BIOPROSPECT

Osmnáctý ročník
Číslo 2/2008

Adresa společnosti: VŠCHT v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6, tel.: 220 443 151, fax: 233 334 769, e-mail: Danka.Pokorna@vscht.cz, IČO 00570397, číslo účtu: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

BULLETIN

BIOTECHNOLOGICKÉ

SPOLEČNOSTI

zakládajícího člena Českého svazu vědeckotechnických společností (ČSVTS)
a
člena „European Federation of Biotechnology“ (EFB)

Redakční rada

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor in Chief)

Prof. Ing. Jan Káš, DrSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

Doc. Ing. Alena Čejková, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Milan Fránek, DrSc.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství
Hudcova 70, 621 32 Brno

Ing. Petra Lipovová, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
(Editor)

RNDr. Vladimír Vala
Ivax, Ostravská 29, 747 70 Opava

http://bts.vscht.cz

B
I
PROSPECT

18th Volume
No. 2/2008

Society address: Institute of Chemical Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitaly important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak market, or are projected enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive commitee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperations with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech and Slovak Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech and Slovak biotechnologists.

For more information contact the editorial board or directly:
Ladislav Fukal, Ph.D. (editor in chief)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 445 137
e-mail: fukall@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

v těchto letních měsících se Vám dostává do rukou naše druhé letošní číslo Bioprospectu. Dovolte mi, abych Vám připomenul některé události, které proběhly v nedávné době. Za připomenutí jistě stojí již 4. švýcarsko-české symposium, které se konalo ve dnech 22 – 23. 5. 2008 ve Wadenswil. Podrobnou zprávu si přečtete dále. Za čtyři roky se sejdeme na pátem symposiu opět v České republice. Další zajímavou událostí byla konference o průmyslových biotechnologiích v České republice pořádaná Jihomoravským inovačním centrem ve spolupráci s EUROPABIO ve dnech 15 – 16. 5. 2008 v Brně. I o této události si v tomto čísle přečetete více. Koncem května (28. 5. 2008) jsme pořádali ve spolupráci s VŠCHT a Ministerstvem životního prostředí již třetí seminář o problematice genetických modifikací, který byl hojně navštíven. Rozšířené abstrakty přednesených přednášek byly publikovány jak v tištěné formě, tak na CD (ISBN 978-80-7080-683-8). Jak jsme Vás již informovali tak na webové stránce www.biotech2008.ch si můžete prohlédnout podrobný program přednášek i posterových sdělení na 13. mezinárodním biotechnologickém symposiu v čínském Dalianu a ověřit si jaká aktuální témata hýbají současnými biotechnologiemi. Připomínáme i webovou stránku potravinářského kongresu v Šanghaji http://www.iufost2008.org a zejména pak webovou stránku kongresu FEBS, který se uskuteční příští rok v Praze http://www.iufost2008.org. I tyto stránky jsou aktualizovány a jejich prohlédnutím získáte nové informace. Na webové stránce http://membership.acs.org/b/biochem/content/newsletter/spring_08.pdf si můžete prohlédnout internetový letáček biotechnologické sekce Americké chemické společnosti, dozvědět se jak průmyslové podniky podporují biotechnologické aktivity v USA vyhlašováním bezpočtu stimulačních cen, bezprostředně se podílejí na aktivitách společnosti a plánují své aktivity až do r. 2011. I u nás je však třeba vyzdvihnout řadu pozitivních aktivit. Zejména bych Vám chtěl doporučit pravidelné sledování biotechnologického portálu www.gate2biotech.cz provozovaného Jihomoravským inovačním centrem (JIC). Na aktuální zprávy Vás upozorní týdenní zpravodaj gate2biotech, který můžete dostávat i jako čtenáři internetových zpráv Biotechnologické společnosti. Nezapomínejte ani na internetovou stránku naší Biotechnologické společnosti http://bts.vscht.cz pro kterou hledáme spolupracovníky. Kdo máte zájem pomoci připravovat některou z rubrik tak se přihlaště. Zájem Akademie věd České republiky o biotechnologie byl demonstrován založením Biotechnologického centra (BIOCEV) o kterém jsme Vás v minulém čísle informovali. Dnes Vám můžeme s potěšením oznámit, že ředitelem centra byl, po proběhlém konkurzním řízení, jmenován Ing. Peter Šebo, CSc. Gratulujeme mu k této odpovědné funkci a ze srdce mu přejeme, aby všechny ambiciozní plány s výstavbou a vybudováním biotechnologického centra ve Vesci u Prahy se v plánovaných termínech naplnily.

V tomto čísle Vám tradičně přinášíme výběr přehledných článků, které zasahují do různých oblastí biotechnologií.

Koncem letošního roku uskutečníme nové volby do Rady Biotechnologické společnosti a proto Vás žádáme již nyní o podávání návrhů na nové členy. Naším zájmem je posílit v Radě regionální zastoupení, které by pokud možno odpovídalo současnému krajskému zřízení. V současnosti nejsou některé kraje zastoupeny a tím aktivita Biotechnologické společnosti v těchto oblastech je nulová. S touto nepříjemnou okolností se nám dosud nepodařilo vypořádat a proto Vás urgentně žádáme o pomoc.

Těším se na další spolupráci s Vámi a zejména na Vaše příspěvky jak do Bioprospectu, tak i na webové stránky naší společnosti.

Se srdečnými pozdravy

Váš Jan Káš

BIOTECH 2008 A 4. ČESKO-ŠVÝCARSKÉ SYMPOZIUM

Na tomto místě bychom vám rádi přinesli několik informací a postřehů z konference BioTech 2008, jejíž hlavním tématem bylo využití kvasinek v biofarmaceutické oblasti. Akce, která byla spojená s tradičním 4. Česko-švýcarským biotechnologickým sympoziem, se konala ve dnech 22. a 23. května na půdě Zurich University of Applied Sciences ve švýcarském Wädenswilu.

Hlavním tématem konference bylo využití kvasinek jako hostitelských systémů pro expresi terapeutických proteinů, enzymů pro syntézu nebo modifikaci léčiv či proteinů určených pro využití v oblasti diagnostiky. Aktuálnost tématu konference potvrdila vysoká účast reprezentantů renomovaných výzkumných pracovišť ze 17 různých států, a to jak z Evropy, tak i USA nebo Afriky. Evropské biotechnologie byly zastoupeny vědci ze Švýcarska, České republiky, Belgie, Německa, Anglie a Rakouska. V rámci jednotlivých sekcí bylo prezentováno 17 přednášek zaměřených na vysoceprodukční procesy exprese proteinů a inženýrské aspekty těchto procesů, možnosti vývoje nových kmenů a genetické modifikace kvasinkových hostitelských systémů, posttranslační modifikace farmaceutických proteinů zejména s přihlédnutím k možnostem glykosylace finálního produktu.

V posterové sekci bylo prezentováno 30 příspěvků, významným úspěchem českých účastníků na této konferenci bylo udělení ceny za nejlepší příspěvek autorskému kolektivu P. Kotrba, J. Káš a T. Ruml z VŠCHT Praha, který prezenotval poster s názvem Cell wall-anchored mannoprotein variants engineered to enhance mettalosorption by *Saccharomyces cerevisiae*.

V rámci již 4. ročníku Česko-švýcarského sympozia zaměřeného na oblast aplikovaných biotechnologií proběhla v předvečer konference akce Industry Get-Together, které se zúčastnily významné biotechnologické podniky jako například Lonza, Roche, Novartis nebo Bioengineering, dále představitelé agentury Czech-Invest a zároveň i firmy, které jsou držitelem nejdůležitějších licencí a patentů v oblasti genetických manipulací kvasinek jako jsou firmy Invitrogen nebo RCI. V rámci této sekce bylo předneseno 7 firemních prezentací zaměřených zejména na perspektivy uplatnění aplikovaných biotechnologicí ve Švýcarsku, Francii, České republice a Rakousku.

Slavnostního galavečera se vedle vědců a přestavitelů biotechnologických společností zúčastnili i političtí představitelé obou pořádajících zemí. Večerní program otevřel prezident Akademie věd České republiky profesor Václav Pačes přednáškou zaměřenou na aplikaci výzkumného programu zabývajícího se porovnáním lidského a opičího genomu. Následovala přednáška nového velvyslance České republiky ve Švýcarsku, pana Borise Lazara a v závěru účastníky konference pozdravil starosta města pan Ernst Stocker.

Sborník abstraktů přednáškové i posterové sekce je k dispozici v elektronické podobě na adrese http://www.biotech2008.ch/userfiles/File/081304_A4_BIOPHARMACEUTICALS_80s.pdf.

Na závěr si vás dovolujeme pozvat na 5. Česko-švýcarské symposium, které se bude konat zase za 3 roky, tedy v květnu 2011 v České republice.

Leona Paulová, VŠCHT Praha

Tisková zpráva JIC:
PRŮMYSLOVÉ BIOTECHNOLOGIE MOHOU VÝRAZNĚ PŘISPĚT K BUDOUCÍMU EKONOMICKÉMU RŮSTU ČESKÉ EKONOMIKY

Ve dnech 15. a 16. května 2008 se v Brně sešli u kulatého stolu experti na průmyslové biotechnologie z ministerstev, grantových agentur, firem a akademických pracovišť Evropské unie a České republiky. Hlavním tématem pracovního setkání bylo projednání možnosti růstu a posílení pozice České republiky jako důležitého hráče na poli průmyslových biotechnologií, zhodnocení současného stavu i jejich dalšího využití a příprava dokumentu jako základního materiálu pro účely podpory biotechnologického výzkumu, vývoje a průmyslu České republiky.

Průmyslové biotechnologie patří mezi vzrůstající odvětví se značným potenciálem zaměstnanosti. Průmyslová výroba je při použití biotechnologických postupů šetrná k přírodnímu prostředí. Mohou tak výrazně pomoci k naplňování Kjótského protokolu o snižování emisí oxidu uhličitého i udržení a posilování konkurenceschopnosti v tržní ekonomice. Setkání potvrdilo, že Česká republika disponuje odbornými kapacitami jak z ekonomické, tak vědecké sféry, a může výrazně přispět k rozvoji těchto technologií v rámci EU.

Jednání se konalo na žádost Evropské komise s osobní účastí jejích zástupců, Evropské asociace biotechnologických firem EuropaBio a Národní technologické platformy pro udržitelnou chemii SusChem. Mezi účastníky patřily tak významné osobnosti jako generální ředitel EuropaBio Dr. Johan Vanhemelrijck, projektová koordinátorka EuropaBio Camille Burel či zástupkyně Evropské komise Dr. Monika Sormann.

Českou republiku reprezentovali lidé z výzkumných ústavů univerzit a Akademie věd, ministerstev, biotechnologických firem a podpůrných organizací.

„Setkání přispělo k lepší informovanosti Evropské komise o situaci využití průmyslových biotechnologií v České republice a zmapování možností další podpory rozvoje uzpůsobené českým specifikům a podmínkám. Výsledný materiál z dvoudenního jednání bude podstoupen ministerstvům a autoritám v České republice i Bruselu," konstatoval Michal Kostka, zástupce ředitele Jihomoravského inovačního centra.

