATGCGATAAA				
SF1	TAACAGGGAGCAGCTTGCTGCTCTG	<i>16S rDNA</i>	426 pb	PCR, RT-PCR	36
SR3	CGGGTAACGTC AATTGCTGCGGT				
**	**	úsek mezi <i>rpsU</i> (gen kódující ribosomálníprotein S21) a <i>dnaG</i> (gen kódující primasu)		RT-PCR	56

<sup>a</sup> RT-PCR (real time PCR), \*\* data nejsou publikována

Většina nových detekčních postupů využívá k průkazu *Enterobacter sakazakii* polymerázové řetězové reakce (PCR). Vhodný výběr primerů na základě známého genu  $\alpha$ -glukosidasy (*glu A*) umožnil specifickou detekci<sup>27</sup> *Enterobacter sakazakii*. Obvykle se však používají primery z oblasti 16S rRNA (viz tab. I). Vyvinutá PCR 16S rRNA umožňuje velmi citlivou detekci<sup>31</sup> *Enterobacter sakazakii* (10 pg čisté DNA templátu). Zatímco někteří autoři<sup>32</sup> popisují 100% úspěšnost detekce *Enterobacter sakazakii*, jiní uvádějí nižší procento správné detekce<sup>33</sup>. S využitím inhibitorů se podařilo sestavit detekční PCR rozlišující živé a mrtvé buňky<sup>34</sup> *Enterobacter sakazakii*. Během psaní tohoto přehledu se objevil první úspěšný pokus<sup>35</sup> o rozlišení jednotlivých druhů rodu *Cronobacter* pomocí PCR.

Poslední dobou nacházejí stále častěji uplatnění modifikované metody PCR. Real-time PCR, která umožňuje rychlou a specifickou detekci a kvantifikaci specifického úseku nukleové kyseliny, se stala oblíbenou detekční metodou mikroorganismů. Hned několik autorů popisuje více než 90% úspěšnost detekce *Enterobacter sakazakii* touto technikou<sup>36–38</sup>. PCR, která využívá primery založené na repetitivně-extragenně-palindromních (Rep-PCR) sekvencích, umožnila získat lepší výsledky<sup>39–41</sup> v porovnání s 16S rRNA. Osvědčila se také podobná metoda využívající enterobakteriálně-repetitivně-integrálně-souhlasných (Eric-PCR) sekvencí<sup>42</sup>.

Druhově specifickou DNA je možné detegovat metodou LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Je to jednoduchá, rychlá, specifická a nenákladná metoda, zahrnující obohacovací kultivační krok. Je založená na isothermální amplifikaci, při které se využívá 4 primerů specificky navržených tak, aby rozpoznaly 6 odlišných oblastí cílového genu. Autoři uvádějí citlivost detekce 1,2 KTJ (kolonie tvořící jednotky) ve 100 g kojenecké výživy<sup>43</sup>.

Úspěšně byla použita rovněž technika založená na selektivním pomnožení restričních fragmentů<sup>3</sup> (AFLP, amplified fragment length polymorphism) z celé molekuly DNA pomocí PCR.

Jinou možností je použití metody detekce fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH, fluorescence *in situ* hybridization). Tato metoda umožňuje detekci specifických míst na DNA nebo mRNA. Použitím nové sondy (PNA) byla detegována, po kultivačním pomnožení, 1 KTJ *Enterobacter sakazakii* v 10 g kojenecké výživy<sup>44</sup>.

Stále jsou vyvíjeny další vysoce sofistikované metody umožňující studovat genetickou příbuznost jednotlivých kmenů<sup>45</sup>. Používají se zejména pro identifikační studie *Enterobacter sakazakii*, resp. *Cronobacter* spp., v laboratořích a pro svoji náročnost na přístrojové vybavení již méně v běžné diagnostice. Významnou roli hraje pulsní gelová elektroforéza (PFGE, pulsed field gel electrophoresis), která umožňuje analýzu velkého množství DNA fragmentů z celého bakteriálního genomu. PFGE analýza je poněkud zdlouhavá, trvá 2–3 dny, ale je považována za vysoký standard v subtypizaci bakterií<sup>46–50</sup>.

Podobný význam má multilokusová sekvenční typizace (MLSA, multilocus sequence analysis). Genetické roz-

díly bakteriálních kmenů jsou studovány na základě sekvenování nukleotidů chromosomálních genů pro enzymy nebo některé proteiny. Touto metodou autoři<sup>51</sup> dokázali rozlišit jednotlivé druhy *Cronobacter* spp.

Pro detekci *Enterobacter sakazakii* byla rovněž popsána technika využívající oligonukleotidových čipů<sup>52</sup> (oligonucleotide array).

Intenzivní práce řady laboratoří vyústila ve výrobu a komerční dostupnost souprav sloužících k detekci *Enterobacter sakazakii*. Jsou to např.: BAX® System PCR Assay for Screening *Enterobacter sakazakii*, výrobce DuPont; TaqMan® *Enterobacter sakazakii* Detection Kit, výrobce Applied Biosystems a Real Time PCR Assays fy Merck KGaA. Vlastní použití těchto souprav je však v každém případě podmíněno dostatečně dlouhou kultivací, která musí obsahovat jak revitalizaci mikroorganismu, tak i jeho dostatečné pomnožení před detekčním krokem.

### 3.5. Porovnání metod detekce

Výsledky detekce *Enterobacter sakazakii* získané různými metodami jsou velmi často nejednoznačné. Např. spolehlivost a přesnost metod založených na PCR je vázána na výběr primerů a zvolený teplotní cyklus analytického postupu. Může se proto stát, že některé postupy PCR jsou nedostatečně specifické<sup>31</sup>.

To vedlo přední světové laboratoře, které se zabývají touto problematikou, k uskutečnění rozsáhlých studií, při kterých byly za standardních podmínek porovnávány různé metody detekce *Enterobacter sakazakii*. Byly uskutečněny dvě velké studie, porovnávající osm různých párů primerů<sup>20,53</sup>. Cílem těchto autorů bylo vyhodnotit a porovnat primery navržené různými autory pro detekci a identifikaci *Enterobacter sakazakii* při analýze reálných vzorků pocházejících převážně z dětské mléčné výživy a ze životního prostředí. Navíc autoři těchto studií porovnávali výsledky získané PCR s metodou hybridizace DNA-DNA, s metodou používající selektivní média (DFI agar, CES agar, ESIA agar, DFIA agar a ESPM agar), s detekcí  $\alpha$ -glukosidasy a biochemickými soupřevami (API20E a ID32E v3.0). Takový přístup je nesmírně cenný a bohužel v literatuře málo častý. Studie těchto autorů představují zásadní průlom v detekci *Enterobacter sakazakii*.

Autoři první z těchto studií získali velmi uspokojivé výsledky<sup>53</sup>. Zjistili, že všechny detegované izoláty *Enterobacter sakazakii* měly  $\alpha$ -glukosidasovou aktivitu, chromogenní média pozitivně detegovala více než 95 % vzorků a biochemický test ID 32 E v3.0 byl úspěšný v 99,5 %. Nejúspěšnější byla detekce využívající průkazu genů *dnaG* a *gluA*, která 100 % vzorků úspěšně prokázala.

Výsledky druhé, velmi rozsáhlé studie, již tak pozitivní nejsou<sup>20</sup>. Předně se ukázalo, že nejpřesnější identifikační metodou (98 %) je použití selektivních médií využívajících kultivace na DFI nebo CES agaru. U postupů založených na PCR se jen u tří dvojic primerů přesnost detekce blíží předchozí metodě a dosahuje max 92 %. U ostatních testovaných primerů kolísá mezi 29–86 %. Obdobné výsledky autoři získali hodnocením specifity detekce. Porov-



náním získaných pozitivně a negativně určených vzorků s DNA-DNA hybridizačním standardem má opět nejlepší hodnocení technika selektivních médií a jen dva z testovaných primerů. Autoři tak získali podklady pro tvrzení, že z mnoha publikovaných postupů pouze selektivní agarová média (DFI a CES) a z používaných primerů (Esakf/Esakr) umožňují získat výsledky s vyšší než 90% přesností detekce. Proto navrhuji použití agarových médií pro výběr pozitivních vzorků po první obohacovací kultivaci analyzovaných vzorků a v následujícím detekčním kroku pak použití vybraných primerů za přesně dodržěného protokolu PCR. Takovým postupem je možné docílit až 92% přesnosti detekce *Enterobacter sakazakii*.

Je tedy zřejmé, že problematika detekce *Enterobacter sakazaki*, alias *Cronobacter* spp. ještě není zdaleka uzavřenou kapitolou, jak by se snad mohlo na první pohled zdát. V současnosti však probíhá v této oblasti intenzivní výzkum.

#### 4. Závěr

Velké zdravotní riziko, které přináší *Enterobacter sakazakii*, alias *Cronobacter* spp., zvláště pro kojence a batolata, vyvolalo zvýšený zájem o vhodné metody detekce tohoto patogenního mikroorganismu. Zejména v posledních čtyřech letech bylo vyvinuto několik principiálně odlišných detekčních postupů. Mezi získanými výsledky však existuje dosud značný nesoulad.

Klasické metody detekce *E. sakazakii*, kterými lze prokázat nepřítomnost tohoto patogenu v potravíně až za několik dní, nejsou pro výrobce potravin dostatečně rychlé. Je proto nezbytné vyvíjet rychlejší metody detekce, které by dovolily získat informace o možném výskytu tohoto patogenu zejména v dětské výživě a umožnily kontrolu výrobní technologie a monitorování hygienických podmínek výroby.

V posledních letech byl učiněn velký pokrok ve vývoji rychlých metod detekce patogenů. Významnou roli hrají metody založené na využití molekulárně-biologických technik. Pro detekci *E. sakazakii* bylo zatím popsáno, vedle klasických kultivačních technik a biochemických testů, několik hybridizačních technik. Tyto molekulárně genetické postupy využívají nejčastěji polymerázovou řetězovou reakci. Z technického hlediska mají publikované detekční postupy řadu variant. Nejvíce se zatím osvědčila kombinace kultivace patogenů na agarových (DFI a CES) půdách s následnou detekcí pomocí PCR (cit<sup>20,53</sup>). Vývoj metod detekce *Enterobacter sakazakii*, alias *Cronobacter* spp. není však zdaleka ukončen a přinese zájemcům o tuto problematiku, velmi pravděpodobně, ještě řadu nečekaných problémů.

*Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře ČR projekt 525/09/1075, Národnímu výzkumnému centru 2B06048 a Výzkumnému záměru MSM 6046137305.*

#### LITERATURA

- Farmer J. J. III, Asbury M. A., Hickman F. W., Brenner D. J.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 569 (1980).
- Demnerová K., Pazlarová J.: *Chem. Listy* 103, 641 (2009).
- Iversen C., Lehner A., Mullane N., Bidlas E., Cleenwerck I., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: *BMC Evol. Biol.* 7, 64 (2007).
- Iversen C., Mullane N., McCardell B., Tall B. D., Lehner A., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1442 (2008).
- Pagotto F. J., Nazarowec-White M., Bidawid S., Farber J. M.: *J. Food Prot.* 66, 370 (2003).
- Raghav M., Aggarwal P. K. P.: *Can. J. Microbiol.* 53, 750 (2007).
- Kothary M. H., McCardell B. A., Frazar C. D., Deer D., Tall B. D.: *Appl. Environ. Microb.* 73, 4142 (2007).
- Nilsson I., Utt M., Nilsson H. O., Ljung A., Wadstrom T.: *Electrophoresis* 21, 2670 (2000).
- Riedel K., Lehner A.: *Proteomics* 7, 1217 (2007).
- Nair M. K. M., Venkitanarayanan K.: *Pediatr. Res.* 62, 664 (2007).
- Singamsetty V. K., Wang Y., Shimada H., Prasadarao N. V.: *Microb. Pathog.* 45, 181 (2008).
- Hochel I.: *Chem. Listy* 103, 814 (2009).
- ČSN P ISO/TS 22964: Mléko a mléčné výrobky - Průkaz *Enterobacter sakazakii* (říjen 2006).
- Blažková M., Karamonová L., Fukal L., Rauch P.: *Chem. Listy* 99, 467 (2005).
- Al-Holy M. A., Lin M., Al-Qadin H. M., Rasco B. A.: *Food Microbiol.* 25, 22 (2008).
- Shaker R. R., Osaili T. M., Abu Al-Hasan A. S., Ayayash M. M., Forsythe S. J.: *J. Food Sci.* 73, M354 (2008).
- Zhou Y., Qingping W., Xiaoke X., Xiaojuan Y., Yingwang Y., Zhang J.: *Food Microbiol.* 25, 648 (2008).
- Fox E. M., Jordan K. N.: *J. Appl. Microbiol.* 105, 1091 (2008).
- O'Brien S., Healy B., Negrodo C., Fanning S., Iversen C.: *J. Food Prot.* 72, 1472 (2009).
- Cawthorn D.-M., Botha S., Witthuhn R. C.: *Int. J. Food Microbiol.* 127, 129 (2008).
- Muytjens H. L., van der Ros-van de Repe J., van Druuten H. A. M.: *J. Clin. Microbiol.* 20, 684 (1984).
- Iversen C., Druggan P., Forsythe S.: *Int. J. Food Microbiol.* 96, 133 (2004).
- Kandhai M. C., Reij M. W., van Puyvelde K., Guillaume-Gentil O., Beumer R. R., van Schothorst M.: *J. Food Prot.* 67, 1207 (2004).
- Iversen C., Waddington M., On S. L., Forsythe S.: *J. Clin. Microbiol.* 42, 5368 (2004).
- Iversen C., Druggan P., Schumacher S., Lehner A., Feer C., Dschwend K., Joosten H., Stephan R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2550 (2008).
- Oh S. W., Kang D. H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5692 (2004).

