

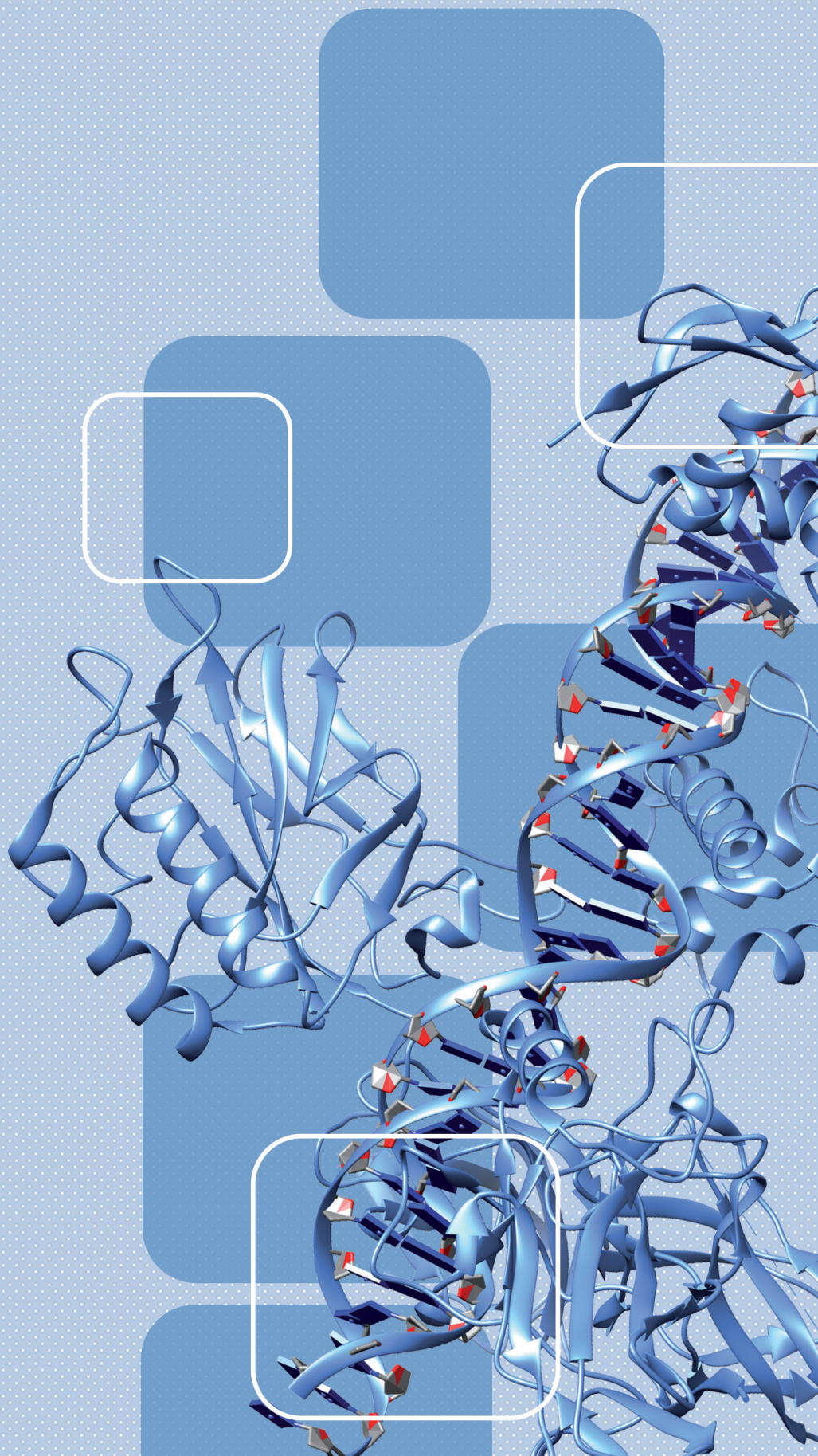
Bio

Ročník 34 • Číslo 2/2024

prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

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



Bio prospect

Society address: University of Chemistry and 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

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efbiotechnology.org>**

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 vitally 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 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. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee 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 cooperation 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 Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Assoc. Prof. Dana Pokorna, PhD
UCT Prague
+420 220 443 151