Poznámka:
Průmyslové biotechnologie: Průmyslové neboli bílé biotechnologie využívají živé organismy nebo jejich komponenty v průmyslovém odvětví včetně výroby obnovitelné energie a biomateriálů jako jsou bioplasmy nebo biochemikálie.
EuropaBio: Posláním EuropaBio (Evropská asociace pro biotechnologie) je podporovat evropské inovativní a dynamické firmy založené na biotechnologickém základu. EuropaBio sdružuje 87 korporátních a 8 přidružených členů působících po celém světě, 6 bioregionů a 25 národních biotechnologických asociací reprezentujících přibližně 1800 malých a středních podniků.

VYUŽITIE AFM MIKROSKOPIE NA ŠTÚDIUM BIOLOGICKÝCH SYSTÉMOV

Tibor Füzik, Kristína Havranová
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

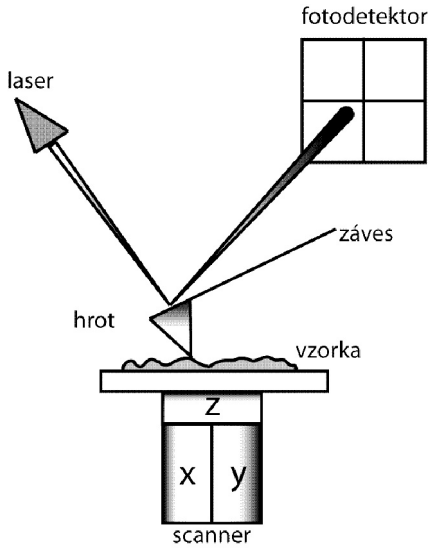
AFM (Atomic Force Microscope), bol prvýkrát popísaný Binningom et al. v roku 1986[1] a v počiatkoch bol používaný najmä na charakterizáciu povrchu materiálov. Ďalším rozvojom nových zobrazovacích techník ako je napr. poklepový režim sa podstatne rozšírili možnosti využitia AFM na štúdium mäkkých materiálov a biologických molekúl či štruktúr. V súčasnosti nie je problém zobraziť biologické materiály, napríklad bunky a mikroorganizmy, či molekuly biologického pôvodu, ako sú protilátky, DNA, alebo 2D kryštály proteínov.

Výhodou AFM je že poskytuje 3D obraz s vertikálnym rozlíšením až 0,5 nm[2] a na rozdiel od elektrónovej mikroskopie dokáže zobrazovať povrch aj v kvapalnom prostredí a tým umožňuje štúdium natívneho biologického materiálu v pufrovanom systéme definovanej kvality, bez nutnosti vysušenia vzorku alebo jeho zamrazenia ako je tomu v prípade kryo-elektrónovej mikroskopie. Vzorky často nevyžadujú fixáciu, čím sa zachováva ich prirodzená štruktúra a tvar. Rozsah merania pomocou AFM je široký. Od biologických molekúl, ktorých výška nepresahuje 10 nm (hrúbka vlákna dsDNA je okolo 2 nm), cez vírusy (desiatky až stovky nm), mikroorganizmy (až mikrometre) a eukaryotické organizmy (hrúbky niekoľko mikrometrov). Najväčšou výzvou pri zobrazovaní však naďalej zostáva spôsob imobilizácie, aby nedošlo k posúvaniu vzorky hrotom počas scanovania.

Princíp AFM

Mikroskopia atomárnych síl (AFM), je založená na scanovaní povrchu veľmi jemným hrotom, pričom polohovanie hrotu je riadené nanometrovou presnosťou pomocou piezoelektrického polohovacieho zariadenia (scanner) v troch rozmeroch (x, y, z). Hrot je umiestnený na konci trojuholníkového alebo obdĺžnikového závesu s definovanou konštantou pružnosti, ktorá je jednak daná dĺžkou závesu a jednak jeho hrúbkou. Hrot je z kremíka alebo nitridu kremíka, a jeho polomer zakrivenia je často menší ako 10 nm. Ostré hroty sú používané hlavne na zobrazovanie makromolekúl ako DNA alebo monovrstvy proteínov, kým hroty s väčším zakrivením a menšou ostrosťou sú vhodné na zobrazovanie buniek, ktoré by príliš ostrím hrotom mohli byť poškodené. Zadná strana závesu hrotu je pokrytá zlatou vrstvičkou, od ktorej sa odráža laser, do fotodetektora (Obr. 1).

V dotykovom režime[1] predstavuje vychýlenie obrazu laseru na fotodetektore mieru ohnutia závesu, spôsobenú interakciou hrotu s povrchom vzorky. Najčastejšie sa na začiatku merania zvolí určitá miera ohnutia (čím väčšia, tým väčšou silou pôsobí hrot na vzorku), ktorá je systémom spätnej väzby udržiavaná pomocou nastavovania polohy hrotu nad vzorkom na konštantnej úrovni. Tým sa zachováva konštantná sila pôsobiaca na vzorku, nezávisle od drsnosti jeho povrchu vo vertikálnom smere.



Obr. 1. *Princíp AFM.*

Nevýhodou dotykového režimu je vysoká miera strižnej sily, ktorou hrot pôsobí na vzorku. Táto sila je minimalizovaná v takzvanom poklepovom režime[3], kde je záves držiaci hrot rozochvievaný piezorezonátorom na definovanej frekvencii (najčastejšie rezonančnej frekvencii závesu). Amplitúda vibrácie závesu je monitorovaná znova odrazom laseru na fotodetektore. Pri interakcii hrotu so vzorkou dochádza k poklesu amplitúdy rezonancie a systém spätnej väzby nastavuje polohu hrotu vo vertikálnom smere tak, aby zostala zachovaná amplitúda na určenej úrovni. Čím je amplitúda rezonancie nižšia, tým väčšou silou pôsobí hrot na vzorku. Miera poklesu, amplitúdy, rýchlosti scanovania a miera odozvy spätnej väzby sa volí tak, aby sa dosiahla požadovaná úroveň kvality obrazu a čo najmenšie poškodenie vzorky hrotom.

Okrem kontaktného a poklepového režimu sa používajú aj iné režimy, ako je záznam fázového posunu oscilácie závesu, záznam amplitúdy rezonančnej frekvencie, alebo jeho ďalších harmonických frekvencií. Tieto režimy sa používajú na záznam vlastností ako je elasticita, alebo iné materiálové vlastnosti povrchu.

Zobrazovanie povrchu buniek, mikroorganizmov a vírusov

Zobrazovanie adherentných bunkových línií v ich prirodzenom prostredí je možné ako v kontaktnom, tak v poklepovom režime[4]. Kým v kontaktnom režime dochádza k silnejšiemu pôsobeniu hrotu na membránu, v čoho dôsledku dochádza až k vizualizácii cytoskeletu pod ním[5], v poklepovom režime sa membrána jemne oťukáva a cytoskelet zostáva neviditeľný. Pomocou zaznamenávania fázového posunu sa dajú zobraziť rozdiely v elastickosti na membráne, pričom bunka je naďalej živá a nedochádza k jej porušeniu. Suspenzné bunkové línie sa najčastejšie prichytávajú na sklo pomocou poly-L-lyzínu.

U mikroorganizmov zostáva najzložitejším krokom pevné prichytenie k povrchu, aby sa počas zobrazovania neposúvali hrotom, aj keď po úspešnom prichytení poskytuje AFM štruktúru povrchu bunkovej steny aká sa pomocou elektrónového mikroskopu zobraziť nedá[6].

AFM je jedna z mála metód, ktorá dokáže vizualizovať kapsidy viriónov, keďže tieto majú rozmer maximálne pár stoviek nanometrov. Najčastejšie sa virióny prichytávajú na povrch ošetrený poly-L-lyzínom, lipidickou dvojvrstvou alebo na sľudu upravenú dvojmocnými katiónmi. AFM sa úspešne použil na zobrazenie povrchovej štruktúry viacerých vírusov[7]. Metóda umožňuje zobrazovanie v pufrovanom systéme, vo viacerých prípadoch bez nutnej fixácie, najčastejšie v poklepovom režime, aby sa minimalizovali strižné sily.

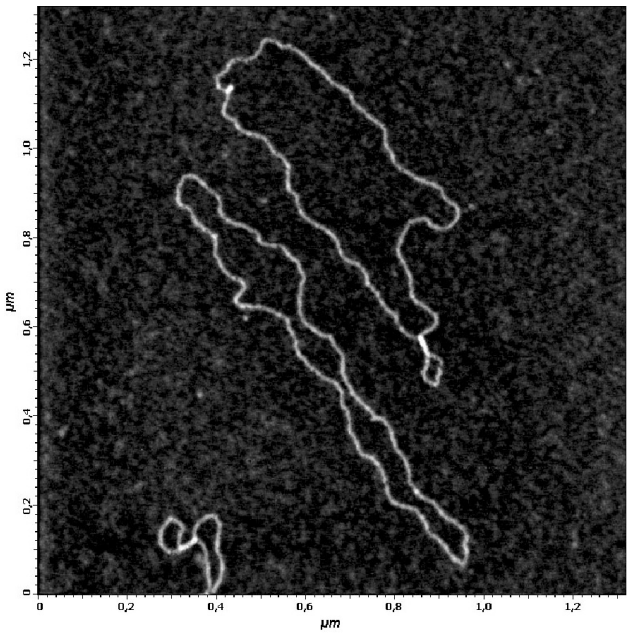
Biologické makromolekuly

Keďže biologické molekuly majú rozmery v rádoch nanometrov, je potrebné použiť čo najhladšiu plochu na ktorú sa dajú prichytiť. Väčšinou sa používa povrch sľudy alebo vysoko orientovaného pyrolytického grafitu, ktorý po štiepení poskytuje atomárne hladký povrch na ploche niekoľkých mikrometrov. Výzvou zostáva upraviť tieto plochy tak, aby sa na ne čo najlepšie prichytili molekuly. Nevýhodou grafitu je že poskytuje hydrofóbny povrch, ktorý sa musí hydrofilizovať. Sľuda poskytuje hladký a hydrofilný povrch, ktorý sa dá následne modifikovať rôznymi spôsobmi, v závislosti od prichytávanej molekuly[8].

DNA bola medzi prvými molekulami zobrazenými pomocou AFM. Keďže povrch sľudy je záporne nabitý, rovnako ako DNA, najjednoduchšou úpravou povrchu je pridanie dvojmocných katiónov do pufru v milimolárnych koncentráciách. Týmto spôsobom sa DNA dá zobraziť či už vysušená alebo v kvapalnom prostredí[9] (Obr. 2).

Medzi najčastejšie zobrazované proteíny patria hlavne izolované membránové proteíny. Problémom zostáva prichytenie k povrchu, keďže pre každý proteín treba použiť vhodný pufor a najvhodnejšie je ak proteíny tvoria 2D kryštály, rovnomerne prichytené na povrch sľudy[10].

Ďalšou často využívanou metódou je zobrazovanie DNA proteínovej interakcie. Proteíny sa na DNA javia ako kruhovité útvary, jasne odlíšiteľné výškou. Okrem pravdepodobného miesta naviazania, určeného meraním polohy proteínu na vlákne pri špecifickom viazaní je možné merať aj uhol ohnutia vlákna[11]. DNA proteínové interakcie sa dajú merať *in-situ* pridaním proteínu do roztoku, aj keď oveľa častejšie sa zmes pripraví dopredu a po imobilizácii sa preparát vysuší, keďže v tomto prípade majú molekuly omnoho nižšiu mobilitu na povrchu.