27. Lehner A., Nitzsche S., Breeuwer P., Diep B., Thelen K., Stephan R.: *BMC Microbiol.* 6, 15 (2006).
28. Washington J. A., Yu P. K. W., Jeffery M. W.: *Appl. Microbiol.* 22, 267 (1971).
29. Iversen C., Forsythe S.: *Food Microbiol.* 21, 771 (2004).
30. Blažková M., Koets M., Rauch P., van Amerongen A.: *Eur. Food Res. Technol.* 229, 867 (2009).
31. Lehner A., Stephan R.: *J. Food Prot.* 67, 2850 (2004).
32. Hassan A. A., Akineden O., Kress C., Estuningsih S., Schneider E., Usleber E.: *Int. J. Food Microbiol.* 116, 214 (2007).
33. Gutierrez-Rojo R., Torres-Chavolla E.: *J. Rapid Meth. Automat. Microbiol.* 15, 345 (2007).
34. Cawthorn D.-M., Witthuhn R. C.: *J. Appl. Microbiol.* 105, 1178 (2008).
35. Stoop B., Lehner A., Iversen C., Fanning S., Stephan R.: *Int. J. Food Microbiol.*, v tisku (2009).
36. Kang S. E., Nam Y. S., Hong K. W.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 516 (2007).
37. Lehmacher A., Fiegen M., Hansen B.: *J. Consumer Protect. Food Safety* 2, 218 (2007).
38. Krascenecsova K., Trncikova T., Kaclikova E.: *Food Anal. Meth.* 1, 85 (2008).
39. Choi S. H., Choi J. W., Lee S. B.: *Food Sci. Biotechnol.* 17, 1171 (2008).
40. Proudly I., Bougle D., Coton E., Coton M., Leclercq R., Vergnaud M.: *J. Appl. Microbiol.* 104, 26 (2008).
41. Proudly I., Bougle D., Leclercq R., Vergnaud M.: *J. Appl. Microbiol.* 105, 550 (2008).
42. Ye Y. W., Wu P. Q., Zhou Y. H., Dong X. H., Zhang J. M.: *J. Microbiol. Meth.* 75, 392 (2008).
43. Liu C., Zheng W. J., Zhang W. H., Hou Y. M., Liu Y.: *J. Food Safety* 29, 83 (2009).
44. Almeida C., Azevedo N. F., Iversen C., Fanning S., Keevil C. W., Vieira M. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2925 (2009).
45. Michalska A., Gospodarek E.: *Postepy Mikrobiologii* 46, 39 (2007).
46. Mullane N. R., Whyte P., Wall P. G., Quinn T., Fanning S.: *J. Food Microb.* 116, 73 (2007).
47. Healy B., Mullane N., Collin V., Mailler S., Iversen C., Chatellier S., Storrs M., Fanning S.: *J. Food Prot.* 71, 1372 (2008).
48. Molloy C., Cagney C., O'Brien S., Iversen C., Fanning S., Duffy G.: *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.007, v tisku (2009).
49. Baumgartner A., Grand M., Liniger M., Iversen C.: *Int. J. Food Microbiol.*, v tisku (2009).
50. El-Sharoud W. M., O'Brien S., Negredo C., Iversen C., Fanning S., Healy B.: *BMC Microbiol.* 9, 24 (2009).
51. Kuhnert P., Korczak B. M., Stephan R., Joosten H., Iversen C.: *Int. J. Food Microbiol.*, v tisku (2009).
52. Liu Y., Gao Q. L., Zhang X., Hou Y. M., Yang J. L., Huang XT.: *Molecular Cellular Probes* 20, 11 (2006).
53. Iversen C., Lehner A., Mullane N., Marugg J., Fanning S., Stephan R., Joosten H.: *J. Clin. Microbiol.* 45, 3814 (2007).
54. Keyser M., Witthuhn R. C., Ronquest L.-C., Britz T. J.: *Biotechnol. Lett.* 25, 1893 (2003).
55. Liu Y., Cai X., Zhang X., Gao Q., Yang X., Zheng Z., Luo M., Huang X.: *J. Microbiol. Methods* 65, 21 (2006).
56. Seo K. H., Brackett R. E.: *J. Food Prot.* 68, 59 (2005).

**M. Blažková, L. Fukal, and P. Rauch** (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Dangerous Pathogen *Enterobacter sakazakii* and Its Detection**

The aim of the review is to characterize *Enterobacter sakazakii* alias *Cronobacter* sp. as one of most dangerous microbial contaminants in foods. The microbe is a pathogen causing a serious disease in premature and newborn infants, rarely in adults. Despite a low occurrence of the infections, a high mortality (up to 80 %) has been reported. A survey of methods of its detection is given. Cultivation, chromogenic/fluorogenic media, biochemical kits and molecular genetic methods are promising in *Enterobacter sakazakii* screening in foods.

---

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

---

### NOVÝ PLYNOVOCHROMATOGRAFICKÝ DÁVKOVACÍ PRIESTOR PRE METÓDU IHLOVÉHO ADSORPČNÉHO KONCENTRÁTORA

JÁN HRIVŇÁK<sup>a</sup> a EVA KRÁĽOVIČOVÁ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Expertízne a analytické služby, Astrová 46, 821 01 Bratislava,* <sup>b</sup> *Regionálny úrad verejného zdravotníctva Bratislava, hlavné mesto Slovenskej republiky, Ružinovská 8, 820 09, Bratislava, Slovenská Republika*  
janhrivnak@post.sk

Došlo 29.9.08, prepracované 23.3.09, prijaté 23.4.09.

---

Kľúčové slová: ihlový koncentrátor, termická desorpcia, Tenax, BTEX

---

#### Úvod

Metóda ihlového adsorpčného koncentrátora (INCAT – inside needle capillary) je jednou z často používaných bezrozpúšťadlových obohacovacích techník z plynnej alebo kvapalnej (voda) vzorky. Pri tejto technike sa známy objem vzorky vedie do ihly, ktorá je plnená adsorbentom alebo jej vnútorné steny sú pokryté vrstvou adsorbenta. Po skončení odberu vzorky sa analyty z ihly (prepichnutím septa plynovochromatografického dávkovacieho priestoru) termálne desorbujú a z dávkovacieho priestoru vedú prúdom nosného plynu na kapilárnu kolónu a analyzujú<sup>1–5</sup>. Metóda INCAT bola verifikovaná, optimalizovaná, validovaná a porovnaná s inými technikami<sup>3–5</sup>. Určitou nevýhodou je rozmývanie píkovo<sup>2</sup>, potreba použitia hrubších filmov a väčších priemerov kapilárnych kolón<sup>2–5</sup>, čo zužuje aplikovateľnosť metódy len pre prchavejšie zlúčeniny. Metóda sa úspešne používa na analýzu BTEX (benzén, toluén, etylbenzén a xylény) v plynných a vodných vzorkách<sup>3–5</sup>.

Cieľom tejto práce bolo pre metódu INCAT navrhnuť nové usporiadanie dávkovacieho priestoru, založené na priamom spojení ihlového adsorpčného koncentrátora s kolónou, za účelom využitia plnej účinnosti kapilárnej kolóny.

#### Experimentálna časť

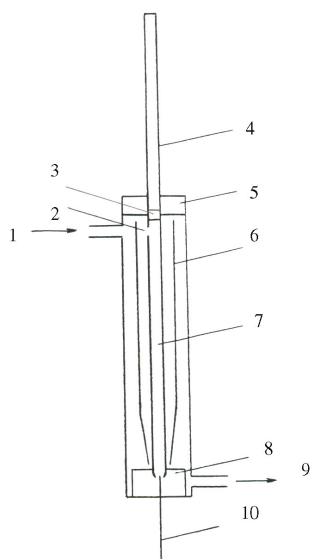
Prístroj a chemikálie

Na GC-FID analýzu sa použil plynový chromatograf GC 800 Top Series, CE Instrument (Rodano-Milano, Taliansko) s FID detektorom a héliom ako nosným plynom. Na chromatografickú separáciu sme použili kremennú kapilárnu kolónu Supelcowax<sup>TM</sup> 10 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) s teplotným programom 30–130 °C pri gradiente 5 °C/min a tlaku nosného plynu (hélium) 60 kPa. Pri dávkovaní bol tlak nosného plynu 0 kPa a bezprostredne po vsunutí ihly nastavený na 5 kPa. Termálna desorpcia prebiehala počas 1 min pri teplote inletu 230 °C a teplote kolóny 30 °C. Po skončení desorpcie bol tlak nastavený na 60 kPa a spustený teplotný program. Ako adsorbent sme použili 10 mg (60–80 mesh) Tenax TA (Deerfield, Altech, USA). Injekčná ihla (Chirana Injecta, Stará Turá, Slovensko) mala vnútorný priemer 0,9 mm a dĺžka náplne bola 40 mm. Ako modelovú vzorku sme použili roztok BTEX v *n*-pentáne (2,4–2,6 mg/100 ml), z ktorého sme pripravili aj plynnú zmes (2,4–2,6 μg/l vzduchu). Na dávkovanie plynnej modelovej vzorky do INCAT ihly sme použili 1 ml celosklenenú injekčnú striekačku (Poulten & Graf, Wertheim, Nemecko) napojenú pomocou 1 cm hadičky na ihlu. Údaje sme spracovali počítačovým programom Class-VP7.2,SP1 (Shimadzu, Japonsko).

Benzén a toluén boli od Aldrich (Milwaukee, USA), etylbenzén od Merck (Schuchardt, Nemecko) a xylény od Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Nemecko). Na prípravu štandardného roztoku analytov sme použili *n*-pentán (Uvasol, Merck, Darmstadt, Nemecko).

#### Výsledky a diskusia

Na obr. 1 je schematický diagram nového dávkovacieho priestoru s ihlovým adsorpčným koncentrátorom v polohe dávkovania a chromatografovania. Ihla počas chromatografovania ostáva v dávkovacom priestore. Kapilárna kolóna vyčnieva zo dna jamky, do ktorej je vsunutá ihla (pritlačaná septom dávkovacieho priestoru), pričom kolóna siaha 1–2 mm do ihly. Spoj medzi septom a ihlou je plynotesný avšak nie mechanicky pevný, čo umožňuje vytiahnutie ihly po skončení analýzy. Výhodou tohto usporiadania je vyradenie mŕtveho objemu pôvodného dávkovacieho priestoru z chromatografického systému. Súčasným dávkovacím priestorom je vlastne ihla, čo sa prejavuje potlačením rozmývania píkovo na chromatogramoch. V skutočnosti ide o priame dávkovanie na kolónu.