ÚVODEM

Vážení přátelé,

vítáme Vás ve druhém letošním čísle našeho Bioprospectu redigovaném novou hlavní redaktorkou doc. Ing. Danou Pokornou, Ph.D., které nyní posíláte své příspěvky na emailovou adresu Danka.Pokorna@vscht.cz. Dochází též ke změnám v redakční radě. Bohužel, v současné hektické době, jsme nebyli schopni účast všech nových členů rady projednat. Redakční radu v průběhu roku doplníme o nové členy, a proto uvítáme všechny zájemce, kteří by se chtěli na tvorbě Bioprospectu podílet. V případě zájmu laskavě kontaktujte doc. Pokornou. Rádi bychom Vás požádali o sledování webových stránek naší společnosti, které se snažíme postupně aktualizovat (<http://bts.vscht.cz>) a webové stránky naší střešní organizace ČSVTS, kde můžete získat mnoho zajímavých novinek o činnosti ostatních členů ČSVTS. S hlavními aktivitami naší Biotechnologické společnosti počítáme od října a budeme o nich informovat v zářijovém čísle Bioprospectu.

Jako obvykle si Vás dovoluujeme informovat o letošních zajímavých výročích:

50 let od prvního načtení čarového kódu

Vytvoření geniálního způsobu charakterizace výrobků a identifikace jejich původu.

80 let od vylodění spojenců v Normandii

Šlo o největší vojenskou operaci v historii, která zahájila osvobození Francie a dalších zemí a přispěla k totálnímu zničení nacistického Německa a nastolení míru v Evropě.

100 let od úmrtí spisovatele Franze Kafky

Významný německy píšící spisovatel židovského původu jehož život byl spojen s Prahou, kde se narodil. Je pohřben na Novém židovském hřbitově v Praze-Strašnicích. Na malostranském břehu Vltavy, v prostorách Hergetovy cihelny, je umístěno jeho muzeum.

Tisíc let prvních papírových bankovek

V roce 1024 byly v čínské provincii Sečuan vyrobeny první „papírové bankovky“.

800 let slezského města Opavy

Město bylo založeno králem Přemyslem Otakarem I..

Přestupný rok 2024

Přestupný rok má 366 dní, místo 365 dní a dle tradice, již od starého Říma, je vždy 29. února místo obvyklého února s 28 dny.

Se srdečnými pozdravy a přáním hezkého léta
Vaši

Jan Káš, Dana Pokorná
a kolektiv redakce Bioprospectu



ŽIVOTNÍ JUBILEUM PŘEDSEDY BIOTECHNOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI prof. Ing. JANA KÁŠE, DrSc.

V uplynulých dnech oslavil zakladatel a dlouholetý předseda Biotechnologické společnosti a přední český biochemik prof. Ing. Jan Káš, DrSc.

významné životní jubileum, ke kterému mu co nejsrdečněji blahopřejeme!



Prof. Ing. Jan Káš, DrSc. se narodil 26. května 1934 v Žatci. Převážnou část školních prázdnin trávil u rodičů své matky v Soběslavi, kam se po okupaci českého pohraničí celá rodina přestěhovala a natrvalo usadila. A zde započala vědecká kariéra oslavence. Po ukončení chlapecké obecní školy nastoupil do primy jindřichohradeckého gymnázia, které bylo během války přesídleno do Soběslavi. Po skončení 2. světové války se gymnázium vrátilo do Jindřichova Hradce a obtížnost dojíždění nakonec vedla k tomu, že mladý Jan Káš přestoupil na gymnázium v Táboře. Aktivní profesor chemie na tomto gymnáziu zapálil v Janovi jiskřičku zájmu o tento obor a nasměroval jeho kroky spolu s dalšími třemi spolužáky do Prahy na VŠCHT. U přijímacího řízení mu bylo doporučeno studovat na Fakultě potravinářské technologie na katedře konzervování.