Obr. 2. *Plazmidy na sľude zobrazené pomocou AFM.*

Meranie silových interakcií

Okrem zobrazovacích možností je AFM možné využiť na meranie silových interakcií medzi dvoma molekulami, pričom jedna z nich je pevne naviazaná na hrot a druhá na podložku[12]. Hrotom sa priblíži k podložke, až kým nedôjde ku kontaktu, a následne sa pomaly odďaľuje. Ak molekuly medzi sebou interagujú, hrot zostáva do určitého momentu „prilepený" k podložke, čo spôsobuje ohnutie závesu. Po určitom vzdialení už intermolekulárne interakcie nestačia na udržanie hrotu a záves hrotu sa náhle narovná. Opakovaním meraním, zmeraním konštanty pružnosti závesu a zmeraním nešpecifických interakcií na nefunkcionalizovanej podložke sa dá vypočítať sila interakcie medzi dvoma molekulami.

Záver

AFM mikroskopia sa stáva čoraz častejšie využívanou metódou používanou pri zobrazovaní biologických materiálov. Tým že ponúka možnosť zobrazovať v kvapalnom prostredí s nanometrovou presnosťou v mnohých oblastiach konkuruje elektrónovej mikroskopii. Meranie monomolekulárnych silových interakcií pomocou AFM otvorilo nové možnosti, kvantifikovania a porovnávania interakcií medzi dvoma molekulami. Aj keď v posledných rokoch došlo k výraznému zvýšeniu počtu postupov na prípravu vzoriek pre AFM, naďalej zostáva výzvou vyvinúť nové postupy imobilizácie vzoriek.

Literatúra:

1. Binnig G, Quate C F and Gerber C: Phys. Rev. Lett., 1986, 56, 930 –3
2. Möller C, Allen M, Elings V, Engel A and Müller D J, Biophys. J., 1999, 77, 1150 – 8
3. Zhong Q, Inniss D, Kjoller K and Elings V B: Surf. Sci. Lett., 1993, 290, L688 – 92
4. Hoh J H and Hansma P K: Trends Cell Biol., 1992, 2, 208 –13
5. Hofmann U G, Rotsch C, Parak W J and Radmacher M: J. Struct. Biol., 1997, 119, 84 – 91
6. Dufrene Y F: J. Bacteriol., 2004, 186, 3283 – 5
7. Yu G. Kuznetsov, A. J. Malkin, R. W. Lucas, M. Plomp, A. McPherson: J Gen Virol, 2001, 82, 2025 – 2034
8. Wagner P: FEBS Lett., 1998, 430, 112–5
9. Hansma P K et al: Appl. Phys. Lett., 1994, 64, 1738 – 40
10. Müller D J, Amrein M and Engel A: J. Struct. Biol., 1997, 119, 172 – 88
11. van Noort J, Orsini F, Eker A, Wyman C, de Grooth B and Greve J: Nucleic Acids Res., 1999, 27, 3875 – 80
12. Noy A, Vezednov D V and Lieber C M: Ann. Rev. Mater. Sci., 1997, 27, 381 – 421

FYTOESTROGENY A DALŠÍ ZDRAVÍ PROSPĚŠNÉ LÁTKY V SÓJI

Anette Tizolová
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Fytoestrogeny jsou látky přirozeně se vyskytující v rostlinách s estrogenní nebo antiestrogenní aktivitou. Jsou strukturně podobné estradiolu, avšak jejich účinnost je mnohonásobně nižší. Základní struktura je nezbytná pro působení fytoestrogenů. Mezi prvky této struktury patří isoflavonový kruh, který na receptoru napodobuje estrogen. Společná je také nízká molekulová hmotnost a hydroxylační vzor. V rostlinách jsou přítomny jako součást obranného systému, zejména proti houbám. Vliv fytoestrogenů byl pozorován poprvé v roce 1940 u pasoucích se ovcí. Tyto ve velkém množství spásaly červený jetel, který je na fytoestrogeny mimořádně bohatý. U ovcí se účinek patologicky projevil na plodnosti, ale brzy se přišlo na to, že fytoestrogeny se liší v účinku na monogastrické organismy. Vyskytují se v mnoha potravinách využívaných lidstvem, např. ve fazolích, kapustě, špenátu, obilninách a chmelu a zejména sóji. Existuje spekulace, že příjem potravin s vysokou hladinou fytoestrogenů může způsobit hormonální nerovnováhu. Ale zatím se nepodařilo pro toto tvrzení najít vědecké opodstatnění. Konzumace těchto potravin není riziková ani z hlediska bioakumulace, ke které v případě fytoestrogenů nedochází[1].

Základními skupinami fytoestrogenů jsou isoflavony, kumestany, lignany a stilbeny. Tyto látky mohou mít pozitivní i negativní účinky na řadu onemocnění spjatých s hormonálním působením. Laboratorní pokusy na hlodavcích prokázaly, že vysoké dávky fytoestrogenů během prenatálního vývoje měly neblahé účinky na správný vývoj mozku a reprodukčních orgánů. Podle epidemiologických studií se přítomnost fytoestrogenů ve stravě dospělých lidí projevuje spíše příznivě, a to ochranou před některými chronickými stavy a nemocemi, jako jsou např. rakovina prostaty, tlustého střeva, konečníku, žaludku a plic. Stejný efekt může způsobit vysoký příjem vlákniny, luštěnin, zeleniny a ovoce. Doposud nebylo možné určit, které konkrétní látky v potravě jsou zodpovědné za tento pozitivní vliv na lidský organismus. U žen může strava se zvýšeným obsahem fytoestrogenů mít vliv na snížený výskyt rakoviny prsu a na zmírnění příznaků menopausy a post-menopausního syndromu, zejména osteoporózy, kde mají fytoestrogeny podobné účinky jako preparáty na udržování hustoty kostí. Sója se také podílí na snižování rizika vzniku kardiovaskulárních chorob a ateroskleróz, a to svým kladným vlivem na udržování hladiny krevních lipidů. Nicméně, stále neexistuje dostatek důkazů, které by všechny tyto kladné vlivy přiřadily výhradně fytoestrogenům. Mnoho dalších sloučenin obsažených v sóji je biologicky aktivních a právě ony mohou být zodpovědné za tyto projevy pravidelného příjmu sóji. Mnoho z těchto látek a zejména fytoestrogeny mohou interferovat s metabolismem steroidů a mohou inhibovat enzymy klíčové pro dělení buňky, jako jsou tyrosinkinasa a topoisomerasa a mohou tak chránit buňku před patologickým dělením[2,3].

Jiná studie prokázala vliv fytoestrogenů, genisteinu a daidzeinu, na snižování plasmatického cholesterolu u lidí i pokusných zvířat. Mechanismus jejich působení je ale rovněž neznámý. Tato studie se snažila dokázat vliv obou fytoestrogenů na metabolismus cholesterolu u hepatocytů. Byl pozorován výrazný vliv na metabolismus mastných kyselin, zejména některé enzymy. Výrazně byla snížena sekrece apolipoproteinu, konkrétně apoB[4]. Apolipoprotein B je hlavní součástí „low-density" lipoproteinů (LDL, známé také jako „špatný cholesterol"), které jsou zodpovědné za přenos cholesterolu do tkání. ApoB hraje hlavní roli na buněčném receptoru pro LDL, a i když není jeho úloha v LDL přesně objasněna, je známo, že je zcela esenciální pro uspořádání LDL částic[5].

Na téma snižování LDL cholesterolu byl proveden velmi zajímavý pokus. 143 dobrovolníků bylo rozděleno do dvou skupin, jedné byl podáván jogurt se sójovými proteiny a standardizovaným obsahem isoflavo-

nů, druhá skupina dostávala placebo. Výsledkem byl výrazný pokles LDL cholesterolu ve skupině, která dostávala sójový jogurt oproti skupině konzumující placebo. Žádný vliv se neprojevil na snížení HDL cholesterolu, triacylglycerolů a homocysteinu[6].

Rovněž byl sledován vliv sóji na leukocyty, konkrétně neutrofily. Předpokládá se, že se podílejí na zvýšeném riziku vzniku kardiovaskulárních chorob. *In vitro* byla sledována produkce superoxidového aniontu a elastasy. Vznikaly agregáty neutrofilů, pozorované pod mikroskopem. Genistein a daidzein a také equol výrazně snižovaly svým působením produkci superoxidového aniontu a snižovaly vznik homotypických agregátů neutrofilů, uvolňování elastasy bránil zejména genistein. Z pokusů vyplývá, že kardioprotektivní účinky sóji mohou být právě důsledkem vlivu fytoestrogenů na mechanismus působení neutrofilních leukocytů. Celá studie byla založena na pozorování asijských zemí, kde dochází k vysoké konzumaci potravin obsahujících sóju a je významně snížena incidence kardiovaskulárních chorob[7].

Dalším ze sledovaných vlivů fytoestrogenům byl snížený výskyt karcinomu prostaty u asijských mužů. Stejný snížený výskyt byl rovněž prokázán u mužů dodržujících vegetariánskou skladbu jídelníčku. Společným znakem asijských mužů a mužů vegetariánů byla strava obsahující málo tuků a hodně vlákniny. Taková zdravá skladba stravy může sama o sobě vést ke snížení výskytu nejrůznějších chorob, takže přímá příčina nižšího výskytu karcinomu prostaty není zcela jasná[3].

Jinou rakovinou, která je spjata s působením hormonů, je rakovina prsu. Výzkum metabolismu isoflavonů genisteinu a daidzeinu prokázal, že jejich metabolický derivát isoflavan equol je velmi silným estrogenem a antioxidantem. Tato přeměna je závislá na vhodné mikroflóře subjektu, proto se neobjevuje u všech zkoumaných objektů[8].

Další epidemiologicky významnou chorobou je diabetes spojený s obezitou. Studie prokázaly, že příjem sóji a lněného semínka příznivě ovlivnil kontrolu hladiny glukosy a inzulinovou rezistenci. Na zvířecích modelech obezity se po konzumaci projevilo snížení hladiny insulinu. U lidských modelových objektů, které měly nebo neměly diabetes, se projevil příjem sóji zmírněním hyperglykémie a redukcí tělesné hmotnosti, hyperlipidémie a hyperinsulinémie[9].

V moderní společnosti je stále více rozšířeno chronické selhání ledvin, jen ve Velké Británii postihuje 5 – 10 % obyvatelstva. Nemoc má pět stádií, od prvotních mírných příznaků přes vývoj abnormalit s postupně se snižujícím podílem filtrátu z nefronů až k akutnímu selhání ledvin v pátém stádiu. Léčbou je dialýza nebo transplantace ledvin[10]. Několik nezávislých studií prokázalo, že prenatální dieta zahrnující příjem sójového proteinu ve srovnání s kaseinovou dietou vedla ke zmírnění vývoje ledvinového selhání v postnatální fázi života. Jmenovitě vedla k redukci zánětu, oxidativního poškození ledvin a buněčného dělení. Příjem sójových proteinů po ukončení kojení vedlo ke snížení infiltrace makrofágů až o 48 %. Nicméně nebyl pozorován tak blahodárný účinek, pokud tato sójová dieta byla započata až po ukončení kojení na rozdíl od započetí již v prenatální fázi. Toto pozorování naznačuje, že velmi záleží na vývojovém stádiu, ve kterém je započata intervence pomocí sójové diety. Týkalo se to zejména snížení proteinurie. Za vyzdvihnutí stojí fakt, že i krátkodobá terapie ve vhodný okamžik vývoje může mít dlouhodobé příznivé účinky[11].