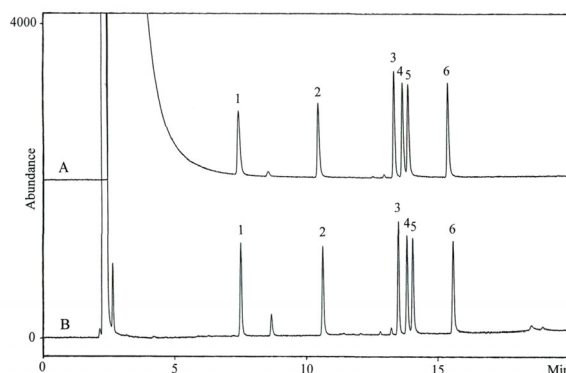


Obr. 1. Schematický diagram dávkovacieho priestoru: 1 – nosný plyn, 2 – otvor pre vstup nosného plynu do adsorbentom vyplnenej časti ihly, 3 – zaslepenie (septum), 4 – injekčná ihla, 5 – septum dávkovacieho priestoru, 6 – vodiaca trubička, 7 – adsorbentom vyplnená časť ihly, 8 – spoj (septum), opatrený v hornej časti otvorom pre vsunutie ihly, 9 – nosný plyn ( $5\text{--}7\text{ ml min}^{-1}$ ), 10 – kapilárna kolóna

Rozmývanie píkov je zapríčinené aj zriedovaním vzorky prúdom nosného plynu počas desorpcie. Urýchliť desorpciu je možné zvyšovaním teploty, prípadne znižovaním zrnitosti adsorbenta. Zvyšovanie teploty je limitované termickou stabilitou adsorbenta a znižovanie zrnitosti zase vedie k stúpaniu odporu proti prietoku nosného plynu. V našich prácach používame zrnitosť 60–80 mesh (cit.<sup>6–11</sup>).

Ďalšou možnosťou ako zabrániť zriedovaniu vzorky nosným plynom je znižovanie jeho prietoku počas desorpcie. Preto sme chromatografický proces rozdelili na dve časti, a to na časť desorpcie pri nízkom prietoku a na časť vlastného chromatografovania pri zvýšenom, optimálnom prietoku (podľa druhu kolóny a použitého nosného plynu). Experimentálne sme zistili, že pre desorpciu vyhovujú tlaky 5–10 kPa (cit.<sup>6–11</sup>).

Na rozmývanie píkov pôsobí aj doba desorpcie, čím je dlhšia, tým viac sa uplatňuje pozdĺžna difúzia. Doba desorpcie, okrem už spomínaných parametrov, závisí aj od



Obr. 2. A) Chromatogram BTEX získaný klasickým dávkovaním ( $1\ \mu\text{l}$ ) analytov v pentáne injekčnou striekačkou pri použití deliča 1:10, B) Chromatogram desorbovanej ( $1\ \text{ml}$ ) plynnej BTEX zmesi použitím upraveného podľa obr. 1 dávkovacieho priestoru; píky: 1 – benzén, 2 – toluén, 3 – etylbenzén, 4 – *p*-xylén, 5 – *m*-xylén, 6 – *o*-xylén

veľkosti povrchu adsorbenta, pre Tenax sú postačujúce 1 až 2 min (cit.<sup>7</sup>).

Za predpokladu, že mŕtvý objem ihly je kompatibilný s mŕtvym objemom kolóny, stáva sa ihla s adsorbentom prakticky časťou kapilárnej kolóny, čo sa prejavuje možnosťou plného využitia účinnosti kapilárnej kolóny. V týchto prípadoch je možné použiť aj menšie priemery kolón s tenkými filmami stacionárnej fázy (bez použitia kryofokusácie alebo subambietnej teploty).

Na obr. 2 je chromatogram (A) klasickým injektovaním ( $1\ \mu\text{l}$ ) analytov v *n*-pentáne (pri deliacom pomere 1 : 10) do neupraveného dávkovacieho priestoru a chromatogram (B) získaný desorpciou 1 ml plynnej modelovej vzorky z ihly v upravenom dávkovacom priestore podľa obr. 1. Absolútne množstvá analytov na oboch chromatogramoch sú v oblasti 2,4–2,6 ng/zložka. Porovnaním širok píkov *n*-pentánu je vidieť, že jeho úzka zóna (obr. 2B) potvrdzuje, že v prípade novej metódy INCAT ide o priame dávkovanie na kolónu.

V tab. I sú uvedené šírky píkov z chromatogramov (obr. 2). Porovnaním nameraných hodnôt je možné dokumentovať, že metóda umožňuje plné využitie účinnosti kapilárnej kolóny.

Štatistické vyhodnotenie 5 následných analýz plynnej modelovej vzorky (obr. 2B) je v tab. II, z ktorej je vidieť, že relatívne štandardné odchýlky ( $s_r$ ) sú v rozmedzí 2,0 až 3,4 %, čo je vyhovujúce pre stopovú analýzu.

Tabuľka I

Šírky píkov (min.) na chromatogramoch A, B (obr. 2)

Názov analytu	Benzén	Toluén	Etylbenzén	<i>p</i> -Xylén	<i>m</i> -Xylén	<i>o</i> -Xylén
Chromatogram A	0,402	0,393	0,305	0,233	0,300	0,408
Chromatogram B	0,360	0,307	0,315	0,225	0,382	0,417

Tabuľka II  
Štatistické vyhodnotenie 5 následných analýz štandardnej plynnej zmesi

Zlúčenina	Plocha píku (imp.)					Priemer	s <sup>a</sup>	s <sub>r</sub> % (n=5) <sup>b</sup>
Benzén	4824	4973	4701	4625	4992	4823	162,1	3,4
Toluén	4619	4752	4514	4517	4837	4648	143,6	3,1
Etylbenzén	5320	5409	5283	5214	5486	5342	106,7	2,0
<i>p</i> -Xylén	4984	5047	4812	4715	5109	4933	164,9	3,3
<i>m</i> -Xylén	5186	5200	5047	4928	5289	5130	142,3	2,8
<i>o</i> -Xylén	5194	5271	5118	4982	5307	5174	129,9	2,5

<sup>a</sup>s – štandardná odchýlka, <sup>b</sup>s<sub>r</sub> – relatívna štandardná odchýlka

Navrhovaný plynovochromatografický dávkovací priestor pre metódu INCAT je jednoduchý, odstraňuje problémy súvisiace s rozmyvaním píkov, vzorka sa dávkuje systémom na kolónu a optimalizáciou tlakov počas desorpcie a vlastného chromatografického procesu je možné dosiahnuť plné využitie účinnosti kapilárnej kolóny.

#### LITERATÚRA

1. Fowler W. K., Duffey C. H., Miller H. C.: *Anal. Chem.* 51, 2333 (1979).
2. Qin T., Xu X., Polák T., Pacáková V., Štulík K., Jech L.: *Talanta* 44, 1683 (1997).
3. Kubinec R., Berezkin V. G., Górová R., Addová G., Mračnová H., Soják L.: *J. Chromatogr., B* 800, 295 (2004).
4. Příkryl P., Kubinec R., Jurdáková H., Ševčík J., Ostrovský I., Soják L., Berezkin V.: *Chromatographia* 64, 65 (2006).
5. Jurdáková H., Kubinec R., Jurčišinová M., Krkošová Ž., Blaško J., Ostrovský I., Soják L., Berezkin V. G.: *J. Chromatogr., A* 1194, 161 (2008).
6. Tölgyessy P., Hrivňák J., Šilhárová K.: *Petrol. Coal* 46, 88 (2004).
7. Kráľovičová E., Hrivňák J., Tölgyessy P.: *Petrol. Coal* 48, 61 (2006).
8. Tölgyessy P., Hrivňák J.: *J. Chromatogr., A* 1127, 295 (2006).
9. Tölgyessy P., Vrana B., Hrivňák J.: *Chromatographia* 66, 815 (2007).
10. Kružlicová D., Mocák J., Hrivňák J.: *J. Food Nutr. Res.* 47, 37 (2008).
11. Hrivňák J., Kráľovičová E., Tölgyessy P.: *Petrol. Coal* 50, 11 (2008).

**J. Hrivňák<sup>a</sup> and E. Kráľovičová<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Expertise and Analytical Services, Bratislava,* <sup>b</sup>*Regional Authority of Public Health Service, Bratislava, Slovak Republic*):  
**A New on Column Inlet for the Inside Needle Capillary Method**

The needle concentrator in the developed column inlet was directly connected to the capillary column. Eliminating the dead volume of the injection port, the efficiency of the column could be fully exploited. A schematic diagram of the inlet and an example of the benzene, toluene, ethylbenzene and xelenes analysis are presented.

## VYUŽITIE FOTOVOLTAIKY NA VÝROBU VODÍKA ELEKTROLÝZOU VODY

ALEXANDRA KLENOVČANOVÁ,  
TOMÁŠ BRESTOVIČ a IVAN IMRIŠ

*Katedra energetickej techniky, Strojnícka fakulta, Technická univerzita v Košiciach, Vysokoškolská 4, 042 00 Košice, Slovenská republika*  
Alexandra.Klenovcanova@tuke.sk

Došlo 23.8.07, prepracované 23.9.08, prijaté 23.4.09.

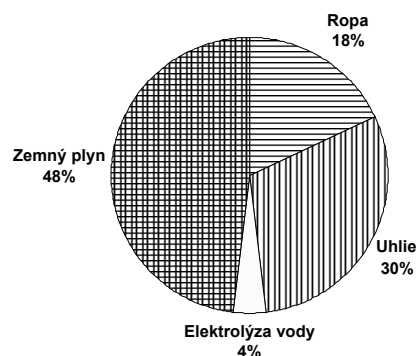
Kľúčové slová: fotovoltaika, alternatívne palivo, vodík, elektrolýza vody, PEM elektrolýzér

### Obsah

1. Úvod
2. Fotovoltaika ako zdroj elektrickej energie potrebnej pre elektrolýzu vody
  - 2.1. Inštalácia a princíp zapojenia fotovoltaického panela do celkovej schémy výroby vodíka
  - 2.2. Voltampérová charakteristika fotovoltaického panela na báze hydrogenovaného amorfného kremíka
3. Výroba vodíka elektrolýzou vody
  - 3.1. Výpočet účinnosti elektrolýzy vody
  - 3.2. Voltampérová charakteristika PEM elektrolýzéra
  - 3.3. Experimentálne skúšky elektrolýzy vody pri rôznej intenzite slnečného žiarenia
4. Diskusia
5. Záver

### 1. Úvod

Vodík je tretím najrozšírenejším prvkom na Zemi, kde sa vyskytuje predovšetkým ako voda a tiež ako súčasť organických zlúčenín. Z hľadiska energetického využitia môžeme vodík zaradiť medzi perspektívne alternatívne palivá, o ktoré je v súčasnosti obrovský záujem jednak z dôvodu ochrany životného prostredia ako aj v dôsledku nárastu spotreby energií, čím dochádza k postupnému vyčerpávaniu zásob fosílnych palív, a teda aj k nárastu cien ich derivátov. Energeticky sa vodík na Slovensku využíval už v druhej polovici 19. storočia, keď ľudia v domácnosti spaľovali predovšetkým svietiplyn, ktorý obsahoval 40 až 60 % vodíka. V súčasnosti sa vodík vo svete využíva predovšetkým v chemickom priemysle na výrobu amoniaku, v petrochemickom priemysle pri rafinácii ropy a v metalurgickom priemysle pri výrobe a rafinácii kovov, čiastoč-



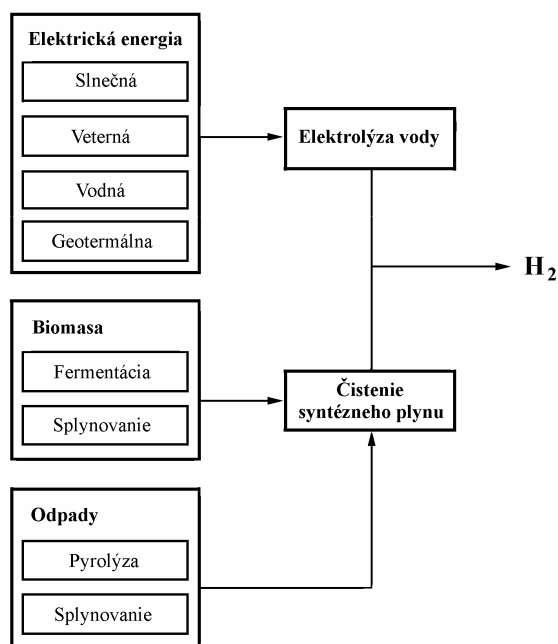
Obr. 1. Spôsoby výroby vodíka

ne sa využíva na výrobu metanolu a len malá časť sa zatiaľ využíva ako palivo. Existujú dva spôsoby využitia vodíka ako paliva. Jedným je spaľovanie vodíka, napr. v spaľovacích motoroch alebo kotloch a druhým je jeho využitie v palivových článkoch. V oboch prípadoch je produktom ekologicky nezávadná voda alebo vodná para. Vzhľadom na to, že elementárny vodík sa v prírode nachádza len v malom množstve, nepredstavuje energetický zdroj a pre energetické účely sa musí vyrábať premenou vhodnej suroviny s použitím inej energie. Vodík je teda len nositeľom energie, ktorý má veľmi dobrú vlastnosť, že pomocou neho sa dá energia akumulovať.