VŠCHT Praha absolvoval v roce 1957. Poté, co v různých funkcích pracoval v Mrazírnách, n.p. nejprve v Táboře a později na kontrolním odboru v Praze, touha po vědě nakonec zvítězila a Ing. Jan Káš nastoupil v roce 1964 na svoji Alma Mater, aby začal rozvíjet svoji vědeckou kariéru. Postupně získal nejvyšší vědecké a akademické tituly, DrSc. a profesor. Stál u zrodu nové Katedry biochemie, jejímž vedoucím pak byl v letech 1994 – 2000. Spolu se svými kolegy dovedl tuto katedru na vysokou mezinárodní úroveň. Po několika funkčních obdobích pracoval ve funkci proděkana FPBT VŠCHT Praha. Veškerý svůj profesní život na této katedře věnoval pedagogické, vědecko-výzkumné a organizační činnosti. Přednášel biochemii, biotechnologie a řadu specializovaných přednášek z oblasti enzymologie a imunochemie. Byl školitelem studentů magisterského a doktorského studia, předsedou oborové rady v oboru biochemie na FPBT VŠCHT Praha a členem oborových rad na PřF UK v Praze a Palackého Univerzity v Olomouci.

V oblasti vědecko-výzkumné se věnoval zejména enzymologii, imunochemii a biosenzorům. Publikoval více než 200 původních článků, převážně v zahraničních časopisech, více jak 70 přehledných článků a je spoluautorem 12 patentů i řady učebních textů a kapitol v monografiích.

Jeho mnoholeté zkušenosti vysokoškolského učitele byly zúročeny při koordinování pěti mezinárodních projektů TEMPUS, které umožnily pracovníkům ústavu navázání řady plodných mezinárodních spoluprací a dopomohly ke zlepšení instrumentálního vybavení ústavu. Kromě toho také koordinoval dva projekty USA (USIA a CZ/US program), 2 granty EU (Copernicus) a řadu projektů GAČR i FRVŠ i mezinárodní projekt UNEP/GEF „National Biosafety Framework for the Czech Republic“.

Prof. Káš se významným způsobem podílel na budování a vzniku Katedry biochemie PřF Univerzity Palackého v Olomouci a jeho činnost byla oceněna rektorem univerzity pamětní medailí této univerzity. Byla mu však udělena i další ocenění: Čestné uznání České rady ČSVTS, Plaketa Výzkumného ústavu potravinářského průmyslu, Medaile Josefa Hlávky, Pamětní medaile FPBT VŠCHT, Ballingova i Votočková medaile či Medaile italské zemědělské společnosti.

Byl a dosud je členem a funkcionářem renomovaných domácích a zahraničních společností a organizací. Z nejvýznamnějších jsou to: Komise pro biotechnologie IUPAC, člen redakční rady Food and Agricultural Immunology (Karger), Biotechnology Advances (Elsevier), Chemických listů a bulletinu Bioprospect. Je dlouholetým členem České společnosti chemické, Komitétu pro biochemii a molekulární biologii, České společnosti pro biochemii a molekulární biologii, Americké chemické společnosti a byl členem vědeckých rad VŠCHT, FPBT VŠCHT, 1. LF UK v Praze, Chemické fakulty Slovenské technické univerzity v Bratislavě a Ústavu genetiky a fyziologie AV ČR.

Prof. Káš v rámci založení nové ČSVTS po politických změnách po roce 1989 inicioval založení Biotechnologické společnosti původně federální a po rozpadu Československa české společnosti. Je jejím dlouholetým předsedou od jejího vzniku až do současné doby. Je také zástupce v European Federation of Biotechnology. Biotechnologická společnost z.s. je jako jedna ze zakládajících společností Českého svazu vědeckotechnických společností s rozsáhlými aktivitami v oblasti vědecké, vzdělávací, informační a dalších ob-

lastech týkajících se biotechnologií. Do jejích nejvýznamnějších akcí patří vydávání odborného časopisu Bioprospect, zařazeného mezi recenzované neimpaktované časopisy a pravidelné pořádání mezinárodní vědecké konference Biotech spojené s Českě-švýcarským biotechnologickým sympoziem, které založil spolu s Dr. Ansem-Peterem Meyerem z Lonzy a které se pořádá v tříletých intervalech. Společnost je

členem evropské federace Biotechnologických společností EFB.

Biotechnologická společnost uspořádala slavnostní zasedání k významnému jubileu prof. Káše a jako uznání jeho mimořádných osobních zásluh mu byla předána z rukou předsedy ČSVTS prof. Drašara Medaile ČSVTS Christiana J. Willenberga, udělená rozhodnutím valné hromady ČSVTS.



Za výbor a členskou základnu Biotechnologické společnosti přejeme prof. Kášovi do dalších let neutuchající nadšení v profesní oblasti a hodně štěstí a zdraví v osobním životě.