Závěrem je nutno shrnout, že všechny uvedené poznatky o blahodárných účincích sóji, jsou založené na objektivním pozorování asijských populací, které celá století mají téměř neměnné složení stravy a vyvíjely se velmi izolovaně. Rozdíl v četnosti výskytu jednotlivých onemocnění je nasnadě přičítat právě oněm významným rozdílům ve stravě, které je možno tak snadno vypozorovat, zejména již mnohokrát výše citovaným fytoestrogenům. Nesmíme ovšem zapomínat ani na významný obsah bílkovin, nízký obsah tuků a vysoký podíl vlákniny. Sója je jediným plnohodnotným zdrojem bílkovin z rostlinné říše a složení tuků je velmi dieteticky vhodné. Bude zapotřebí ještě mnoho dalších studií na zvířecích i lidských modelech a nespočet analýz a důkazů potřebných k identifikaci jednotlivých látek a popsání jejich biologické aktivity.

Literatura:

1. http://en.wikipedia.org/wiki/Phytoestrogen, *Wikipedia,* 17.11.2007.
2. Humfrey C.D.: *Natural Tox.*, **6**, 51-59 (1999).
3. Denis L.M.M.: *Europ. Urol.*, 35, 377-387 (1999).
4. Borradaile N.M.: *Biochem. J.*, **366**, 531-539 (2002).
5. http://en.wikipedia.org/wiki/Apolipoprotein_B, *Wikipedia,* 25. 11. 2007.
6. Puska P.K.V.: *Brit. J. Nutr.*,. **91**, 393-401(2004).
7. Rotondo S., et al.: *Brit. J. Nutr.*, **97**, 1-8 (2007).
8. Wiseman H.: *Expert Opin. Investig. Drugs*, **9**, 1829-1840 (2000).
9. Bhathena S.J., Velasquez M.T.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1191-1201 (2002).
10. http://en.wikipedia.org/wiki/ Chronic_kidney_disease, *Wikipedia,* 17.11.2007.
11. McMullen S.: *Brit. J. Nutr.*, **97**, 4-5 (2007).

IMUNOGENITA PROTEINŮ URČENÝCH PRO TERAPEUTICKÉ ÚČELY

Alena Bílahorková
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Kvalita, účinnost a spolehlivost léků jsou klíčové prvky, které je nutno během životního cyklu terapeutika sledovat a monitorovat. Vývoj léku má čtyři fáze. V první je třeba přesvědčit se o účinku látky jako terapeutika, v druhé se zjišťuje optimální dávkování léku a po třetí fázi, testující účinnost léku u nemocných pacientů, je možné látku zaregistrovat a výrobce může začít látku vyrábět průmyslově. Nicméně v tuto chvíli testování nekončí, lék se tak dostává do čtvrté fáze testování, které se také říká farmakovigilanční studie. Získají se tak data, která nebyla během předchozích fází zjištěna a která mohou být tak závažná, že se lék musí přestat vyrábět. Mezi takto stáhnutá léčiva patřil například Accutane (akné), FenPhen (diety), Baycol (anticholesterol), Vioxx (cox II inhibitor). Akumulovaná post-marketingová data právě registrovných farmak odhalují množství a variabilitu imunitních odpovědí a jejich klinický důsledek.

Insulin jako první případ

O imunogenitě se poprvé začalo hovořit po uvedení terapeutických živočišných proteinů, jako byly vepřový a hovězí insulin, používané při léčbě diabetu. Ačkoliv se v současné době pomocí rekombinantních technik vyrábí lidský insulin, určitá imunogenní odpověď se stále objevuje. Poprvé se přítomnost protilátek v séru diabetických pacientů prokázala v roce 1956. Současně se začalo ukazovat, že při imunitní reakci organismu nezávisí pouze na organismu, z něhož insulin pochází, ale i na formě, v jaké se lék podává. S rozvojem purifikačních technik, především gelové a ionexové chromatografie, se odstranilo mnoho nečistot, a tak bylo možno porovnávat různé formy mezi sebou. Pomocí těchto technik bylo prokázáno, že vepřový insulin je méně imunogenní než hovězí. a také že velice závisí na výběru purifikačního procesu, neboť i tam, kde se látka po detekci v polyakrylamidovém gelu tváří jako homogenní protein, může být přítomno i malé množství nedetekovatelných nečistot, které ale v organismu mohou hrát velkou roli.

Potenciální zdroje imunogenity

Existuje mnoho faktorů ovlivňujících imunitní odpověď organismu. Mohou být rozděleny na dvě velké skupiny, faktory léčby a faktory výroby. V první části se zaměříme na faktory léčby.

Pokud podáváme terapeutikum pacientovi s narušenou imunitou například následkem rakoviny, určitě se s velkou pravděpodobností setkáme s nižší produkcí protilátek než u osoby, která má imunitní systém aktivovaný infekcí. Většina proteinů je ale podávána osobám s normální imunitní tolerancí, nicméně tu ovlivňuje nejen charakter a původ choroby, kterou pacient léčí, ale i jeho genetická výbava. Pro objasnění těchto interakcí je často uváděn příklad hemofílie typu A. U části pacientů se vyskytuje delece nebo non-sense mutace v genu pro faktor VIII a u těch se potom vyskytuje větší imunitní odpověď na podání terapeutického faktoru VIII, který je organismem rozpoznán jako cizí, než u pacientů, kde dochází pouze ke snížené produkci tohoto faktoru. Imunogenita může být také ovlivněna chronickými nemocemi ovlivňujícími distribuci proteinů v organismu, jako je příklad syndromu chronického selhání ledvin nebo jater, nebo léky stimulujícími nebo potlačujícími imunitní systém.

Mezi další faktory léčby, které významně ovlivňují imunitní odpověď, patří způsob a časový režim podávání biofarmaka do organismu, a také délka léčby. Subkutánní a intramuskulární cesta podání vyvolává větší imunitní odpověď než intravenosní a orální aplikace nebo aplikace ve formě aerosolu. Nebezpečí také stoupá s vyšší frekvencí dávkování a s prodlužující se délkou léčby.

Mezi zdroje imunogenity v závislosti na výrobních faktorech patří v první řadě původ proteinu. Biofarmaka mikrobiálního, rostlinného nebo živočišného původu, jako je například bakteriální streptokinasa nebo lososí kalcitonin, jsou pro lidský organismum cizí proteiny, které aktivují imunitní odpověď podobně jako při vakcinaci, kdy se v organismu objeví nový antigenní epitop a je na něj potřeba reagovat. Nicméně většina bílkovinných terapeutik jsou homology lidských proteinů a u těch je hlavním faktorem imunogenity výrobní proces. Během tohoto prochází každý produkt různými kroky a každý z nich přispívá ke konečné charakteristice biofarmaka. Tudíž kontaminace vzniklá v průběhu těchto procesů, vyluhování některých látek, nebo jen nevhodné skladování a manipulace, mohou přispívat k znečištění produktu a tyto nečistoty mohou imunitní systém stimulovat.

Mnoho příčin nestability souvisí se změnou trojrozměrné struktury proteinu, různými agregacemi, deamidacemi a oxidacemi, což jsou nejčastější cesty jeho odbourávání. Takovýmito degradacemi vznikají nové antigenní epitopy, které se nevyskytovaly v původní molekule, a tím může vznikat potenciál pro vzrůst imunogenity, ačkoli biologická aktivita nebo poločas života molekuly může zůstat nezměněn. Agregace proteinů typicky zahrnuje interakci denaturovaných proteinových molekul s prostředím rozpouštědla, závisí na teplotě, na povrchových vlastnostech. Jedním z příkladů, kdy se neimunogenní terapeutikum stalo imunogenním, je interferon alfa-2a. Základem masti se stal lidský

sérový albumin a použité stabilizační činidlo způsobilo agregaci proteinů a nárůst imunogenity finálního produktu, ačkoliv v jiných případech se běžně používá bez nepříznivého vlivu.

K oxidaci dochází jak v roztoku, tak během sušení. Následkem bývá často snížená biologická aktivita terapeutika a imunogenita doprovázená konformační změnou proteinu. Oxidace může být způsobena kontaminací oxidanty nebo expozicí světlem během skladování. Nejvíce citlivé aminokyseliny jsou methionin, cystein, histidin, tryptofan a tyrosin. K deamidaci během výroby také dochází, nicméně dosud není mnoho známo a jejím vlivu na imunogenitu.

Dalším potenciálním zdrojem imunogenity jsou glykosylace, pasterizace a neadekvátní skladování a zacházení s produktem. Změny v glykosylaci mohou způsobovat změnu v terciární struktuře proteinu, která je často nedetekovatelná fyzikálně-chemickými metodami, nicméně způsobuje změnu v reakci organismu na danou látku. Pasterizace podobně působí na změnu terciární struktury a může ovlivňovat vznik potenciálních epitopů. A konečně, nevhodné skladování a zacházení s produktem, například vystavení vysokým teplotám, může vést k jednotlivým výše uvedeným případům, nejčastěji právě k oxidaci a k agregaci s následnou zvýšenou imunogenitou.

Je potřeba také rozlišit podukty podle použití a použít vhodný materiál a tvar obalu. Například ampulka má jednodušší uzávěr než stříkačka a tím se nemusí výrobce tolik zabývat jednotlivými složkami, jako například lubrikanty, které by mohly způsobit denaturaci proteinu. Nicméně zatavené ampulky jsou zase vystaveny větší pravděpodobnosti kontaminace během plnění a další jejich nevýhodou je jednoduchost otevření.

Klinické následky imunogenity

Imunogenní efekt terapeutických proteinů se v principu deteguje přítomností protilátek cirkulujících v krvi. Dopad na organismus se v podstatě liší mezi jednotlivými produkty. Nejčastěji nemá produkce protilátek velký klinický význam a může často zvýšit účinnost chránící složky proti degradaci. Nicméně zvýšená produkce protilátek může způsobit sníženou účinnost terapeutika, popřípadě jeho efekt zcela potlačit. Může také dojít k neutralizaci proteinu běžně přítomného v organismu, kde by klinické následky mohly být vážnější. Takovým případem byly například krevní destičky po podávání faktoru pro diferenciaci a růst megakaryocytu, který vyvolal u pacientů dlouhodobou trombocytopenii. Dalším takovým příkladem je snížená účinnost faktoru VIII u pacientů s diagnosou hemofilie nebo interferonu alfa-2a při hepatitidě C. Mnoho takových produktů je spojováno s alergickou reakcí a podobnými celkovými imunitními efekty, třebaže tyto typicky zahrnují preparaci nečistot obsahujících velké množství cizího proteinu. Nicméně takovéto případy se stávají čím dál tím vzácnější díky vývoji lepších produktů.