V súčasnosti sa vo svete až 96 % vodíka vyrába termochemicky z fosílnych palív, a to predovšetkým zo zemného plynu. Z termochemických spôsobov sa na výrobu vodíka najčastejšie používa parné reformovanie, ktoré spočíva v štiepení (reformovaní) uhľovodíkov z fosílnych palív vodnou parou. Na výrobu vodíka elektrolýzou vody je potrebné zabezpečiť obrovské množstvo lacnej alebo prebytočnej elektrickej energie, a tak sa v súčasnosti elektrolýzou vody vyrábajú len 4 % vodíka (obr. 1, cit.<sup>1</sup>).

Avšak vzhľadom na nutnosť šetriť primárne energetické zdroje a environmentálne problémy termochemickej výroby vodíka súvisiace predovšetkým s produkciou CO<sub>2</sub> je možné predpokladať, že pri neustálom rozširovaní výroby elektrickej energie z obnoviteľných zdrojov sa výroba vodíka elektrolýzou vody bude čím ďalej tým viac rozširovať. Elektrickú energiu potrebnú na elektrolýzu vody je možné získavať z primárnych a sekundárnych obnoviteľných zdrojov energie, tak ako znázorňuje obr. 2.

Z obr. 2 vidno, že vodík je možné z obnoviteľných zdrojov energie vyrábať buď elektrolýzou vody, pričom elektrickú energiu potrebnú na tento proces je možné získať premenou slnečnej, vodnej, veternej alebo geotermálnej energie alebo sa vodík získava pri čistení syntézneho plynu, ktorý vzniká pri fermentácii a splynovaní biomasy alebo pri pyrolýze a splynovaní odpadov. Medzi perspektívne spôsoby výroby vodíka elektrolýzou vody patrí využívanie slnečnej energie, pomocou ktorej sa elektrická energia produkuje v čase jej nižšej spotreby, napríklad cez deň, a tak by výroba vodíka v podstate predstavovala aku-



Obr. 2. Možnosti výroby vodíka za použitia obnoviteľných zdrojov energie

muláciu slnečnej energie, ktorá by sa dala využívať aj v čase jej vyššej spotreby napríklad v noci.

## 2. Fotovoltaika ako zdroj elektrickej energie potrebnej pre elektrolýzu vody

Premena slnečnej energie priamo na elektrickú energiu sa uskutočňuje pomocou fotovoltaických článkov na princípe vnútorného fotoelektrického javu, pri ktorom dochádza po dopade slnečného žiarenia k uvoľneniu viazaných elektrónov v polovodiči. Vnútorným fotoelektrickým javom sa síce zvýši vodivosť polovodiča, ale nikdy sa nevytvorí potenciálový rozdiel. Potenciálový rozdiel sa vytvorí buď nerovnomerným osvetlením polovodiča, alebo vytvorením článku, tak, že sa spoja dva polovodiče s rôznym typom vodivosti alebo spojením polovodiča s kovom. Najpoužívanejším polovodičovým materiálom na výrobu fotovoltaických článkov sú monokryštály kremíka, pričom účinnosť týchto monokryštálových kremíkových článkov dosahuje hodnoty 16 % (v laboratórnych podmienkach až 24 %). Výroba fotovoltaických článkov z monokryštálov kremíka je drahá a energeticky náročná, a tak sa vývoj zamerá na lacnejšie technológie. Medzi lacnejšie typy fotovoltaických kremíkových článkov patria články vyrobené z polykryštálového kremíka, ktorých účinnosť premeny slnečnej energie na elektrickú sa pohybuje v intervale od 12 do 14 %.

V súčasnosti sa presadzujú na trhu tiež tenkovrstvové fotovoltaické články vyrobené na báze amorfného kremí-

ka. Čistý amorfný kremík je z hľadiska štruktúry na výrobu fotovoltaických článkov nevhodný, a preto sa používa hydrogenovaný amorfný kremík (a-Si:H). Výhody použitia hydrogenovaného amorfného kremíka pre fotovoltaické články ako lacného materiálu vyplývajú z jeho optoelektronických vlastností. Z porovnania závislosti optickej absorpčnej konštanty od vlnovej dĺžky dopadajúceho slnečného žiarenia pre monokryštálový kremík a hydrogenovaný amorfný kremík vyplýva, že hodnoty absorpčnej optickej konštanty vo viditeľnej časti spektra pre hydrogenovaný amorfný kremík sú oveľa vyššie ako pre monokryštálový kremík, čo znamená, že vo fotovoltaickom článku vyrobenom na báze hydrogenovaného amorfného kremíka sa značná časť dopadajúceho slnečného žiarenia absorbuje už vo veľmi tenkej vrstve polovodiča, ktorá sa nanáša na lacný podklad, napr. sklo, oceľ alebo plast. Výroba takýchto fotovoltaických článkov je síce lacnejšia ako výroba fotovoltaických článkov z monokryštálového a polykryštálového kremíka, ale ich účinnosť premeny slnečnej energie na elektrickú je nízka a pohybuje sa len od 3 do 7 % (cit. <sup>1,2</sup>).

Okrem výroby kremíkových fotovoltaických článkov sa testujú aj iné materiály, s ktorými sa teoreticky dá dosiahnuť vyššia účinnosť premeny slnečnej energie na elektrickú ako u kremíkových fotovoltaických článkov, avšak v súčasnosti sa v praxi v širšej miere nevyužívajú. Pre získanie vyššieho napätia alebo prúdu s vyššou intenzitou sa fotovoltaické články spájajú do fotovoltaických panelov.

### 2.1. Inštalácia a princíp zapojenia fotovoltaického panela do celkovej schémy výroby vodíka

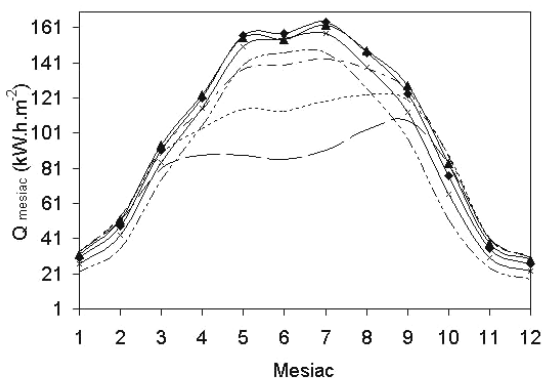
Za účelom premeny energie slnečného žiarenia na elektrickú energiu, ktorá je následne potrebná na výrobu vodíka elektrolýzou vody je na Katedre energetickej techniky Strojnickej fakulty Technickej univerzity v Košiciach nainštalovaný fotovoltaický panel na báze hydrogenovaného amorfného kremíka, ktorého technické parametre dané výrobcom sú uvedené v tab. I.

Medzi charakteristické hodnoty fotovoltaického panela patrí prúd nakrátko ( $I_{SC}$ ) a napätie naprázdno ( $U_{OC}$ ). Prúd nakrátko  $I_{SC}$  je maximálny prúd, ktorý môže fotovol-

Tabuľka I

Technické parametre pre fotovoltaický panel na báze amorfného kremíka

Parameter	Hodnota
Maximálny výkon $P_{max}$ , W	51
Plocha fotovoltaického panela, m <sup>2</sup>	0,78
Napätie naprázdno $U_{OC}$ , V	25
Prúd nakrátko $I_{SC}$ , A	3,3
Maximálne prevádzkové napätie $U_{pmax}$ , V	17,6
Maximálny prevádzkový prúd $I_{pmax}$ , A	2,6

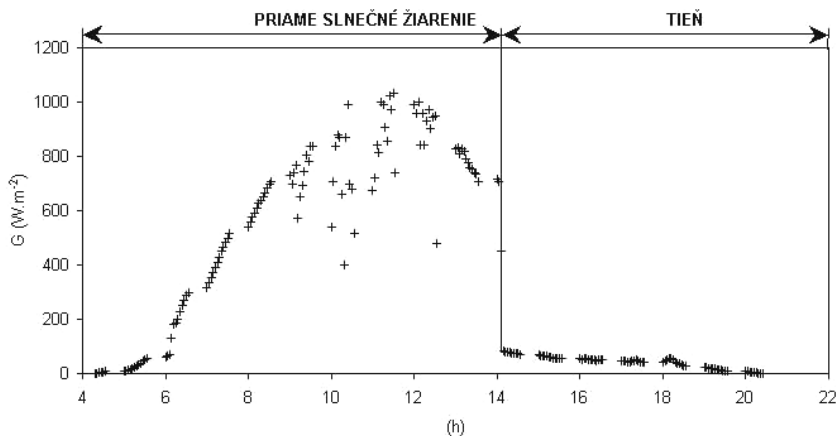


Obr. 3. Priebec priemernej energie slnečného žiarenia dopadajúcej na rôzne sklonené plochy orientované na juh počas roka pre Košice pri znečistení atmosféry  $Z = 3$ ;  $\blacktriangle$ –45°,  $\blacklozenge$ –30°,  $\text{---}$ –0°,  $\text{---x}$ –15°,  $\text{---}$ –60°,  $\text{---}$ –75°,  $\text{---}$ –90°

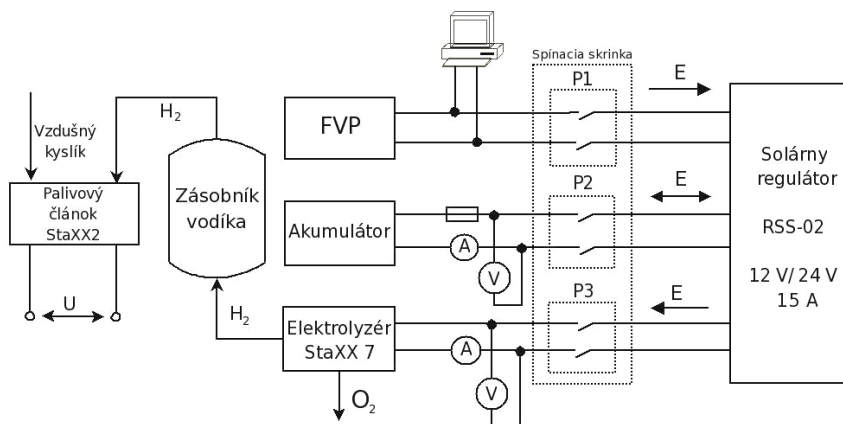
taický panel pri danom ožiarení dodávať. Napätie naprázdno  $U_{OC}$  je maximálne napätie, ktoré sa dosahuje, keď na fotovoltaický panel nie je pripojený žiadny spotrebič. Z tab. I vyplýva, že maximálny výkon, ktorý môže fotovoltaický panel dodávať, je 51 W. Tento dodávaný výkon sa však mení v závislosti od intenzity slnečného žiarenia dopadajúceho na fotovoltaický panel počas dňa, pretože práve svetlom sa uvoľňujú elektróny pre elektrický prúd. Priebec intenzity slnečného žiarenia dopadajúceho na nainštalovaný fotovoltaický panel je meraný pomocou pyranometra a namerané hodnoty sú zaznamenávané dátovou zbernicou systému.

Na základe priebehu priemernej energie slnečného žiarenia dopadajúcej na rôzne sklonené plochy orientované na juh počas roka pre Košice pri znečistení atmosféry  $Z = 3$ , tak ako to znázorňuje<sup>1,3</sup> obr. 3 bol fotovoltaický panel inštalovaný so sklonom 45°.

Na obr. 4 je znázornený príklad nameraného priebehu intenzity slnečného žiarenia dopadajúceho na fotovoltaic-



Obr. 4. Priebec intenzity slnečného žiarenia dopadajúceho na fotovoltaický panel umiestnený na Katedre energetickej techniky Strojnickej fakulty TU v Košiciach počas polooblačného dňa



Obr. 5. Celková schéma výroby vodíka; FVP – fotovoltaický panel, P1, P2, P3 – prepínač, E – tok elektrickej energie



ký panel na báze hydrogenovaného amorfného kremíka počas polooblačného dňa.