Dana Pokorná
Jana Zábranská

MECHANISMUS ÚČINKU CHINOLONOVÝCH ANTIBIOTIK A VZNIK REZISTENCE

Anna Ludvíková, Petra Třešňáková, Ondřej Strnad, Jitka Viktorová

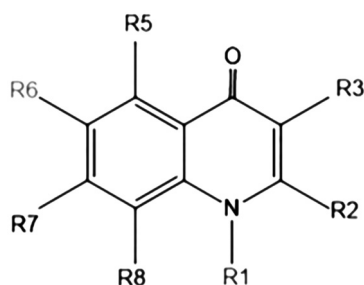
Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, ludvikon@vscht.cz

Úvod

Antibiotika jsou léčiva, která usmrcují bakterie nebo inhibují jejich růst a zároveň mají co možná nejmenší vedlejší účinky na lidské zdraví. Tyto látky mohou být přírodního původu například peniciliny nebo mohou být syntetizovány chemickou cestou jako například sulfonamidy a chinolony a jejich deriváty (Beneš 2018). Zavedení antibiotik do klinické praxe bylo jedním z nejvýznamnějších průlomů 20. století. Uvádí se, že od jejich uvedení do klinické praxe klesla úmrtnost způsobená infekčními nemocemi až o 70 %. Zároveň se prodloužila délka lidského života o více než 20 let a celkově antibiotika přispěla k rozvoji moderní medicíny. Zneužívání tohoto objevu však vedlo k rychlému nárůstu bakteriální rezistence, což značně komplikuje léčbu mnoha infekčních onemocnění (Hutchings, Truman et al. 2019, Plackett 2020).

Chinolony jako antibiotika

Chinolony jsou organické sloučeniny, jejichž účinky se v klinické praxi využívají od konce 60. let 20. století, kdy bylo objeveno první chinolonové antibiotikum, kyselina nalidixová. Nejvýznamnějšími jsou fluorochinolony, které se od 80. let používají jako antibiotika (Brar, Jyoti et al. 2020). Jsou to antibiotika, která nejsou odvozená od přírodních látek, ale byla syntetizována chemickou cestou (Beneš 2018). Účinně působí na široké spektrum bakterií včetně *Mycobacterium tuberculosis* (Pham, Ziora et al. 2019). Jejich působení je ale daleko širší. Chinolony mají potenciál i v léčbě dalších onemocnění a jsou zkoumány jako antimykotika, antimalarika, antivirotika a protinádorová léčiva. Díky rozsáhlým možnostem tvorby derivátů se objevují stále nové možnosti aplikací, které jsou v současnosti hojně testovány (Sharma, Das et al. 2022). Často jsou označovány jako 4chinolony, neboli látky, které tvoří bicyklické struktury s molekulou dusíku v poloze R1 a ketoskupinou v poloze R4. Navíc bývají modifikovány na pozicích zobrazených na Obr. 1, přičemž skupina



Obr. 1: Základní struktura chinolonu. Písmena R1, R5, R6, R7 a R8 zobrazují šest míst pro možné modifikace, které určují vlastnosti připraveného derivátu (vytvořeno v ChemDraw).

a její umístění rozhodují nejen o biologické aktivitě, farmakokinetice a farmakodynamice, ale také o toxicitě (Pham, Ziora et al. 2019, Tang and Zhao 2023). Při testování antimykotické aktivity, je možné se setkat s molekulami, které mají ketoskupinu v poloze R2, označované jako 2-chinolony (Zhang 2019).

Antibiotika představují látky, které selektivně potlačují či eliminují mikroorganismy, především bakterie. Původně byl termín spojen výhradně s přírodními látkami, které byly produktem mikroorganismů. Dnes pojem „antibiotika“ zahrnuje i synteticky vytvořené látky, jako jsou sulfonamidy a chinolony (Hampl 2015). Antibiotické účinky se mohou projevovat několika různými mechanismy. Chinolonová antibiotika inhibují replikaci DNA, a proto jsou označována jako baktericidní (Lincova and Farghali 2002, Beneš 2018).

Pro klinické využití chinolonových antibiotik byly schváleny celkem čtyři generace. Všechny byly odvozené od struktury 4-chinolonu. První generace cílila primárně na gramnegativní bakterie z čeledi Enterobacteriaceae a využívala se k léčbě nekomplikovaných infekcí urogenitálního traktu. Kvůli nízké účinnosti, úzkému spektru využití a vedlejším účinkům se léčiva z této generace již dnes téměř nepoužívají na rozdíl od následujících generací (Pham, Ziora et al. 2019).