Závěr

Většina biofarmaceutických produktů má imunogenní potenciál. Porucha imunitní tolerance pozorovaná při podání lidských homologů proteinu může být způsobena nově přítomnými epitopy, například micelami a agregáty. Přesná formulace produktu má velký význam ve spojení se stabilizací, protože, pokud je stabilizace neadekvátní, protein může právě agregovat nebo denaturovat, a to může způsobit vzrůst imunogenního potenciálu. U všech proteinů je tak potřeba zvážit, zda jejich léčebná hodnota převyšuje potenciál rizika.

Literatura:

1. Sharma, B.: Biotechnology Advances 25, iss.3, 310-317, 2007.
2. Sharma, B.: Biotechnology Advances 25, iss.3, 318-324, 2007.
3. Sharma, B.: Biotechnology Advances 25, iss.3, 325-331, 2007.
4. Shellenkens, H.: Nephrology Dialysis Transplantation 18, 1257-1259, 2003.
5. Shellenkens, H.: Nephrology Dialysis Transplantation 20, vi3-vi9, 2005.
6. Chamberlain, P.: The Regulatory Review 5, iss5, 2002.
7. Chamberlain, P.: The Regulatory Review 5, iss6, 2002.
8. Hermeling, S.: Pharmaceutical Research 21, No. 6, 897-903, 2004.
9. www.biopharminternational.com/biopharm/article/articleDetail.jsp?id=174494 (6. 3. 2008)

MOŽNOSTI ENZYMOVÉ ÚPRAVY HLADINY CHOLESTEROLU V POTRAVINÁCH

Vojtěch Škop
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Cholesterol je velice důležitý živočišný steroid, nachází se ve všech buňkách a tkáních všech živočichů včetně člověka. Průměrné lidské tělo obsahuje celkem 150 g cholesterolu a syntetizuje 700 – 1500 mg cholesterolu denně, aby byly nahrazeny ztráty způsobené především vylučováním do stolice. Cholesterol má v organismu mnoho důležitých funkcí. V zažívacím traktu cholesterol přeměněný na žlučové kyseliny umožňuje trávení lipidů obsažených v potravě. Je důležitou stavební složkou buněčných membrán a obalových vrstev nervů. Cholesterol je také prekurzorem steroidních hormonů a vitamínu D.

V padesátých až osmdesátých letech dvacátého století, kdy byl objeven jeho biologický význam, byla zjištěna pozitivní korelace mezi vzrůstající koncentrací sérového cholesterolu a vzrůstajícím nebezpečím srdečně cévního onemocnění. Výzkum na zvířatech i lidech prokázal, že sérový cholesterol vzrůstá se vzrůstajícím příjmem nasycených mastných kyselin a cholesterolu. Tato hypotéza uvádí, že vysoký příjem cholesterolu a nasycených mastných kyselin, za nízkého příjmu nenasycených mastných kyselin, způsobí vzrůst celkového a LDL (low denzity lipoprotein) cholesterolu. Což má za následek rozvoj atherosklerosy, srdečně cévního onemocnění s možným následkem smrti. To je významný, veřejně známý zdravotnicky problém, protože je to jedna z hlavních příčin smrti v současném moderním světě. Vztah mezi vzrůstajícím celkovým a LDL cholesterolem a nebezpečím srdečních poruch byl veřejností široce přijat a začaly se vytvářet postupy, jak koncentraci cholesterolu snížit. Hlavní strategií bylo snížení příjmu cholesterolu v potravě, ačkoliv bylo jasné, že cholesterol a krevní lipoproteiny nejsou jedinými odpovědnými za kardiovaskulární choroby, a že se na tomto problému podílí řada dalších faktorů, jako je kouření, stres, vysoký krevní tlak a nadváha. Začalo se mluvit o významu vyvážené stravy a s tímto řešením byla seznámena i široká veřejnost. Úroveň, s jakou je potřeba cholesterol regulovat, se mění podle koncentrace. Lidem s celkovou koncentrací vyšší než 5,2 mmol/l, vzrůstá nebezpečí a je třeba ho nějak řešit. Je nutné výrazně snížit příjem v potravě a celkově změnit stravovací návyky, ve většině případů je dále nezbytná medikamentní léčba.

Na základě těchto údajů jsou čím dál více vyžadovány potraviny s nízkým obsahem cholesterolu. Cholesterol je přirozenou součástí všech potravin, v různých potravinách se ovšem vyskytuje v různém množství (tab. 1). Oproti rostlinným sterolům je cholesterolu

Tab. 1. *Obsah cholesterolu v různých potravinách*

Potravina	Obsah tuku (g/100g)	Obsah cholesterolu (mg/100g)
Kravské mléko	3,8	12,3
Smetana	31,7	109
Jogurt	3,8	12,2
Sýr Camembert	22,3	62
Sýr Ementál	29,7	88
Vejce celá	14,4	396
Vaječný žloutek	31,9	1260
Máslo	83,2	240
Sádlo	99,7	86
Telecí sval	0,8	70
Telecí játra	4,1	360
Telecí ledviny	6,4	380
Hovězí sval	1,9	60
Vepřový sval	1,9	65
Vepřová játra	5,7	340

Tab. 2. *Metody odstranění cholesterolu z potravin*

Metoda	Princip metody
a) fyzikálně – chemické	
1	Extrakce nadkritickou kapalinou – CO_2
2	Extrakce do oleje
3	Adsorpce cyklodextriny
4	Tvorba komplexů se saponinem
b) enzymatické	
1	Oxidace cholesteroloxidasou
2	Redukce na koprostanol
3	Využití fosfolipas s dalším postupem odstranění
c) pomocí mikroorganismů	
1	*Eubacterium coprostanoligens*
2	*Tetrahymena thermophilia*
3	*Rodococcus equi*

v rostlinách obsaženo relativně malé množství. Přítomen je zde v koncentracích 5 až 30 mg/kg. Jako očekávaný následek těchto požadavků jsou vyvíjeny metody, jak snížit množství cholesterolu v potravinách, ve kterých je běžně přítomen, aby lidé nemuseli razantně měnit své stravovací návyky. Tyto metody se dají rozdělit na fyzikálně – chemické a biologické (tab. 2).

Vyvstává zde ale zásadní otázka, jestli příjem potravin se sníženým množstvím cholesterolu bude mít významný vliv na koncentraci cholesterolu v krvi a omezí se tak nebezpečí srdečních chorob. U některých běžně používaných zvířecích modelů, například u králíků, je prokázán vliv vyššího příjmu na hypercholesterolemii. Naproti tomu některé další druhy, například potkani a hlavně lidé, reagují na zvýšený příjem cholesterolu daleko méně. Střevní absorpce cholesterolu zdaleka není kompletní a záleží na mnoha faktorech včetně celkového množství přijímaného cholesterolu. Při celkovém příjmu cholesterolu 200 – 300 mg/den se absorbuje asi 60 %, po zvýšení příjmu na 800 mg/den se absorpce sníží na 55 %. U většiny lidí nárůst potravou přijímaného cholesterolu nemá efekt na plasmové lipidy a má jen malý vliv na krevní cholesterol. Tento efekt je ovlivněn řadou dalších faktorů, jako je typ přijímaného tuku, konkrétně poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin. Omezení příjmu cholesterolu proto zdaleka není nutné u široké veřejnosti, ale pouze u osob s hypercholesterolemií ovlivnitelnou příjmem cholesterolu. Navíc vlastní syntéza cholesterolu lidským organismem podléhá přísné regulaci a je pod zpětnou kontrolou. Při zvýšení příjmu cholesterolu potravou dojde k poklesu syntézy o 20 %. U široké populace dojde, jako odpověď na zvýšený příjem cholesterolu, k redukci jeho syntézy, k potlačení příjmu, zvýšenému odbourávání a zvýšenému ukládání do tkání. Proto u většiny lidí nemá množství přijímaného cholesterolu zásadní vliv na koncentraci v krvi, pouze asi 31 % testovaných lidí vykazovalo vyšší hypercholesterolemii jako následek vyššího příjmu cholesterolu. Byla také vyslovena hypotéza, že snižováním krevního cholesterolu se nesníží úmrtnost a proto není vhodné jako prevence kardiovaskulární choroby. Kampaň za snižování cholesterolu by tedy měla být zastavena. Navíc prevence vedoucí k nižším koncentracím cholesterolu vedou k nárůstu úmrtnosti z jiných důvodů. Bylo například prokázáno, že nízké koncentrace cholesterolu jsou často spojeny s depresivními stavy.

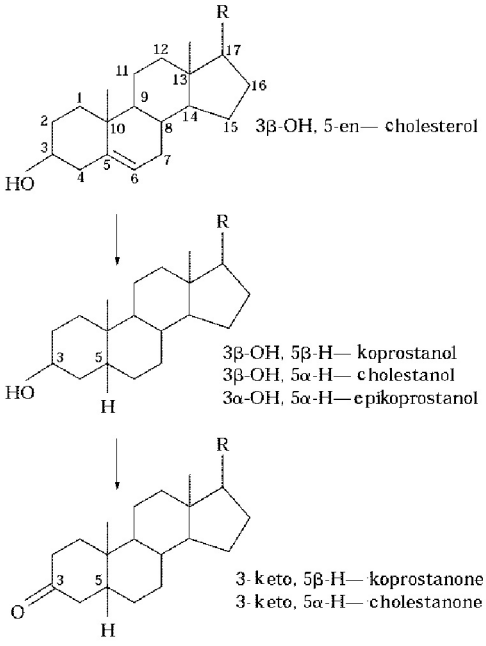
Hypercholesterolemie je jedním z mnoha rizikových faktorů způsobujících srdečně cévní onemocnění, není však jejich příčinou. Poukazuje na celkový stav, změny a poruchy v metabolismu. Význam samotného krevního a potravou přijímaného cholesterolu není tak velký, jak můžeme často slyšet. Omezit nebezpečí atherosklerosy lze, spíše než odstraněním cholesterolu z potravy, vyváženou stravou s vyšším množstvím sacharidů, esenciálních faktorů, vitamínů a mastných kyselin, rozumným množstvím stravy a celkovou fyzickou kondicí organismu. V poslední době se objevila více komplexní hypotéza, že hlavní příčinou srdečních příhod je oxidativní stres a volné radikály. Ty způsobují tvorbu lipoperoxidů, oxycholesterolu a oxidaci lipoproteinů. Takto modifikované sloučeniny oxidovaného cholesterolu jsou fagocytovány makrofágy, které se tím promění v pěnové buňky charakteristické pro rané stadium atherosklerosy. Tuto teorii také podporuje snížení rizika atherosklerosy s příjmem různých antioxidantů jako je vitamín E, C, ß-karoten a další.

Pravděpodobně se na rozvoji atherosklerosy podílí všechny výše zmíněné faktory, každý určitou měrou a omezením jednoho se jejímu vzniku nezabrání. Jak již

bylo řečeno, je hlavně důležitá vyváženost stravy a aktivní životní styl bez zlozvyků, jako je kouření a pití alkoholu.

Použití cholesterol-redukujících bakterií

Anaerobní gram-pozitivní bakterie *Eubacterium coprostanoligenes* obsahuje enzym cholesterolreduktasu, který katalyzuje redukci cholesterolu na koprostanol (obr. 1). Na rozdíl od cholesterolu je koprostanol v zažívacím traktu absorbován velice slabě. Potraviny ošetřené touto bakterií nebo přímo cholesterol reduktasou, budou mít nižší nebo téměř žádný obsah vstřebatelného cholesterolu.