Z obr. 4 vyplýva, že fotovoltaický panel je umiestnený tak, že naň dopadá priame slnečné žiarenie len v dopoludňajších hodinách a v popoludňajších hodinách je v tieni budovy. V popoludňajších hodinách, teda výkon panela klesá a elektrolýza vody prebieha pomocou elektrickej energie dodávanej z akumulátora. Pri experimentálnom meraní množstva vyrobeného vodíka v závislosti od intenzity slnečného žiarenia dopadajúceho na fotovoltaický panel bola použitá schéma zapojenia podľa obr. 5, ktorá popisuje celkový meraný systém a možnosti toku elektrickej energie.

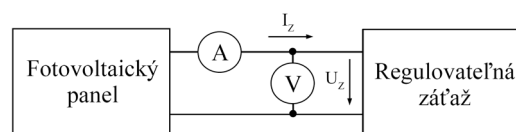
Tok elektrickej energie medzi fotovoltaickým panelom, akumulátorom a elektrolýzom je riadený pomocou solárneho regulátora. Elektrolýza vody prebieha pomocou elektrickej energie dodanej z fotovoltaického panela do vtedy, kým dodávaný výkon, resp. napätie na svorkách panela neklesne pod hodnotu napätia na svorkách akumulátora. V danom okamihu sa začne dodávať zvyšná časť elektrickej energie potrebnej na chod elektrolýzera z akumulátora. Systém začne pracovať v kombinovanej prevádzke a udrží tak elektrický prúd na svorkách elektrolýzera na približne konštantnej hodnote. Naopak pri zvýšení a špičkovom výkone fotovoltaického panela zabezpečí regulátor maximálny prúd pre elektrolýzu a zvyšná časť získanej elektrickej energie sa využije na dobíjanie akumulátora. Pri dostatočnom osvetlení fotovoltaického panela alebo pri dostatočne nabitom akumulátore pripojí solárny regulátor do elektrického obvodu elektrolýzu. Vodík vyrobený elektrolýzou vody je uskladnený a následne využívaný v palivovom článku.

## 2.2. Voltampérová charakteristika fotovoltaického panela na báze hydrogenovaného amorfného kremíka

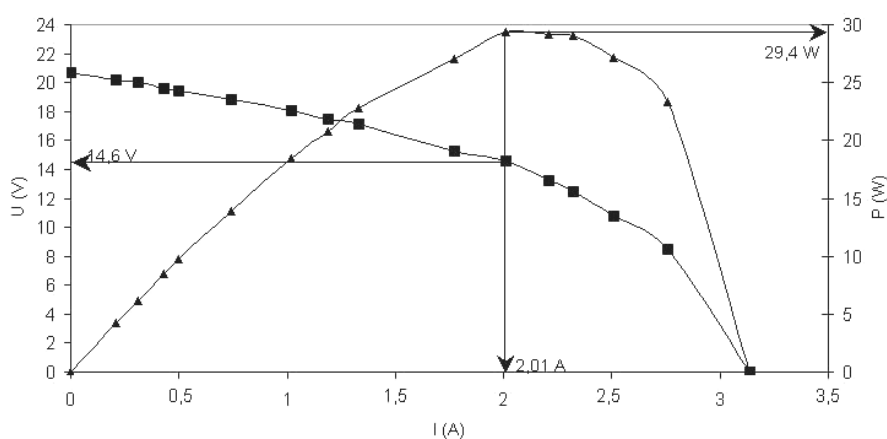
Pre určenie účinnosti premeny slnečnej energie na elektrickú energiu pomocou nainštalovaného fotovoltaického panela na báze hydrogenovaného amorfného kremíka bola nameraná jeho voltampérová charakteristika počas slnečného bezoblačného dňa pri priemernej hodnote intenzity slnečného žiarenia  $1047 \text{ W m}^{-2}$ . Schéma zapojenia pre meranie voltampérovej charakteristiky je znázornená na obr. 6.

Pre získanie voltampérovej charakteristiky fotovoltaického panela boli zaťažené jeho výstupné svorky a bol meraný elektrický prúd a napätie pri takmer konštantnej intenzite slnečného žiarenia. Ako regulovateľná záťaž bol použitý prúdový stabilizátor s výstupnými svorkami zapojenými nakrátko. Pri meraní sa znižoval celkový ohmický odpor záťaže, čím sa zvyšoval pretekajúci elektrický prúd. Nameraná voltampérová charakteristika je spolu s vypočítanou výkonovou charakteristikou graficky znázornená na obr. 7.

Z nameranej voltampérovej charakteristiky vyplýva, že počas slnečného bezoblačného dňa pri priemernej hod-



Obr. 6. Schéma zapojenia pre meranie voltampérovej charakteristiky fotovoltaického panela na báze hydrogenovaného amorfného kremíka



Obr. 7. Voltampérová charakteristika a výkonová charakteristika fotovoltaického panela na báze hydrogenovaného amorfného kremíka; —■— voltampérová charakteristika, —▲— výkonová charakteristika

note intenzity slnečného žiarenia  $G = 1047 \text{ W m}^{-2}$  je fotovoltaickým panelom dodávaný maximálny výkon  $29,4 \text{ W}$ . Účinnosť premeny slnečnej energie na elektrickú energiu vo fotovoltaickom paneli vypočítame podľa vzťahu (1):

$$\eta_p = \frac{I_M \cdot U_M}{S \cdot G} \quad (1)$$

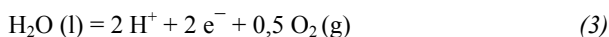
Z nameraných hodnôt prúdu  $I_M = 2,01 \text{ A}$  a napätia  $U_M = 14,6 \text{ V}$ , ktoré odpovedajú maximálnemu výkonu fotovoltaického panela o ploche  $S = 0,78 \text{ m}^2$  pri priemernej intenzite slnečného žiarenia  $G = 1047 \text{ W m}^{-2}$  dostávame účinnosť premeny slnečnej energie na elektrickú energiu vo fotovoltaickom paneli  $3,6 \%$ .

### 3. Výroba vodíka elektrolýzou vody

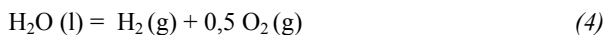
Elektrolýza vody je elektrochemický oxidačno-redukčný dej, pri ktorom sa pomocou dodanej elektrickej energie voda elektrolyticky rozkladá na vodík a kyslík. V procese elektrolýzy vody sa vodík vylučuje na katóde podľa reakcie (2):



Na anóde sa vylučuje ekvivalentné množstvo kyslíka (3):



Sčítaním reakcií (2) a (3) dostaneme sumárnu rovnicu rozkladu vody (4), pričom zo zmeny štandardnej mólovej entalpie  $\Delta H_{298}^\circ$  vyplýva, že reakcia je endotermická:



$$\Delta H_{298}^\circ = 286\,030 \text{ J mol}^{-1}$$

Zmenu štandardnej Gibbsovej energie<sup>4,5</sup> pre reakciu (4) vypočítame podľa vzťahu (5):

$$\Delta G_{298}^\circ = \Delta H_{298}^\circ - T \cdot \Delta S_{298}^\circ \quad (5)$$

kde pre zmenu štandardnej mólovej entropie platí:

$$\Delta S_{298}^\circ = S_{298}^\circ(\text{ H}_2(\text{g})) + 0,5 \cdot S_{298}^\circ(\text{ O}_2(\text{g})) - S_{298}^\circ(\text{ H}_2\text{O}(\text{l})) \quad (6)$$

$$\Delta S_{298}^\circ = 163,27 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

Po dosadení zmeny štandardnej mólovej entalpie  $\Delta H_{298}^\circ = 286\,030 \text{ J mol}^{-1}$  a zmeny štandardnej mólovej entropie  $\Delta S_{298}^\circ = 163,27 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  do vzťahu (5) dostávame:  $\Delta G_{298}^\circ = 237\,376 \text{ J mol}^{-1}$  (7)

Z uvedeného výpočtu vyplýva, že pri elektrolýze vody sa zvýši Gibbsova energia o hodnotu  $237\,376 \text{ J mol}^{-1}$  a entropia sústavy o  $163,27 \text{ J K}^{-1}$ . Z kladnej zmeny entropie vyplýva, že počas chemickej reakcie sa v sústave znižuje usporiadanie, takže pri elektrolytickom rozklade vody

sa musí sústave dodať energia ekvivalentná  $\Delta H_{298}^\circ$ . Podľa vzťahu (7) je teda na elektrolýzu vody potrebné dodať na vylúčenie jedného mólu  $\text{ H}_2$  energiu  $237\,376 \text{ J}$  vo forme elektrickej energie a pri izotermickom procese sa musí z okolia priviesť teplo  $48\,654 \text{ J}$ .

Z hodnoty zmeny štandardnej Gibbsovej energie bolo vypočítané reverzibilné napätie pri štandardných podmienkach ( $298 \text{ K}$ ,  $101\,325 \text{ Pa}$ )<sup>6</sup>:

$$U_{\text{rev}} = \frac{\Delta G_{298}^\circ}{n \cdot F} = \frac{237376}{192969,12} = 1,23 \text{ V} \quad (8)$$

kde  $n$  je počet vymenených nábojov a  $F$  je Faradayova konštanta  $96\,484,56 \text{ C mol}^{-1}$ .

Pri tomto napätí je výťažok elektrolýzy nulový, a preto ak majú v elektrolýze prebiehať elektrochemické reakcie s určitou požadovanou rýchlosťou a účinnosťou, musí cez elektrolýzer pretekať primerane veľký prúd, a teda musíme zvýšiť napätie článku.

Ďalšou dôležitou hodnotou napätia pre priebeh elektrolýzy vody v elektrolýzéroch je hodnota termoneutrálneho napätia. Pre hodnotu termoneutrálneho napätia, pri ktorom elektrolýzer pracuje autotermne, teda celková energia dodávaná vo forme elektrického prúdu sa pri uvedenom napätí využije na udržanie izotermického priebehu elektrolýzy pri štandardných podmienkach ( $298 \text{ K}$ ,  $101\,325 \text{ Pa}$ ) platí:

$$U_m = \frac{\Delta H_{298}^\circ}{n \cdot F} = \frac{286030}{2.96484,56} = 1,48 \text{ V} \quad (9)$$

Pokiaľ elektrolýzer pracuje pri teplote  $298 \text{ K}$  pri napätí v intervale  $1,23$  až  $1,48 \text{ V}$ , odoberá z okolia teplo, a naopak pri vyššom napätí ako  $1,48 \text{ V}$  teplo do okolia odovzdáva a elektrolýzer alebo elektrolyt je potrebné chlaďiť.

#### 3.1. Výpočet účinnosti elektrolýzy vody

Účinnosť elektrolýzy vody prebiehajúcej v elektrolýzere pri danom tlaku, teplote a intenzite slnečného žiarenia dopadajúceho na fotovoltaický panel môžeme vypočítať ako podiel chemickej  $E_{\text{ch}}$  a elektrickej energie  $E_{\text{el}}$  potrebnej na vylúčenie vodíka (10):

$$\eta_{\text{el}} = \frac{E_{\text{ch}}}{E_{\text{el}}} \quad (10)$$

Chemická energia potrebná na vylúčenie vodíka elektrolýzou je daná vzťahom (11):

$$E_{\text{ch}} = n \cdot \Delta H_{298}^\circ \quad (11)$$

kde  $n$  je množstvo vylúčeného vodíka v móloch a  $\Delta H_{298}^\circ = 286\,030 \text{ J mol}^{-1}$

Množstvo vylúčeného vodíka v móloch  $n$  pri danom tlaku a teplote vypočítame zo stavovej rovnice ideálneho plynu:

$$n = \frac{p \cdot V}{R \cdot T} \quad (12)$$

kde  $p$  je atmosferický tlak (Pa),  $T$  je pracovná teplota (K),  $V$  je množstvo nameraného vylúčeného vodíka ( $\text{m}^3$ ) a  $R$  je univerzálna plynová konštanta  $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .

Množstvo elektrickej energie spotrebovanej na elektrolyzu vody vypočítame podľa vzťahu (13):

$$E_{\text{el}} = U \cdot I \cdot \tau \quad (13)$$

kde  $U$  je napätie na svorkách elektrolyzéra (V),  $I$  je prúd dodávaný fotovoltaickým panelom a  $\tau$  je čas trvania elektrolyzy (s).