Nejvýznamnějším zástupcem první generace byla kyselina nalidixová (Obr. 2), která byla poprvé syntetizována G. Leshnerem v roce 1962 jako součást studie, která se věnovala léčbě malárie způsobené prvoky (Pham, Ziora et al. 2019). Během téhož roku byla tato látka úspěšně testována na bakteriích (Leshner, Froelich et al. 1962). Během testování byly zjištěny antibakteriální účinky především proti gramnegativním bakteriím z čeledi Enterobacteriaceae, například *Shigella* spp. či *Escherichia coli*. Kyselina nalidixová je ethylovaná v poloze R1 a methylovaná v pozici R7, má substituovanou karboxylovou skupinu v pozici R3 a na místo uhlíku v pozici 8 u ní proběhla záměna za dusík (Aldred, Kerns et al. 2014).

Velký rozkvět zaznamenaly chinolony v 80. letech, kdy se začaly používat deriváty druhé generace substituované fluorem v pozici R6 (Obr. 2), které získaly označení fluorochinolony. Díky substituční změně došlo k výraznému zlepšení aktivity vůči gyrase (DNA topoisomerasa (ATPhydrolyzující), EC 5. 99. 1.3) a vzrostla průchodnost stěnou grampozitivních bakterií, čímž také výrazně vzrostla popularita těchto léčiv a staly se jedněmi z nejvíce předepisovaných antibiotik v klinické praxi. Fluor v pozici R6 napomáhá snížení distribučního objemu i lepšímu prostupu do tkáně. Současně ale zavedení fluoru nese i řadu vedlejších účinků, například zvýšení genotoxického potenciálu (Pham, Ziora et al. 2019). Existují chinolony s vodíkem,

aminoskupinou, methylem nebo bromem v pozici R6, které mají méně vedlejších účinků avšak na úkor nižší aktivity (Sharma, Das et al. 2022).

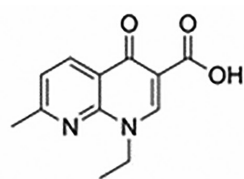
Mezi významné zástupce druhé generace patří klinicky úspěšný ciprofloxacin (Obr. 2). Jedná se o derivát, který se od kyseliny nalidixové liší kromě fluoru v pozici R6 ještě substitucí piperazinem v pozici R7 a cyklopropylem v pozici R1. Substituce piperazinem zvyšuje účinnost vůči gramnegativním bakteriím. Naopak substituce pyrolem nebo alkylovaným piperazinem zvyšuje aktivitu vůči grampozitivním bakteriím. Modifikace struktury chinolonu rovněž vede k prodloužení biologického poločasu. Celkovou účinnost antibiotika pak zvyšuje substituce cyklopropylem. Podobného efektu lze dosáhnout i dalšími substitucemi v této poloze (Pham, Ziora et al. 2019).

Ciprofloxacin se v klinické praxi stále využívá, a to primárně k léčbě infekcí způsobených gramnegativními patogeny (Beneš 2018). Je nejúspěšnějším léčivem k léčbě infekcí způsobených bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, která je nebezpečným původcem nozokomiálních infekcí, urogenitálních infekcí a byla zařazena světovou zdravotnickou organizací (WHO, z angl. world health organisation) do skupiny ESKAPE (zkratka z rodových jmen bakterií: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp.), což je skupina bakterií, kterým má být věnována zvýšená pozornost (De Oliveira, Forde et al. 2020). I přes všechny úspěchy těchto léčiv je druhá generace neúčinná vůči bakterií *Streptococcus pneumoniae* a některým dalším bakteriím způsobujícím dýchací obtíže (Beneš 2018, Pham, Ziora et al. 2019, Thai, Salisbury et al. 2023).

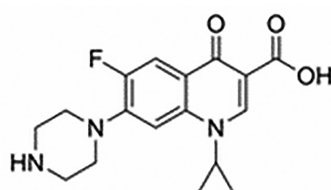
Po velkém úspěchu fluorovaných derivátů byly testovány další možné deriváty, které by mohly rozšířit spektrum účinku proti grampozitivním bakteriím. Takto vznikla třetí generace chinolonů, která vykazovala aktivitu jak proti gramnegativním, tak grampozitivním bakteriím, a to včetně pneumokoků (např. *S. pneumoniae*) (Aldred, Kerns et al. 2014).