Obr. 1. *Anarobní metabolismus cholesterolu.*

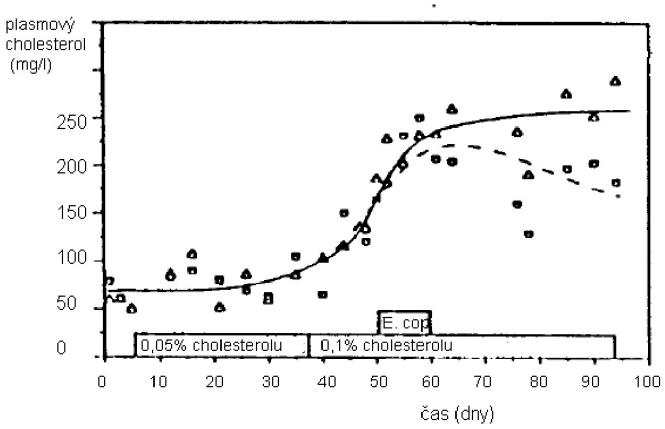
Byl zkoumán vliv *E. coprostanoligenes* přidávané do stravy nebo dodávané přímo do žaludku. Jako modelový organismus byli použiti bílí novozélandští králíci. Jejich strava obsahovala vyšší množství cholesterolu, což se později projevilo i vyšším množstvím cholesterolu v krvi.

Při výzkumu vlivu *E. coprostanoligenes* dodávané do žaludku byla polovině těchto hypercholesrolemických králíků podávána suspenze *E. coprostanoligenes* hadičkou přímo do žaludku po dobu deseti dnů. Druhé, kontrolní polovině, byla stejným způsobem podávána usmrcená kultura *E. coprostanoligenes*. Již po těchto deseti dnech byl vidět zřetelný rozdíl mezi obsahem cholesterolu v plasmě u těchto dvou skupin (obr. 2).

Další experiment byl založen na vlivu přítomnosti *E. coprostanoligenes* v potravě. Králíci byli opět rozděleni do dvou skupin. První skupině bylo podáváno mléko s přídavkem jak cholesterolu, tak bakterie *E. coprostanoligenes*. Druhá skupina dostávala stejné mléko se stejným přídavkem cholesterolu, ale kulturou bakterií, která byla usmrcena varem. I zde byla koncentrace cholesterolu v plasmě výrazně nižší u skupiny, které byla dodávána živá kultura. Konverze cholesterolu na koprostanol, která byla měřena jako poměr těchto látek ve stolici, byla u skupiny krmené živou bakteriální kulturou 1,7krát vyšší.

Žádné z použitých zvířat ani v jednom z těchto experimentů nevykazovalo známky bakteriální intoxikace, nebyl rozdíl mezi tělesnou váhou mezi kontrolními a bakterií krmenými králíky. Nedošlo ke změnám aktivit jaterních enzymů a koncentrace hlavních metabolitů v krvi, kromě cholesterolu, nebyly ovlivněny.

Hypocholesterolemický efekt *E. coprostanoligenes* pokračoval i poté, co již nebyla do stravy přidávána. Toto trvalé působení lze pravděpodobně vysvětlit kolonizací trávícího traktu. Přítomnost dalších, původních cholesterol redukujících bakterií, nemá na změny cholesterolu v krvi takový vliv, protože se vyskytují ve slepém a tlustém střevě a k absorpci cholesterolu dochází v tenkém střevě.



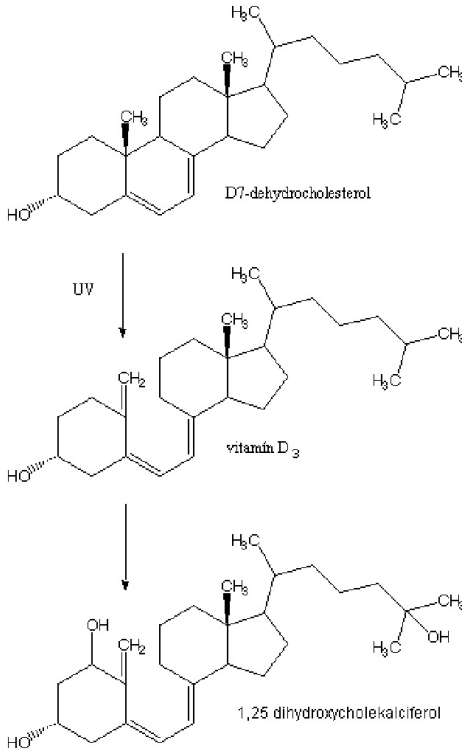
Obr. 2. *Koncentrace cholesterolu v krevní plasmě pokusných králíků během experimentu. Experimentální skupina je znázorněna (△) a kontrolní (□). Jsou zde vyznačena období příjímání různých koncentrací cholesterolu a období podávání E. coprostanoligenes.*

Přidáním *E. coprostanoligenes* do potravy je možné účinně převádět cholesterol na neabsorbující se koprostanol. A to jak cholesterol přítomný v potravě, tak cholesterol endogenní, který se dostává do tenkého střeva a je zde znovu resorbován. Této vlastnosti se dá využít k účinnému snížení cholesterolu v krvi a tím i ke snížení rizik s tím souvisejících. Aplikace v potravinářství bude ale spíše probíhat tak, že se gen pro cholesterolreduktasu přenese do nějaké rychleji rostoucí bakterie s přirozeným výskytem v potravinách jako je *Lactobacillus acidophilus,* běžně přítomný v acidofilním mléce.

Biokonverze pomocí Tetrahymena thermophila

Prvok *Tetrahymena thermophila* je nepatogenní, všeobecně uznávaný jako bezpečný (GRAS) mikroorganismus. Má několik zvláštních schopností, které by mohly mít využití v potravinářském průmyslu, hlavně schopnost desaturovat cholesterol na D7-dehydrocholesterol (pro-vitamín D_3) a D7,22- bis-dehydrocholeste-

rol, uzavřený analog ergosterolu (pro-vitamín D_2). Tyto sloučeniny, vyznačující se konjugovaným systémem dvojných vazeb, jsou citlivé k ozáření v UV oblasti. Při něm dojde k otevření kruhu a tím ke vzniku vitamínu D_3. Následuje metabolická transformace v játrech a ledvinách na 1,25-dihydroxycholekalciferol, hormon, který reguluje metabolismus vápníku (obr. 3).

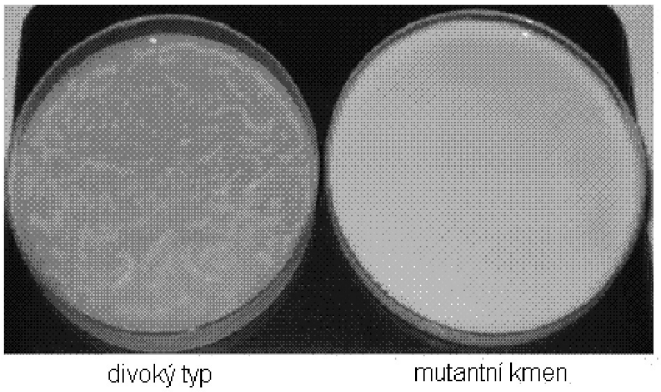


Obr. 3. *Schéma vzniku vitamínu D.*

Pro potravinářské využití je dále důležitá schopnost desaturovat exogenní mastné kyseliny přijímané z média. Převádí stearovou kyselinu na γ-linolenovou procesem postupné desaturace. Navíc *T. thermophila* sekretuje do média velké množství hydrolas, které fungují jako trávící komplex pro různé složky potravy. Mezi sekretované hydrolasy patří skupina lipolytických enzymů, fosfolipasa C, fosfolipasa A_1 a triacylglycerollipasa. To je pro biokonverzi cholesterolu důležité, protože tyto enzymy se účastní procesu uvolnění cholesterolu z lipoproteinových komplexů.

Pro tyto vlastnosti se *T. thermophila* jeví jako vhodný mikroorganismus k ošetření vajec, případně vaječného žloutku. Vejce obsahují velké množství cholesterolu, který by se pomocí *T. thermophila* dal převést na provitamín D za současného zvýšení množství esenciálních mastných kyselin a hydrolýzy bílkovin. *T. thermophila* je na vaječné suspenzi schopná růstu bez tvorby precipitátu nebo jiných negativních senzorických změn. Biokonverze je značně závislá na podmínkách, při kterých probíhá. Optimálního průběhu lze dosáhnout při počátečním pH mezi 8,0 a 8,5 za dostatečné aerace. Při dodržení těchto podmínek klesá koncentrace cholesterolu s časem během 24 hodin na přibližně 55 % původní koncentrace. Výhody této metody jsou zejména v tom, že je možné bez dalších přídavků konvertovat cholesterol vázaný v komplexech a to za produkce pro-vitamínu D. Navíc díky hydrolýze vaječných proteinů (za optimálních podmínek vzroste koncentrace aminokyselin o 16,2 %) nemusí u některých citlivých jedinců docházet k alergickým reakcím.

Při pokusech s odstraňováním cholesterolu z mléka tímto prvokem naopak docházelo k výraznému zhoršení senzorických vlastností a k tvorbě sraženiny, pravděpodobně vlivem sekretovaných hydrolas. Konjugací různých kmenů byl získán kmen s dobrými vlastnostmi pro desaturaci cholesterolu a se sníženou sekrecí hydrolas. Tento kmen, při koncentraci buněk 2.10^6 na mililitr, je schopen během 5 hodin inkubace snížit koncentraci cholesterolu o přibližně 75 % a to bez tvorby sraženiny nebo změny vzhledu (obr. 4). Z mléka se tyto mikroorganismy dají odstranit centrifugací. Získá se tak mléko se sníženým obsahem cholesterolu bez změny vlastnosti a sediment buněk s vysokým obsahem pro-vitamínu D.

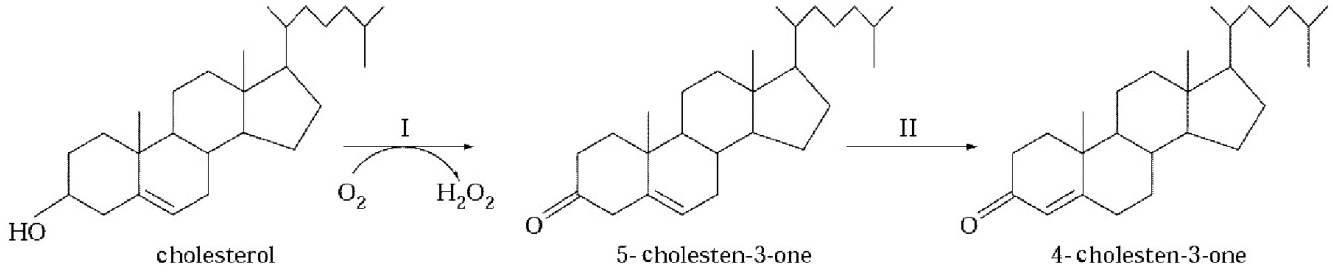


Obr. 4. *Rozdíl v kvalitě mléka po 12 h inkubaci s divokým typem a mutantním kmenem.*

Oxidace pomocí cholesteroloxidasy

Cholesteroloxidasa katalyzuje oxidaci cholesterolu molekulárním kyslíkem. K oxidaci dochází na 3ß-hydroxylové skupině za vzniku ketoskupiny. Dále katalyzuje isomeraci δ5 dvojné vazby na δ4, vytvářející s ketoskupinou konjugovaný pár (obr. 5). Tento enzym byl izolován z poměrně velkého množství různých mikroorganismů. Včetně Gram-pozitivních bakterií jako je *Arthrobacter simplex, Brevibakterium sterolicum* a *Rhodococcus equi*, Gram-negativních bakterií rodu *Pseudomonas* a některých druhů *Aktinomycet.* Pouze několik rodů z těchto organismů je ale schopno odbourávat cholesterol bez produkce steroidních intermediátů jako je 4-cholesten-3-on a 1,4-androstadien-3,17-dion, rozpoznané jako meziprodukty odbourávání cholesterolu. Enzym se obvykle vyskytuje jako membránově vázaný nebo sekretovaný do média.