Po dosadení vzťahov (11), (12) a (13) do vzťahu (10) pre účinnosť elektrolyzy dostávame:

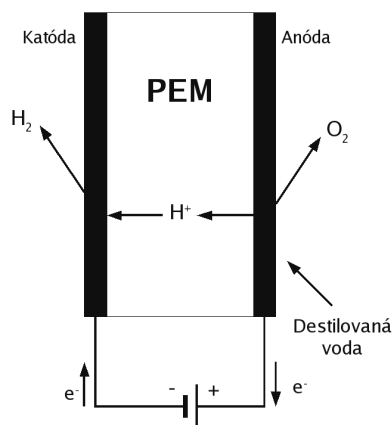
$$\eta_{\text{el}} = \frac{p \cdot V \cdot \Delta H_{298}^{\circ}}{R \cdot T \cdot U \cdot I \cdot \tau} \quad (14)$$

### 3.2. Voltampérová charakteristika PEM elektrolyzéra

Pri experimentálnych skúškach výroby vodíka elektrolyzou vody pomocou elektrickej energie získanej premenou slnečnej energie vo fotovoltaickom panele bol použitý typ elektrolyzéra s tuhú PEM membránou (Proton Exchange Membrane – iónomeničová membrána), ktorá umožňuje priamy prevod prúdu prostredníctvom protónov  $\text{H}^+$  (obr. 8). Veľkou výhodou uvedeného typu elektrolyzéra s membránou je, že pri elektrolyze sa nepoužíva elektrolyt s obsahom hydroxidu draselného, ale čistá voda. Maximálny príkon elektrolyzéra StaXX7 daný výrobcom je 50 W pri 14 V. Maximálna produkcia vodíka je  $230 \text{ ml min}^{-1}$ .

Pred experimentálnymi skúškami výroby vodíka bola nameraná voltampérová charakteristika elektrolyzéra StaXX7, ktorý je tvorený siedmimi anódo-katódovými bipolárne usporiadanými dvojicami elektród. Funkčný povrch elektródy má prierez  $16 \text{ cm}^2$ , čo pri maximálnom prúde 4 A predstavuje prúdovú hustotu  $25 \text{ A dm}^{-2}$ .

Na základe merania voltampérovej charakteristiky elektrolyzéra bolo zistené, že obmedzujúcimi hodnotami pri elektrolyze je napätie 14 V a prúd 4 A, pričom rozsah prevádzkového napätia elektrolyzéra je 10,5 až 14 V. Výroba vodíka elektrolyzou vody pomocou elektrickej energie dodávanej priamo z fotovoltaického panela prebieha pri napätí vyššom ako 10,5 V. Ak je napätie oveľa vyššie ako 10,5 V, spolu s elektrolyzou vody bude nastávať aj uskladnenie prebytočnej elektrickej energie získanej priamo z fotovoltaického panela do akumulátora. V prípade, že napätie je menšie ako 10,5 V, elektrolyza vody môže

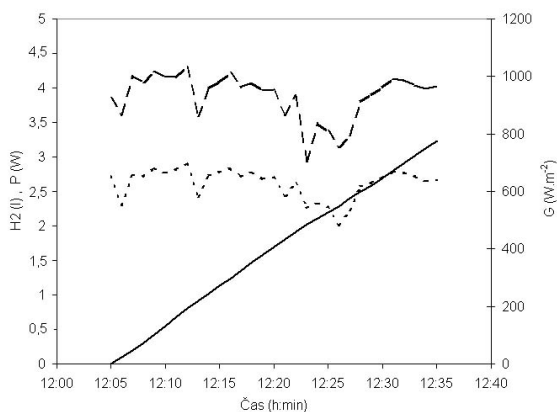


Obr. 8. Schéma elektrolyzéra s tuhú PEM membránou

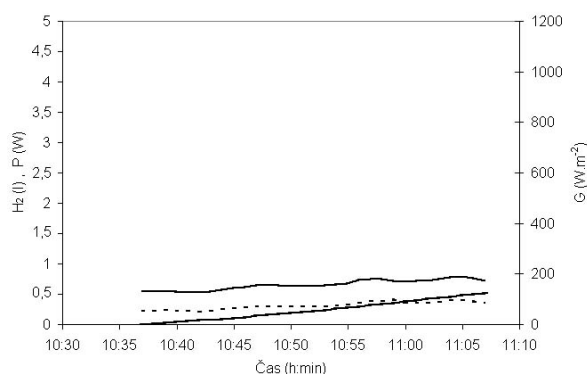
prebiehať len pomocou elektrickej energie dodávanej z akumulátora.

### 3.3. Experimentálne skúšky elektrolyzy vody pri rôznej intenzite slnečného žiarenia

Experimentálne skúšky výroby vodíka elektrolyzou vody pri rôznej intenzite slnečného žiarenia sa uskutočnili len pomocou elektrickej energie dodanej fotovoltaickým panelom, a to počas slnečného dňa 2.7.2007 a dňa 4.7.2007 v čase keď bolo zamračené. V oboch prípadoch sa počas elektrolyzy vody meralo napätie na svorkách elektrolyzéra, elektrický prúd dodávaný fotovoltaickým panelom, intenzita dopadajúceho slnečného žiarenia, množstvo vyrobeného vodíka, tlak a teplota plynu. Pribeh meraní je pre jednotlivé dni znázornený na obr. 9 a 10 ako závislosť množstva vyrobeného vodíka, výkonu fotovoltaického panela a intenzity slnečného žiarenia od času trvania elektrolyzy.



Obr. 9. Množstvo vyrobeného vodíka, výkon fotovoltaického panela a priebeh intenzity slnečného žiarenia počas slnečného dňa 2.7.2007; —  $\text{H}_2$  (l), - - - P (W), - - - - G ( $\text{W m}^{-2}$ )



Obr. 10. Množstvo vyrobeného vodíka, výkon fotovoltaického panela a priebeh intenzity slnečného žiarenia počas zamračeného dňa 4.7.2007; — H<sub>2</sub> (l), - - - P (W), . . . . G (W m<sup>-2</sup>)

#### 4. Diskusia

Účinnosť elektrolyzy vody počas slnečného dňa 2.7.2007 a počas zamračeného dňa 4.7.2007 bola vypočítaná podľa vzťahu (14). Vynásobením vzťahu (14) pre účinnosť elektrolyzéra a vzťahu (1) pre účinnosť fotovoltaického panela dostávame celkovú účinnosť  $\eta_{\text{cel}}$  výroby vodíka elektrolyzou vody pomocou elektrickej energie získanej premenou slnečnej energie vo fotovoltaickom paneli na báze hydrogenovaného amorfného kremíka (15):

$$\eta_{\text{cel}} = \eta_{\text{el}} \cdot \eta_{\text{p}} \quad (15)$$

Namerané a vypočítané hodnoty jednotlivých veličín sú sumárne uvedené v tab. II.

Z porovnania nameraných a vypočítaných hodnôt uvedených v tab. II vyplýva, že účinnosť elektrolyzy vody počas zamračeného dňa 4.7.2007 pri priemernej intenzite slnečného žiarenia 163 W m<sup>-2</sup> je vyššia ako účinnosť elek-

Tabuľka II

Vyhodnotenie experimentálnych skúšok výroby vodíka elektrolyzou vody počas jasného a zamračeného dňa

Parameter	Slnečný deň 2.7.2007	Zamračený deň 4.7.2007
$p$ , Pa	98 800	97 900
$U$ , V	13,66	10,74
$T$ , K	297	297
$I$ , A	1,91	0,29
$G$ , W m <sup>-2</sup>	931	163
$\tau$ , min	30	30
Množstvo vyrobeného vodíka pri štandardných podmienkach, ml s <sup>-1</sup>	1,79	0,29
Účinnosť elektrolyzy $\eta_{\text{el}}$ , %	79	91
Celková účinnosť $\eta_{\text{cel}}$ , %	2,8	2,5

trolýzy vody počas slnečného dňa 2.7.2007 pri priemernej intenzite slnečného žiarenia 931 W m<sup>-2</sup>.

Pri elektrolyze vody sa v elektrolyzére časť elektrickej energie mení na teplo  $Q$ , ktoré je definované vzťahom (16):

$$Q = R \cdot I^2 \cdot \tau \quad (16)$$

kde  $R$  je elektrický odpor, pre ktorú platí

$$R = U/I \quad (17)$$

To znamená, že účinnosť elektrolyzy vody pri zamračenej oblohe pri napätí 10,74 V a prúde 0,29 A je vyššia ako je účinnosť elektrolyzy vody pri slnečnej oblohe pri napätí 13,66 V a prúde 1,91 A nakoľko v prvom prípade sa vyvinulo 5606 J tepla, zatiaľ čo v druhom prípade sa vyvinulo až 46 963 J tepla. Celková účinnosť výroby vodíka elektrolyzou vody pomocou elektrickej energie získanej z fotovoltaického panela pri vyššej intenzite slnečného žiarenia 931 W m<sup>-2</sup> bola vyššia ako pri zamračenej oblohe, keď intenzita slnečného žiarenia bola 163 W m<sup>-2</sup>. Pri vyššej intenzite slnečného žiarenia sa vyrobilo 1,79 ml s<sup>-1</sup> vodíka, zatiaľ čo pri nižšej intenzite slnečného žiarenia sa vyrobilo len 0,29 ml s<sup>-1</sup> vodíka.

#### 5. Záver

Energetické zdroje, ktoré má ľudstvo k dispozícii, a ktorými pokrýva svoje energetické potreby môžeme v súčasnosti považovať za veľmi početné a relatívne aj bohaté. Aj napriek tomu, že uhlie ako energetický zdroj sa významnou mierou podieľa na znečisťovaní životného prostredia, hrá dôležitú úlohu v súčasnosti pri výrobe elektrickej energie. Technický rozvoj sice umožnil zredukovať emisie oxidov sýry a dusíka, ale neexistuje podobné riešenie pre oxid uhličitý, ktorý sa významnou mierou podieľa na zvýšenom skleníkovom efekte. Zemný plyn a ropa predstavujú o to cennejšie zdroje energie, že sú ľahšie transportovateľné a v prípade zemného plynu je jeho energetické využívanie ekologickejšie ako pri používaní uhlia.

Vzhľadom na to, že zásoby fosílnych palív sa postupne vyčerpávajú a v dôsledku nárastu ľudskej populácie je možné predpokladať, že spotreba energie bude neustále rásť, vynakladá sa v súčasnosti značné úsilie na hľadanie nových alternatívnych palív. Tieto alternatívne palivá by mali byť adekvátnou náhradou fosílnych palív z hľadiska energetického obsahu, s minimálnym negatívnym vplyvom na životné prostredie, a pritom ich zásoby by nemali byť obmedzené. Medzi takéto energetické zdroje zaraďujeme primárne a sekundárne zdroje energie.

Veľmi výhodnou kombináciou je uskladniť získanú energiu z obnoviteľných zdrojov vo forme vodíka. Technológiu vodíkovej energetiky možno jednoducho aplikovať napr. v domoch a komerčných budovách s využitím fotovoltaických strešných panelov. Vodík sa môže skladovať na neskoršie použitie v palivových článkoch alebo sa môže prepravovať do podzemných zásobníkov pomocou existujúcej plynovej distribučnej siete.

Vstupné náklady na zariadenie pre výrobu vodíka sú

vysoké, pretože je potrebné aplikovať špeciálne komponenty a zaviesť nové technológie. Ale na druhej strane prevádzkové náklady sú minimálne. Investičné náklady by mohli klesať s počtom inštalovaných systémov. Očakáva sa, že vodík vyrábaný zo slnečnej energie bude môcť konkurovať s ropou, a to hlavne vtedy, ak budú zohľadnené environmentálne aspekty a nestabilita spojená s dodávkou ropy.

#### LITERATÚRA

1. Klenovčanová A., Imriš I.: *Zdroje a premeny energie*. ManaCon, Prešov 2006.
2. Fahrenbruch A. L., Bube R. H.: *Fundamentals of Solar Cells, Photovoltaic Solar Energy Conversion*. Academic Press, New York 1983.
3. Cihelka J.: *Solární tepelná technika*. Nakladatelství T. Malina, Praha 1994.
4. Komorová E., Imriš I.: *Termodynamika v hutnictve*. Alfa, Bratislava 1991.
5. Lebbal M., Zhao T., François B, Lecoeuche S.: *II. Proceedings of International Hydrogen Energy Congress and Exhibition IHEC 2007: Dynamic electric modelling of electrolyser and hydrogen production regulation, Istanbul, Turkey, 13-15 July 2007*, str. 1.
6. Peavey M. A.: *Fuel from water*, Energy Independence with Hydrogen, Merit, Inc., Louisville 2003.