Typickým zástupcem třetí generace je levofloxacin (Obr. 2), jehož největší výhodou je změna farmakodynamických vlastností, která umožňuje užívat pouze jednu tabletu denně. Stejně jako všechny předcházející deriváty je možné jej užívat perorálně s vysokou biodostupností (Anderson and Perry 2008). Levofloxacin vykazoval aktivitu i proti bakteriím *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydia* sp. I přes širokospektré působení tohoto antibiotika byla pozorována nižší účinnost vůči gramnegativní bakterii *P. aeruginosa*, na kterou velmi dobře působil výše zmiňovaný ciprofloxacin (Kaur, Anuradha et al. 2022). Snížená aktivita proti gramnegativním bakteriím by mohla být způsobena methylaací piperazinu v pozici R7. Na druhou stranu methylaací dochází k prodloužení biologického poločasu a také k lepší penetraci do centrální nervové soustavy (CNS) (Pham, Ziora et al. 2019). Tato antibiotika se díky své všestranné aktivitě stala oblíbená v boji proti nemocem dýchacího ústrojí šířených komunitně. Dále se využívala k léčbě akutních sinusitid a chronické bronchitidy (Kaur, Anuradha et al. 2022).

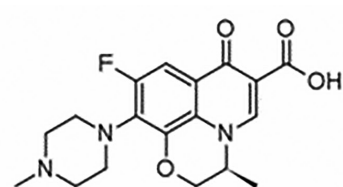
Čtvrtá generace, která se od druhé a třetí generace liší tím, že v základní struktuře je uhlík na pozici 8 nahrazen dusíkem, přinesla především zvýšení aktivity proti anaerobům a celkově přispěla ke zvýšení biodostupnosti celé molekuly. Typickým příkladem molekuly s touto strukturní změnou je trovafloxacin (Obr. 2), který se používá proti anaerobním rodům *Bacterioides* a *Clostridium*. Významná je také aktivita proti některým rezistentním mikroorganismům jako jsou stafylokoky rezistentní na methicilin a penicilin a enterokoky rezistentní na vankomycin (Haria and Lamb 1997, Pham, Ziora et al. 2019). Do čtvrté generace patří i moxifloxacin (Obr. 2), který vyazuje aktivitu vůči anaerobům i přes absenci dusíku v pozici 8, který je zde nahrazen substitucí methoxy skupinou. Jeho hlavní předností je substituce azabicyklickou skupinou v pozici R7, která výrazně zvyšuje jeho aktivitu vůči grampozitivním bakteriím oproti dalším příbuzným molekulám (Pham, Ziora et al. 2019).