Bylo provedeno mnoho pokusů s odstraněním cholesterolu z potravin pomocí tohoto enzymu nebo mikroorganismů, které ho exprimují. Podařilo se dosáhnout 60 % konverze pomocí *Rodococcus equ*i, bez akumulace steroidních intermediátů. Dále 93 % bio-



Obr. 5. *Schéma reakce katalyzované cholesteroloxidasou. I: oxidační krok; II: Isomerační krok.*

konverze během tří dnů inkubací s cholesteroloxidasou z *Pseudomonas fluorescens a Nocardia erythropolis*. Pomocí extracelulární cholesteroloxidasy z mutantního kmene *Brevibacterium sp*. se za optimálních podmínek podařilo odstranit 85,6 % cholesterolu z vaječného žloutku, a to během 14 hodin.

Problémem při použití těchto metod může být přítomnost molekulového kyslíku, který může s přítomnými sloučeninami tvořit široké spektrum oxidovaných produktů, které mohou být toxické nebo se podílet na vzniku atherosklerosy.

Využití hydrolas

Tento postup není založen na přímé modifikaci cholesterolu. Nejprve dojde k ošetření potravin pomocí směsi hydrolas, fosfolipasy A, B, D a triacylglycerollipasy. Tyto enzymy rozloží lipoproteiny a další fosfolipidové, membránové a micelární útvary. Dojde k uvolnění cholesterolu a tím k usnadnění jeho odstranění pomocí fyzikálně-chemických nebo biochemických metod.

Závěr

Ačkoliv je odstranění cholesterolu z potravin biologickými metodami technicky možné, žádná z uvedených možností zatím nedosáhla průmyslového využití. To je dáno především tím, že není vědecky podepřené, že takovéto potraviny budou mít pozitivní vliv na snížení rizika atherosklerosy. Cena takto ošetřených výrobků by byla výrazně vyšší. A většina těchto metod není ještě dostatečně prozkoumána a není zcela vyloučen naopak negativní vliv na zákazníky. I přesto je v blízké době pravděpodobné, že se takto ošetřené potraviny na trhu objeví, nejprve pro zákazníky s poruchami metabolismu cholesterolu a později budou pod vlivem reklamy prodávány jako zdravější a prospěšné i ostatním lidem, za účelem vysokých zisků potravinářských firem.

Literatura:

1. SIEBER, R.: Food Sci. Technol., **1993**, *26*, 375-387.
2. LI, L.; BEITZ, D.C.: ISU Dairy Report, **1995**, (62).
3. VALCARCE, G., et al.: J. Food Sci., **2002**, *67*, 2405-2409.
4. GENTILI, H.G., et al. *Biotechnol. Prod. Proc. Eng.*, **2006**, *74*, 776-782.
5. FLICKINGER, M.C., et al: *Encyclop. Bioproc. Technol. – Ferment. Biocatal. Biosepar.*, **1999**
6. CHENFENG, L. Food Chem., **2002**, *77*, 457-643.
7. PRZYBYISKI, R., et al.: Food Chem., **1993**, *48*, 195-199.
8. SAITO, C., OHUCHI, K.: *US Patent 5750164*, **1998.**

BIODEGRADOVATELNÉ PLASTY

Martina Vermachová
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Problematika plastů jako materiálu moderní doby

Plasty vstoupili do života moderní společnosti jako téměř dokonalý materiál. Byly dobře zpracovatelné a přitom velmi odolné – nehnily, nekorodovaly, nepuchřely. Dnes nám však jejich nezničitelnost dělá vrásky. Množství odpadu neustále narůstá a plasty na skládkách jsou téměř věčné (Drobník, 1998). Dalším problémem používání plastů je ropa jako výchozí surovina jejich výroby. Její cena neustále stoupá a navíc se odhaduje, že zásoby ropy na zemi budou během příštích 100 let zcela vyčerpány (Obruča, 2007). Protože se bez plastů v dnešní době již nedokážeme obejít, je potřeba hledat vhodné příznivější alternativy; hodně se začíná hovořit o tzv. „bioplastech". Tento pojem může mít dva trochu odlišné významy. Může se jednat o plasty, které jsou biologicky rozložitelné, nebo o polymery, jejichž výchozí surovinou při výrobě je biomasa jako obnovitelný zdroj. Tento „funkční" a „surovinový" koncept se úplně nepřekrývá; existují degradovatelné plasty vyrobené z fosilních surovin i nerozložitelné plasty z biomasy (Abušinov, 2007). Oba tyto přístupy jsou však cenné a mohly by být cestou k řešení výše zmíněných problémů.

Objem poptávky po bioplastech je však v současné době velmi malý; v Evropě dosáhl v roce 2005 jen 0,05 mil. tun/rok při celkové spotřebě plastů 48,5 mil. tun/rok. Hlavní překážkou bránící masivnímu rozšíření bioplastů je jejich prozatím vysoká cena (cca 5- až 10-krát vyšší než cena konvenčních plastů) a tudíž nedostatečná ekonomická atraktivita, která nedokáže

konkurovat standardně vyráběným polymerům (Abušinov, 2007).

K nejvýznamnějším biodegradabilním plastům patří polyhydroxyalkanoáty (PHA), plasty na bázi polymléčných kyselin (polylaktokyseliny – PLA) a bioplasty odvozené od škrobu (Šesták, 2007).

Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou v přírodě velmi rozšířené zásobní polymerní sloučeniny, jejichž fyzikální a chemické vlastnosti jsou velmi podobné petrochemickým plastům. Produkují je různé druhy bakterií, zejména pokud jim v energeticky bohatém médiu chybí některé růstové faktory. Za těchto nevyvážených podmínek se buňky nemohou rozmnožovat, ale využívají dostupné energie k tvorbě zásob ve formě polyesterů na růstově příznivější období. Vytvořené zásobní polyhydroxyalkanoáty hromadí v podobě nerozpustných inkluzí, jejichž průměr se pohybuje kolem 0,2-0,5 ∝m (Suriyamongkol et al 2007, Luengo et al 2003).

Z chemického hlediska se jedná o lineární polyestery. Množství inkorporovaných monomerů se obvykle pohybuje od 10^3 do 10^4. Základní jednotky jsou různě dlouhé 3-hydroxyalkanové kyseliny, které jsou navzájem pospojovány esterovou vazbou ve smyslu „hlava k patě". Podle délky monomeru se PHA dělí na polyestery obsahující monomery krátké délky (short-chain length – sclPHA, C4, nejčastěji polyhydroxybutyrát – PHB), střední délky (medium-chain length – mclPHA, C5–C14) nebo delší řetězce (longchain length – lclPHA, >C14). Délka monomeru má zásadní vliv na vlastnosti polymeru. Nejběžněji mikroorganismy tvoří polyhydroxybutyrát (PHB), jehož monomerem je 3-hydroxymáselná kyselina. Některé mikroorganismy do svých zásobních polyesterů inkorporují různé (R)-3-hydroxyalkanové kyseliny, jejich deriváty (nasycené, nenasycené, lineární, cyklické, větvené, substituované halogenem či hydroxylem nebo karboxy skupinou), dále 4-, 5-, 6-hydroxykyseliny nebo dokonce aminokyseliny (potom ovšem vznikají polyamidy). Pro technologické využití jsou výhodnější PHA s delším řetězcem či kopolymery (např. PHBV – kopolymer 3-hydroxymáselné a 3-hydroxyvalerové kyseliny), které mají nižší bod tání, takže mohou být zpracovávány jako termoplasty, aniž by během tepelných úprav docházelo k degradaci jejich uhlíkového řetězce (Luengo et al, 2003).

Výchozí látkou pro biosynthesu PHA, na níž se podílí několik enzymů, obvykle bývá acetyl-CoA (pocházející z katabolismu sacharidů či lipidů) a meziprodukty biosynthesy mastných kyselin. Enzym β-ketothiolasa katalyzuje synthesu β-oxo-acyl-CoA a NADPH-oxidoreduktasa zajišťuje jeho stereospecifickou redukci na (R)-3-hydroxyacyl-CoA. Tento aktivovaný monomer je díky specifické polymerase inkorporován do narůstajícího polymerního řetězce. Polymerasy různých mikroorganismů jsou nejvíce aktivní pro různé monomery a tedy produkují různé polymery – různé bioplasty. Druh inkorporovaných monomerů lze cíleně ovlivňovat specifickými růstovými podmínkami, či úpravou genetického materiálu produkujícího organismu. Mikroorganismy, které synthetisují PHA, tvoří další proteiny, které se podílejí na ukládání PHA do inkluzí (tzv. phasiny, jež stabilisují jednovrstevnou fosfolipidovou membránu na rozhraní PHA/cytosol) a také na jejich katabolismu. Jedná se o řadu intracelulárních i extracelulárních depolymeras, které hydrolysují PHA na oligomery i jednotlivé (R)-3-hydroxyalkanoáty. Depolymerasa bývá produkována v neaktivní formě; ke své aktivaci potřebuje PHA či specifické peptidy. Existence těchto enzymů způsobuje „biodegradovatelnost" bioplastů (Luengo et al, 2003).

Za objevem PHB stál r.1928 ředitel Fermentační laboratoře Pasteurova institutu v Lille ve Francii Maurice Lemoigne. Povšiml si, že v anaerobní atmosféře dochází k okyselení suspenze bakterií *Bacillus megaterium*. Popsal, že kyselina produkovaná bakteriemi je 3-hydroxymáselná kyselina. Pevný materiál isolovaný z buněk charakterizoval jako polymer 3-hydroxymáselné kyseliny. Popsal jeho bod tání, optickou aktivitu a molekulovou hmotnost a navrhl, že je produkován buňkami „dehydratační polymerizací". Popsal analytickou metodu kvantifikace PHB a ukázal, že z něj může být formován transparentní film, obdobně jako z tehdy dobře známého nitrátu celulosy.

PHB byl však na dlouhou dobu zapomenut a znovuobjeven byl až na konci padesátých let nezávisle ve Velké Británii a ve Spojených státech, kde jej Doudoroff popsal jako primární produkt oxidativní a fotosynthetické asimilace organických sloučenin. Pozornost byla k polyesterům znovu výrazně upřena v 70.letech během ropné krize díky velké snaze vědců objevit alternativní zdroje surovin a energie, které by mohly nahradit fosilní suroviny (Lenz, Marchessault 2005).