**A. Klenovčanová, T. Brestovič, and I. Imriš**  
(*Department of Energy Technology, Faculty of Mechanical Engineering, Technical University, Košice, Slovak Republic*): **Hydrogen Production by Water Electrolysis Using Photovoltaic Solar Module**

Fossil fuels as energy sources, in particular oil and natural gas, are running out. Another problem associated with their use is the carbon dioxide production. To avoid the problems the methods of using and producing energy must be changed. Attention is currently devoted to production of hydrogen by water electrolysis in electrolyzers with proton-exchange membranes. The required electric energy is obtained from solar photovoltaic modules with amorphous silicon. The efficiency of the electrolysis and total recovery of hydrogen production have been calculated. The hydrogen thus obtained can be directly used for heat production by combustion or via fuel cells for electricity and heat production.

---

## ZPRÁVY

---

### **40. Zasedání Divize analytické chemie Evropské asociace pro chemické a molekulární vědy (Division of Analytical Chemistry of the European Association for Chemical and Molecular Science)**

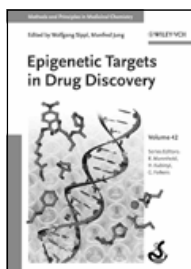
40. výroční zasedání DAC EuCheMS proběhlo 6. září 2009 v Innsbrucku v návaznosti na mezinárodní konferenci EUROANALYSIS XV, která se konala ve dnech 6.–10. září 2010 rovněž v Innsbrucku, a která patří mezi největší evropské analytické konference. V této souvislosti je potěšitelné, že této významné konferenci se zúčastnilo 36 vědců z České republiky, čímž jsme obsadili čestné 4. místo v pomyslné soutěži národních účastí na této konferenci. Lze jen doufat, že tento trend bude pokračovat i v budoucích konferencích této úspěšné řady. Autor tohoto článku přednesl na této konferenci jako jeden z mála českých účastníků ústní referát na téma “New Electrode Materials and Arrangements for Voltammetric and Amperometric Determination of Organic Environmental Pollutants”. Zasedání DAC se zúčastnili zástupci 25 evropských chemických společností z 21 evropských zemí. Byly na něm projednány otázky související s činností DAC, příprava analytické sekce na 3. Evropském chemickém kongre-

su v Norimberku (29. srpna – 20. září 2010) a na 4. Evropském chemickém kongresu v Praze (26.–30. srpna 2012), jehož pořádáním byla pověřena Česká společnost chemická, příprava konference EUROANALYSIS XVI, která proběhne 11.–15. září 2011 v Bělehradě a konference EUROANALYSIS XVII, která se bude konat ve Varšavě ve dnech 25.–29. srpna 2013.

Účast zástupce České společnosti chemické na práci DAC FECS byla umožněna jednak grantem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci projektu INGO LA 273 (2009) (Reprezentace české analytické chemie v Evropské asociaci pro chemické a molekulární vědy) a jednak laskavou podporou firem Merck s.r.o. Praha a ChromSpec, Praha. Je milou povinností autora poděkovat výše uvedeným firmám za jejich pochopení a podporu aktivit České společnosti chemické a odborné skupiny analytické chemie. Všechny materiály související s činností DAC EuChEMS jsou k dispozici na níže uvedené adrese.

*Jiří Barek,  
zástupce České společnosti chemické v DAC EuCheMS  
Katedra analytické chemie PřF UK, Albertov 2030,  
128 43 Praha 2, tel: 221 951 224,  
E-mail: Barek@natur.cuni.cz*

## RECENZE



Wolfgang Sippl, Manfred Jung,  
ed.  
**Epigenetic Targets in Drug  
Discovery**

Vydal Wiley-VCH, Weinheim, 2009.  
Cena 129 Euro.  
ISBN 978-3-527-32355-5

V oblasti lékařské a molekulární genetiky se po několika desetiletí hromadily jevy a skutečnosti, které se do klasického konceptu genetiky nehodily. Nakonec se jich nakupilo tolik, že daly dohromady nový podobor – epigenetiku. Klasickou epigenetickou studií je například ta, která ukázala, že hladina exprese glukokortikoidového receptoru v myších hypokampech je ovlivněna mírou mateřské péče, kterou byly myši obdařeny<sup>1</sup>. Tato péče ovlivňuje metylaci DNA a následně enzymovou modifikaci histonů v oblasti genu pro daný receptor a tím i jeho expresi. Zároveň tyto modifikace zůstávají určitým způsobem zapsány v genetickém materiálu, nikoliv však přímo v sekvenci DNA. Cílem designerů nízkomolekulárních inhibitorů takovýchto enzymů není nahrazovat myším mateřskou lásku, ale využít jejich terapeutického potenciálu při léčbě onemocnění, a to hlavně nádorových. Epigenetické modifikace jsou rovněž zajímavé z hlediska studia kmenových buněk a buněčné diferenciaci.

Pokud v názvu knihy najdete slovo epigenetika nebo epigenetický, pak od takovéto knihy můžete očekávat prakticky cokoli. Pokud je ale název „*Epigenetic Targets in Drug Discovery*“, pak je obsah zúžen na enzymy, které modifikují DNA nebo histony. Mezi ně patří DNA-methyltransferasy, histonmethyltransferasy, histonacetyltransferasy, histondeacetylasy a histondemethylasy. Pro chemiky se zájemem o enzymatickou katalýzu (a katalýzu vůbec) je jistě zajímavá rozmanitost reakcí. Například deacetylase histonů může probíhat poměrně přímočaře hydrolyzou (pomocí „klasických“ histondeacetylase) nebo překvapivě přenosem acetylu na molekulu NAD<sup>+</sup> za současného odštěpení nikotinamidu (pomocí tzv. sirtuinů). Chemicky náročnější štěpení vazby C–N při demethylaci probíhá tak, že je methylová skupina hydroxylována a vzniklá skupina HO–CH<sub>2</sub>–NH– se pak spontánně rozpadá na formaldehyd.

První dvě kapitoly knihy představují biologické základy a terapeutický potenciál epigenetických cílů léčiv. Další kapitoly se věnují strukturní biologii epigenetických cílů a počítačovým metodám pro vývoj ligandů (nejprve přehled metod a pak přehled jejich úspěšných aplikací v oblasti epigenetiky). Díky tomu, že se epigenetické cíle léčiv dostaly do popředí zájmu poměrně nedávno, je podíl virtuálního screeningu<sup>2</sup> a dalších počítačových postupů při vývoji těchto inhibitorů poměrně výrazný. Následuje popis

experimentálních metod studia epigenetických modifikací pomocí hmotnostní spektrometrie, *in vitro* a *in vivo* studií a metody ChIP (imunoprecipitace chromatinu). Další část tvoří kapitoly věnované jednotlivým enzymům s jejich detailnějším popisem.

Studium epigenetiky, epigenetických cílů léčiv a design jejich inhibitorů již přinesly řadu úspěchů ve formě sloučenin, které procházejí klinickými testy a již několik klinicky užívaných léčiv (pokud je mi známo, jedná se o Vidaza<sup>TM</sup> s českým rodokmenem, Dacogen<sup>TM</sup>, Zolinza<sup>TM</sup> a léky založené na kyselině valproové). Kniha editovaná Wolfgangem Sipplem a Manfredem Jungem je určena pro každého, kdo si chce s touto oblastí udržet kontakt. Pokud je nutné knize něco vytknout, pak dle mého názoru není enzymové názvosloví mrtvé ani v době databází a uvedení systematických názvů enzymů a EC označení by zvýšilo přehlednost knihy. Rovněž by knize prospělo, kdyby uvedené prostorové struktury byly doplněny čtyřznakovými PDB kódy, aby je čtenář nemusel pracně dohledávat. Hlavní problém knihy (který ale není možné autorům a editorům nijak vyčítat) je, že se kniha stává už od svého vydání zastaralou v důsledku záplavy nových výsledků v této oblasti.

Vojtěch Spiwok

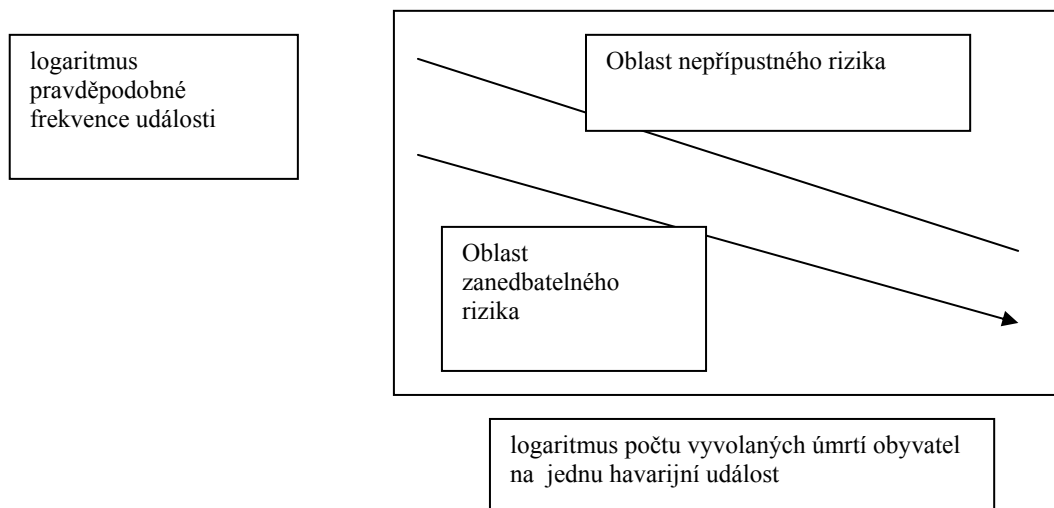
## LITERATURA

1. Weaver I. C. G., Cervoni N., Champagne F. A., D'Alessio A. C., Sharma S., Seckl J. R., Dymov S., Szyf M., Meaney M. J.: *Nature Neurosci.* 7, 847 (2004).
2. Spiwok V., Králová B.: *Chem. Listy* 103, 52 (2009).

Center for Chemical Process Safety (American Institute of Chemical Engineers)  
**Guidelines for Developing Quantitative Safety Risk Criteria**

John Wiley and Sons, New Jersey, 2009  
ISBN 978-0-470-26140-8

Kniha je zaměřena na osvětlení úlohy oficiálních legislativních kritérií pro hodnocení rizika pro obyvatele v okolí chemických výroben, která jsou v různých státech aplikována jako kritéria legislativní pro povolování výroby v dané výrobě (tzv. permitt) a pro plánování výstavby občanských staveb v okolí výroby. Důvodem vydání publikace je skutečnost, že ve většině států jsou vydány doporučující normy, které určují dvě hranice rizika procesu pro obyvatele v okolí:  
Nejvyšší přípustné riziko.  
Zanedbatelné riziko.



Základní představa pro určení oficiálních hranic rizika je odvozena z grafu v logaritmických souřadnicích: závislost frekvence pravděpodobnosti výskytu události na jejím škodlivém účinku. Škodlivý účinek je charakterizován pro veřejnost počtem vyvolaných úmrtí obyvatel v okolí, na jednu havarijní situaci. Jiné charakteristiky účinku havárie, např. materiální škoda pro výrobce či materiální škody pro obyvatele v okolí nejsou v knize zahrnuty.

Legislativní hodnoty kritérií v jednotlivých státech se liší jednak polohou přímek, která celkově určuje náročnost kritérií, jednak směrnici přímek, která určuje, zda je větší váha přisuzována malým haváriím s vysokou četností nebo velkým haváriím s nízkou četností.

#### Co odborník v publikaci najde (kniha je napsána v angličtině):

Přehled akronymů a zkratk používaných v oblasti bezpečnosti chemických výroby a ochrany životního prostředí, např. zkratky veličin, institucí a dokumentů (3 strany).

Vysvětlení pojmů používaných v oblasti bezpečnosti chemických výroby a ochrany životního prostředí (8 stran).

Přehled legislativní literatury ve světě (15 stran).

Přehled oficiálních kritérií kladených na chemické

výroby v různých státech a jejich porovnání (40 stran).

Obecné zkušenosti z oboru hodnocení rizika, například zkušenosti s vnímáním rizika veřejností.