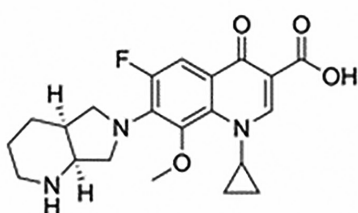
Nalidixová kyselina



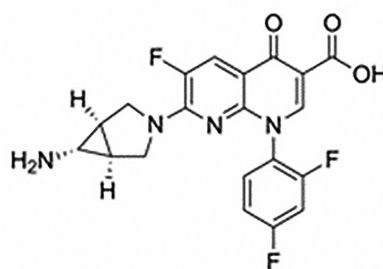
Ciprofloxacin



Levofloxacin



Moxifloxacin



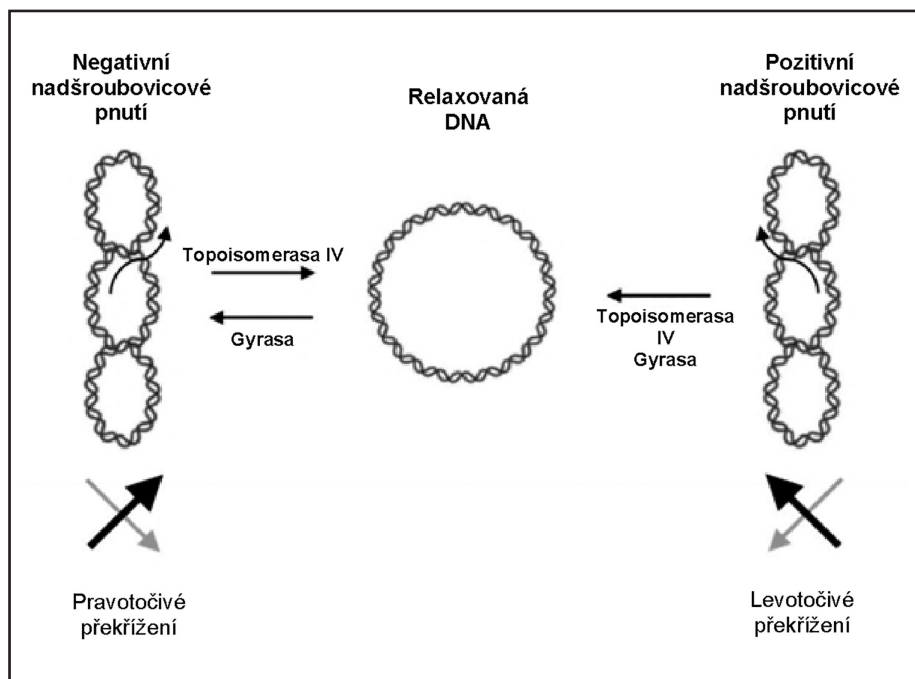
Trovafloxacin

Obr. 2: Struktury chinolonů běžně využívaných v klinické praxi (vytvořeno v ChemSketch).

Mechanismus účinku

Chinolony působí jako inhibitory syntézy bakteriální DNA tak, že zasahují do působení topoisomeras. Tyto enzymy katalyzují vzájemnou přeměnu různých topologických forem DNA, jelikož pomáhají regulovat úroveň nedostatečného a nadměrného vinutí DNA a zastávají tak zásadní roli ve většině procesů spojených s nukleovými kyselinami. Během buněčné replikace nebo transkripce dochází k vinutí DNA, kdy se dvoušroubovicová molekula stává více stočenou a vzniká nadšroubovicovitě pnutí, které je relaxováno topoisomerasami. Všechny topoisomerasy patří do 5. enzymové třídy isomerasy. Existují dva základní typy – topoisomerasy I (DNA topoisomerasa, EC 5.6.2.1) a topoisomerasy II (DNA topoisomerasa (ATP-hydrolyzující), EC 5.6.2.2), které se liší svým mechanismem působení a svými specifickými funkcemi. Topoisomerasa I katalyzuje rozvolnění DNA, zatímco topoisomerasa II přerušuje fosfodiesterové vazby za spotřeby ATP a po přetočení vláken pentosa-fosfatovou páteří k sobě je opět spojí. Mezi významné bakteriální topoisomerasy typu II řadíme gyrasu a topoisomerasu IV (Kodíček, Valentová et al. 2015, Beneš 2018, Beteck, Jordaán et al. 2021).

Pouze gyrasa katalyzuje tvorbu negativní nadšroubovicové vinutí, ke které využívá energii získanou z hydrolýzy ATP (Obr. 3). Negativní nadšroubovicové vinutí DNA je nezbytné pro kondenzaci chromozomů a zmírnění torzního napětí během replikace. DNA gyrasa je přítomná a nezbytná u všech bakterií, ale chybí u vyšších eukaryot (například u člověka), což z ní činí ideální cíl pro antibakteriální látky. Eukaryota mají příbuzný enzym, který se však dostatečně liší od bakteriální DNA gyrasy a topoisomerasy IV, takže lze na tyto enzymy selektivně cílit (Fàbrega, Madurga et al. 2009, Aldred, Kerns et al. 2014, Beneš 2018, Bush, Díez-Santos et al. 2020, Jian and Osheroff 2023).