První bakterie použitá k průmyslové výrobě polyesterů v 80. letech byla *Alcaligenes eutrophus*, (*Ralstonia eutropha*); komerční produkt značky „Biopol" britské firmy ICI byl kopolyester 3-hydroxymáselné a 3-hydroxyvalerové kyseliny. Produkce těchto bioplastů ale byla velmi nákladná, protože daný fermentační proces vyžadoval specifické růstové podmínky a byl energeticky náročný. Cena bioplastů byla řádově 10-krát vyšší než cena konvenčních plastů, bioplasty jim nedokázaly konkurovat. Šanci na snížení nákladů produkce bioplastů přineslo genové inženýrství. Na konci 80. let byly z *A. eutrophus* isolovány geny pro enzymy synthesy PHA a zaklonovány do *E. coli*. Takto geneticky modifikovaná *E. coli* exprimovala všechny potřebné enzymy a produkovala PHA ve velkém množství z širokého spektra organických sloučenin. Další strategií synthesy bioplastů byla isolace a purifikace potřebných enzymů z rekombinantní *E. coli* a provádění polymerizační reakce ze 3- a 4-hydroxykyselin *in vitro*. Takto mohou vznikat i velmi dlouhé polymery (Lenz, Marchessault 2005).

V současné době se však jako nejperspektivnější možnost levné produkce bioplastů jeví jejich synthesa v rekombinantních rostlinách. Na počátku 90. let byly

příslušné geny úspěšně vloženy do rostliny *Arabidopsis thaliana*, která pak rovněž mohla produkovat PHA. Transgenní rostliny mohou akumulovat PHA granule až do 15% sušiny a to v cytosolu, plastidech, mitochondriích či peroxisomech. Výtěžek PHA a jejich specifické složení lze ovlivnit dalšími genetickými úpravami, např. zablokováním některých genů -oxidace mastných kyselin. Produkce v rostlinách je mnohem méně nákladná, neboť příslušný sytém potřebuje pouze vodu, půdní živiny, atmosférický CO_2 a sluneční záření. Rostliny fotosyntheticky fixují CO_2 za vzniku bioplastů, které se po použití rozloží zpět na CO_2 a vodu. Navíc lze „vyrábět" PHA paralelně s jinými zemědělskými produkty, např. spolu s olejem v olejnatých rostlinách. (Olej i PHA mají rozdílné extrakční vlastnosti.) Zbytek nevyužité biomasy lze použít jako hospodářské krmivo (Suriyamongkol et al, 2007).

Problémem synthesy bioplastů transgenními rostlinami zůstává náročný proces jejich extrakce a také fakt, že zvýšení osevných ploch „bioplastových" rostlin by konkurovalo klasickým zemědělským plodinám a mohlo by způsobit vysoké zvednutí cen potravin (Obruča, 2007). Bioplasty lze využít k produkci obalových materiálů, lahví, vláken, folií apod. Velmi významné je využití polyesterů PHA pro lékařské aplikace. Umožňuje to jejich biodegradovatelnost, příznivé mechanické a chemické vlastnosti a hlavně biokompatibilita. Použitý materiál nesmí způsobovat alergickou odpověď či aktivaci komplementu a koagulačních faktorů. Bioplasty se v organismu nechovají jako inertní materiál, ale interagují s buněčnými součástmi a jsou postupně zahrnuty do metabolismu organismu. Katabolismem polyesterů o zvláštním složení se do organismu mohou uvolňovat prekurzory antirevmatických, analgetických či radiopotentních látek; také dochází ke zvýšení množství ketolátek, čehož se dá využít např. při léčbě alkoholismu či epilepsie. Podle druhu zvoleného polymeru lze ovlivnit délku „existence" materiálu v organismu. Tyto materiály jsou s výhodou využívány pro šití ran vstřebavatelnými stehy, fixaci kostí, implantáty, náhradu nervové a kardiovaskulární tkáně, doručování léčiv či podporu hypofysálních buněk. Obdobné využití v biomedicíně jako PHA mají i bioplasty na bázi polylaktokyselin (Lenz, Marchessault 2005).

Polymer mléčné kyseliny (Polylactic acid)

Polymer kyseliny mléčné (polylactic acid, PLA) je biodegradovatelný polymer, jenž je svými vlastnostmi velmi podobný svým konkurenčním konvenčním plastům polyethylenu a polypropylenu. Jeho monomerem je kyselina mléčná, respektive její L- či D- isomery. Poměrem obou isomerů lze ovlivnit dobu, za kterou bude polymer rozložen. Ta se obvykle pohybuje v rozmezí několika měsíců. Vstupní surovinou pro výrobu PLA je škrob. Výhodou je jeho nízká cena a velká dostupnost. Škrob je hydrolyzován na glukosu, která je působením mikroorganismů fermentována na kyselinu mléčnou. Chemická polymerace monomerů má podobný průběh jako synthesa polyethylenu a polypropylenu. Lze k ní i využít již existujících zařízení používaných právě k výrobě polypropylenu a polyethylenu (Obruča, 2007). Výhodou PLA je jeho průhlednost; využívá se k výrobě obalových materiálů zejména pro potraviny, pytlů na odpad nebo jiných výrobků s krátkou dobou životnosti. PLA však není termostabilní, proto jej lze využít pouze k výrobě věcí, které nejsou určené k používání za tepla. Výrobky z PLA snesou pouze teplotu 41 – 46 °C, při vyšších teplotách se deformují a degradují (Vondrášková, 2006). Velice důležitou vlastností PLA je jeho dobrá snášenlivost v lidském těle -biokompatibilita. Obdobně jako PHA jej lze využít v medicíně pro různé implantáty, vstřebavatelné švy, fixační materiály apod.. Lidské tělo po čase PLA resorbuje, aniž by pro ně tento proces představoval nadměrný stres (Obruča, 2007).

Bioplasty odvozené od škrobu

Poslední významnou skupinou bioplastů jsou polymery odvozené od škrobu. Škrob je v přírodě hojný a snadno rozložitelný polymer. Jeho nevýhodou z technologického hlediska je nižší pevnost, plasticita a vysoká citlivost na vodu. Nicméně jeho mísením se syntetickými degradovatelnými polymery (polykaprolaktony) mohou být vlastnosti takovýchto bioplastů účinně regulovány podle cílového požadavku. V některých aplikacích je vyšší sensitivita na vodu výhodou; ve farmaceutickém průmyslu se bioplastů s vysokým podílem škrobu využívá pro výrobu lékových kapslí. Odolnější směsný materiál je např. Mater-Bi od Novamontu. Lze jej použít pro výrobu filmů, blán, tmelů a pěn. Výhodné je jeho využití pro výrobu pytlů na odpad (Gross, Kalra, 2002). Pěnová forma směsných polymerů má obdobné využití jako polystyren; na rozdíl od něj má však vyšší hustotu. Ze škrobových směsných bioplastů lze vyrábět balící fólie, různé tašky a pytle, jogurtové kelímky, nápojové kelímky, jednorázové nádobí, plastové příbory atd. (Obruča, 2007). Plasty odvozené od škrobu hrají v současné době mezi bioplasty hlavní roli. Jejich podíl na trhu bioplastů dosahuje až 80% . Pro výrobu škrobových bioplastů je možné využít škrob z obilí nebo jiných rostlin, ale pravděpodobně nejčastěji je využíván kukuřičný škrob. Zde opět výroba bioplastů naráží na problematiku konkurence se zemědělskými potravinami. Protože škrob pochází z rostlin, které lidé už od pradávna využívají ke své obživě, vedlo by masové rozšíření škrobových bioplastů k dramatickému nárůstu cen potravin. Řešení tohoto problému nabídla nizozemská firma Rodenburg Biopolymers, která vyrábí biopolymer obchodovaný pod komerčním názvem Solanyl, který vyrábí z bramborového odpadu vznikajícího při výrobě krmiv pro hospodářská zvířata (Obruča, 2007).

Závěr

Bioplasty se mohou v budoucnosti stát významným materiálem, výhodným zejména svou programovatelnou délkou existence a původem z obnovitelných zdrojů.

Literatura:

1. ABUŠINOV, A.: *EnviWeb* [online]. 2007. [cit. 3-12-07]. www: <http://www.enviweb.cz/?secpart=obecne_archiv_gdffe/Bioplasty_na_rozcesti.html>.
2. DROBNÍK, J.: *Vesmír*, 1998, *77*, 477.
3. GROSS, R.A., KALRA, B.: Science, 2002, *297* (2), 803-807.
4. LENZ, R.W., MARCHESSAULT, R.H.: Bacterial Polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 2005, *6* (1), 1-8.
5. LUENGO, J.M., et al.: Current Opin. Microbiol., 2003, *6*, 251-260.
6. OBRUČA, S.: *Inovace.cz* [online]. 2007. [cit. 3-12-07]. www: <http://www.inovace.cz/biotechnologie/bioplasty—materialy-budoucnosti/>.
7. SURIYAMONGKOL, P., et al.: Biotechnol. Adv., 2007, *25*, 148-175.
8. ŠESTÁK, Z.: *Vesmír*, 2007, *86*, 135.
9. VONDRÁŠKOVÁ, Š.: *Agronavigátor* [online]. 2006. [cit. 3-12-07]. www: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=1&typ=1&val=53167&ids=107>.

O B S A H

Káš J.: **Úvodem** 21

Paulová L.: **Informace o „BioTech 2008 a 4. Česko-švýcarské sympozium“** 22

Tisková zpráva JIC: **Průmyslové biotechnologie mohou výrazně přispět k budoucímu ekonomickému růstu české ekonomiky** 22

Füzik T., Havranová K.: **Využitie AFM mikroskopie na štúdium biologických systémov** 23

Tizolová A.: **Fytoestrogeny a další zdraví prospěšné látky v sóji** 25

Bílahorková A.: **Imunogenita proteinů určených pro terapeutické účely** 27

Škop V.: **Možnosti enzymové úpravy hladiny cholesterolu v potravinách** 29

Vermachová M.: **Biodegradovatelné plasty** 33

POKYNY PRO AUTORY

Vážení přátelé,
aby byla technická úprava našeho časopisu co nejlepší a s minimálním množstvím chyb, uvítali bychom dodržování některých dále uvedených zásad.

1. Texty zasílejte elektronickou formou jako “attachment” spolu s tištěnou verzí, aby bylo možno opravit chyby způsobené přenosem.
2. Texty pište v editoru **WORD** (formát .doc), písmo **Arial**, velikost 11. Zarovnání do bloku, styl **NORMÁLNÍ,** nečíslovat stránky. Nerozdělujte slova na konci řádků. V textu lze používat zvýraznění některých termínů tučným písmem či kurzívou, a také horní a dolní index. Řádkování jednoduché. Odsazení odstavců a mezery mezi nimi nepoužívejte (nastavení = 0).
3. Nepoužívejte automatické číslování, tabulátory, ani „tvrdé“ definice stránek.
4. Obrázky zasílejte **zásadně zvlášť** v některém z běžných formátů (.jpg, .tif).
5. Připojte vždy svojí e-mailovou adresu či číslo telefonu, aby případné problémy bylo možno rychle řešit.

Děkuji L. Fukal

BIOTECHNOLOGICKÁ
SPOLEČNOST
166 28 Praha 6, Technická 3

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností

Podávání novinových zásilek povoleno Ředitelstvím pošt Praha, čl. NP 1177/1994 ze dne 13. 6. 1994