#### Co odborník v publikaci nenajde:

Publikace předpokládá, že charakteristiky havárií (frekvence výskytu havárie, důsledky havárie) jsou známy a cílem postupu je tyto údaje zpracovat a hodnotit. V publikaci nejsou uvedeny postupy jak tyto údaje získat:

Způsob vyhodnocování pravděpodobnosti výskytu havárie a vyhodnocování možného účinku. Údaje o frekvenci selhání čerpadel či jiných zařízení.

Statistické údaje o frekvenci havárií jistého typu.

Publikace je tedy velmi zajímavá z hlediska obecné filosofie analýzy rizik, ale není přímo použitelná jako příručka k praktické aplikaci analýzy rizika (jako např. publikace označovaná běžně názvem „Purple Book“).

#### Závěr

Publikace je zajímavým a poučným čtením pro specialisty chemických podniků v oboru bezpečnosti chemických výroby a velmi atraktivní knihou pro pracovníky angažované v legislativě bezpečnosti chemických výroby, například na Ministerstvu životního prostředí.

Josef Horák



# Frontiers of Chemistry: From Molecules to Systems

A One-Day Symposium

On 21<sup>st</sup> May 2010 in Paris

at the Maison de la Chimie

(near the Eiffel Tower and Les Invalides)

## Speakers



Gerhard Ertl  
Nobel Prize 2007



Jean-Marie Lehn  
Nobel Prize 1987



Roger Y. Tsien  
Nobel Prize 2008



Ada Yonath  
Nobel Prize 2009



Luisa De Cola



Alan R. Fersht



Marc Fontecave



Michael Grätzel



Michel Orrit



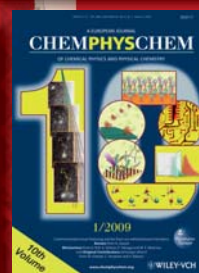
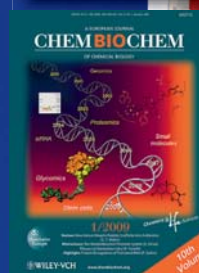
Nicolas Winssinger

## Posters

will be displayed also online from 1st April.

[www.chembiophyschem.org](http://www.chembiophyschem.org)

Celebrating 10 Years of



## Scientific committee

E. Amouyal, M. Che,  
F.C. De Schryver,  
A. R. Fersht, P. Göllitz,  
J.T. Hynes, J.-M. Lehn

## Topics

catalysis, biochemical imaging,  
chemical biology, bionanotechnology,  
proteomics, spectroscopy, solar cells

530320908



WILEY-VCH

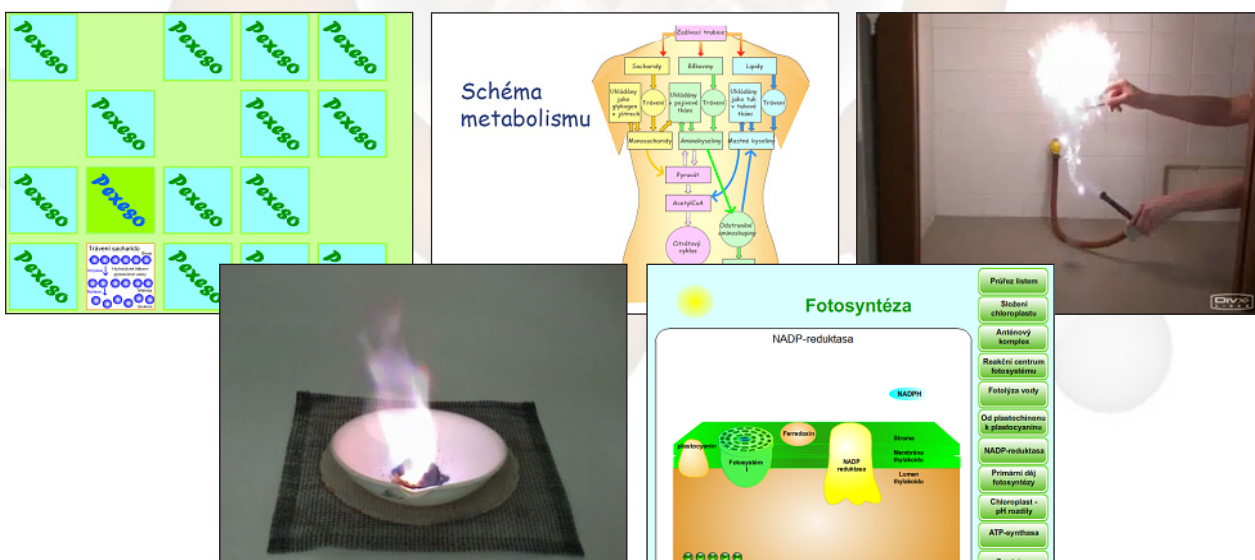


*www.studiumchemie.cz*  
portál PŘF UK na podporu výuky chemie na ZŠ a SŠ

Portál [www.studiumchemie.cz](http://www.studiumchemie.cz) je podpůrným webem určeným pro středoškolské učitele chemie a jejich žáky. Web je naplněn vzdělávacími a výukovými materiály, které byly z převážné většiny vytvořeny na Katedře učitelství a didaktiky chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Součástí webu jsou:

- » interaktivní didaktické hry
- » pracovní listy
- » videa chemických experimentů
- » kompletní i dílčí výukové a studijní materiály
- » metodická, odborná i technická podpora
- » odpovědná zvědavých dotazů
- » editor testů pro učitele
- » chemické online testy
- » a další



Web je dostupný ze tří adres:

[www.studiumchemie.cz](http://www.studiumchemie.cz)

[www.natur.cuni.cz/studiumchemie](http://www.natur.cuni.cz/studiumchemie)

[www.vyukachemie.cz](http://www.vyukachemie.cz)



# 62. sjezd asociací českých a slovenských chemických společností

28. – 30. června 2010, Pardubice

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

62. sjezd asociací českých a slovenských chemických společností se koná při příležitosti oslav šedesátého výročí vysokého školství v Pardubicích pod záštitou děkana Fakulty chemicko-technologické.

## Sekce sjezdu

- Anorganická chemie (včetně bioanorganické); garant: **I. Lukeš**
- Organická chemie (včetně bioorganické a farmaceutické); garant: **M. Sedlák**
- Analytická chemie (včetně bioanalytické); garant: **M. Holčapek**
- Fyzikální, teoretická a počítačová chemie; garant: **P. Čársky, M. Urban**
- Anorganické, kompozitní a polymerní materiály (včetně organických polymerů); garant: **Mir. Vlček, A. Kalendová**
- Přírodní látky (fytoceutika, biologická aktivita, fytofarmaka); garant: **V. Šimánek**
- Chemické vzdělávání, historie a popularizace chemie, garant: **H. Čtrnáctová**
- Průmyslová chemie (ChemProgres); garant: **J. Hanika**
- Potravinářská chemie (včetně doplňků stravy, nutraceutik); garant: **J. Královský**
- Nanotechnologie (nanomateriály a nanotechnologie materiálově-chemického směru) garant: **G. S. Martynková** (ve spolupráci s projektem OP VpK – „TEAM – CMV“)
- Termická analýza a kalorimetrie; garant: **P. Šulcová**
- Environmentální inženýrství; garant: **J. Chýlková**

**Organizační výbor:** předseda – T. Wágner, H. Pokorná, A. Vlková, R. Řápková, K. Ventura, P. Mikulášek, L. Svoboda, P. Kalenda, Mir. Vlček, R. Svoboda, V. Zima, A. Růžička, A. Komárková, L. Vařeková, M. Rolečková, B. Frumarová

**Vědecký výbor:** předseda – M. Frumar, J. Ulrichová, M. Drábik a odborní garanti jednotlivých sekcí

## Předběžný program

### Pondělí 28. 6. 2010

Registrace, ubytování (sjezdová kancelář recepce nové budovy Fakulty chemicko-technologické, Pardubice – Polabiny)

Slavnostní zahájení (Aula Arnošta z Pardubic, Univerzita Pardubice)

Plenární přednášející: prof. Dr. Michael Graetzel, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne Laboratoire de Photonique et Interfaces, Lausanne, Švýcarsko

Koncert

Uvítací večer

### Úterý 29. 6. 2010

Plenární přednášky

Přednášky v sekcích, minisymposia

Zahájení všech plakátových sdělení a výstavy (prostory nové budovy FChT Pardubice – Polabiny), večer – raut s vyhlášením vítěze CENY SHIMADZU 2010

### Středa 30. 6. 2010

Plenární přednášky

Přednášky v sekcích, minisymposia

Vyhlášení vítězů plakátových sdělení a „Wine, cheese and ginger bread party“

### Čtvrtek 1. 7. 2010

Exkurze, výlety

## Termíny:

řádná registrace do 21. března 2010

pozn.: abstrakt je nutno zaslat společně s registračním formulářem

## Poplatky\*:

účastník, člen**	4400,- Kč
účastník, nečlen**	5400,- Kč
student, člen**	3300,- Kč
student, nečlen**	4400,- Kč

\* uvedené ceny jsou včetně DPH

\*\* AČChS, ASChFS, SChS, ČSCh

pozn.: poplatek zahrnuje konferenční materiály, občerstvení a společenský program

## Kontakty:

**62.sjezd@upce.cz**

tomas.wagner@upce.cz

miloslav.frumar@upce.cz

Veškeré aktuální informace najdete na internetové adrese: <http://sjezdCsSch2010.upce.cz>.

<b>OBSAH</b>		<b>CONTENTS</b>	
<b>ÚVODNÍK</b>	85	<b>EDITORIAL</b>	85
<b>REFERÁTY</b>		<b>REVIEW ARTICLES</b>	
<b>Metody předpovědi koloidní stability piva</b>	86	<b>Methods for Prediction of Beer Colloidal Stability</b>	86
M. Dienstbier, L. Janková, P. Sladký a P. Dostálek		M. Dienstbier, L. Janková, P. Sladký, and P. Dostálek	
<b>Steroidní fytohormony: funkce, mechanismus účinku a význam</b>	93	<b>Steroid Phytohormones: Function, Mechanism of Action, Significance</b>	93
M. Kamlar, O. Uhlík, L. Kohout, J. Harmatha a T. Macek		M. Kamlar, O. Uhlík, L. Kohout, J. Harmatha, and T. Macek	
<b>Validované počítačové modely – Quantitative Structure – Activity Relationship Tool Box</b>	100	<b>Tools for Development of Validated Computer Models – QSAR Application Tool Box</b>	100
M. Rucki a M. Tichý		M. Rucki and M. Tichý	
<b>Protirakovinové taxánové přírodní látky</b>	103	<b>Natural Anticancer Taxane Compounds</b>	103
M. Maruna, M. Šturdíková a P. Ondrejčíková		M. Maruna, M. Šturdíková, and P. Ondrejčíková	
<b>Nebezpečný patogen <i>Enterobacter sakazakii</i> a jeho detekce</b>	113	<b>Dangerous Pathogen <i>Enterobacter sakazakii</i> and Its Detection</b>	113
M. Blažková, L. Fukal a P. Rauch		M. Blažková, L. Fukal, and P. Rauch	
<b>LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY</b>		<b>LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS</b>	
<b>Nový plynovochromatografický dávkovací priestor pre metódu ihlového adsorpčného koncentrátora</b>	119	<b>A New on Column Inlet for the Inside Needle Capillary Method</b>	119
J. Hrivňák a E. Kráľovičová		J. Hrivňák and E. Kráľovičová	
<b>Využitie fotovoltaiiky na výrobu vodíka elektrolýzou vody</b>	122	<b>Hydrogen Production by Water Electrolysis Using Photovoltaic Solar Module</b>	122
A. Klenovčanová, T. Brestovič a I. Imriš		A. Klenovčanová, T. Brestovič, and I. Imriš	
<b>ZPRÁVY</b>	130	<b>NEWS</b>	130
<b>RECENZE</b>	131	<b>BOOK REVIEWS</b>	131

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 104 (2010), čís./no. 2 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 134, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 120 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTOŘI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hetflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/ FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc), Z. Kolská (Ústí nad Labem) • KONZULTANT/ CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, M. Koman, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://www.chemicke-listy.cz> • TISK: Rodomax s.r.o., Rezecká 1164, 549 01 Nové Město nad Metují; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2010 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 170 Kč, roční plné předplatné 2010 (12 čísel) 1730 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 865 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 92 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 70 EUR (doručování via SCHS), 258 EUR (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2010 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: P. Holý • Dáno do tisku 1.2.2010.