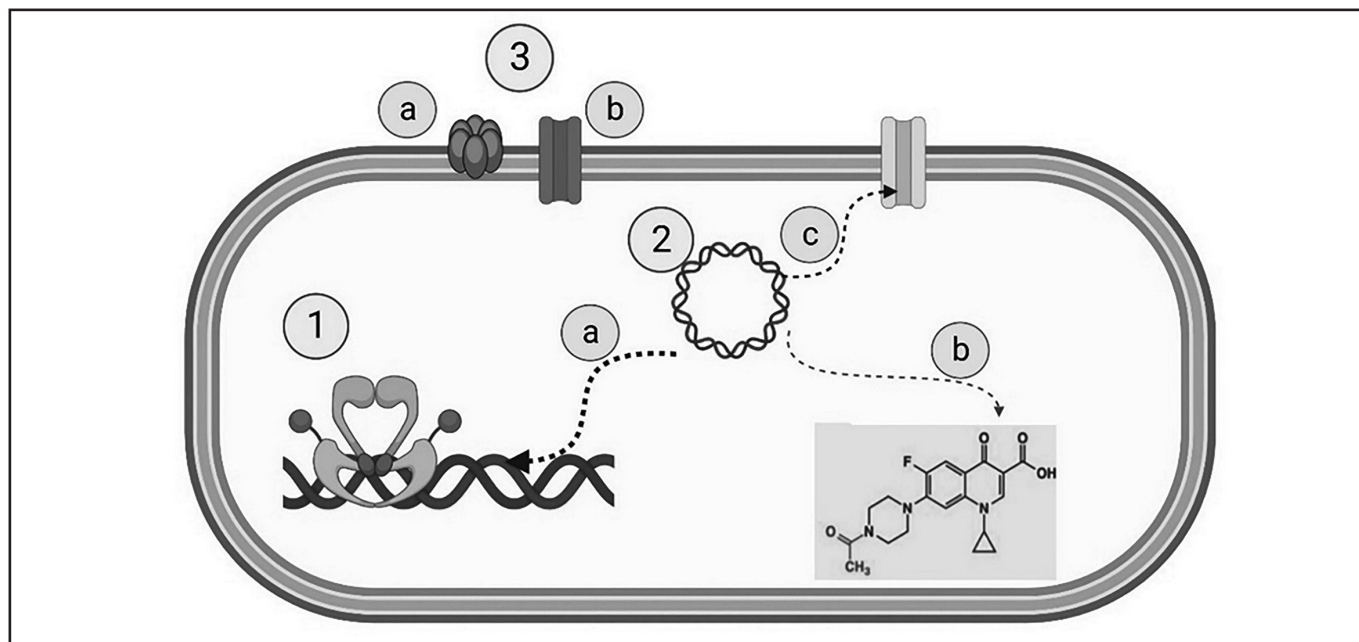
Obr. 3: Působení jednotlivých topoisomeras na DNA (převzato a upraveno z Jian et al. 2023)

Chinolony používané jako antibiotika účinkují jako inhibitory těchto enzymů, konkrétně bakteriálních DNA topoisomeras typu II, tedy gyrasy nebo topoisomerasy IV (topoisomerasa IV, EC 5.99.1.-) (Hampl 2015, Tang and Zhao 2023). Obecně platí, že enzymy nejprve způsobí zlom v obou vláknech bakteriální dvoušroubovice a následně zlom spojí, vše za spotřeby ATP. Gyrasa a topoisomerasa IV vytváří v základním řetězci DNA zlomy, které jsou od sebe vzdálené 4 páry bází a nacházejí se střídavě na obou vláknech, čímž vytvářejí 5'převisy. Za účelem udržení integrity genomu během tohoto procesu vytvářejí enzymy kovalentní vazby mezi aktivními místy tyrosinových zbytků topoisomerasy a nově vytvořenými konci 5'-převysů. Tyto kovalentní komplexy jsou známé jako „štěpící komplexy“ a jsou klíčové pro regulaci struktury DNA během procesů jako je replikace a transkripce (Berger, Gambelin et al. 1996, Pommier, Leo et al. 2010).

Oba enzymy mají specifické schopnosti. Gyrasa primárně odstraňuje torzní napětí, které vzniká v důsledku tvorby replikační vidlice či transkripčního komplexu. Dále spolupracuje s proteinem ω (topoisomerasa typu I) na nastavení superhelikální hustoty chromosomu. Topoisomerasa IV napomáhá gyrase, ale v těchto funkcích má výrazně méně významnou roli. Primárně napomáhá k rozplétání dceřiných chromosomů po replikaci a k odstraňování uzlů na DNA, které mohou vznikat při buněčných procesech (Vann, Oviatt et al. 2021).

Působení chinolonů pouze na prokaryotní buňky zaručuje tvorba iontového můstku voda-kov. Ten vzniká pomocí iontů, které jsou v prostředí buňky přítomny. Ionty obalené vodou propojí chinolon s aktivními místy enzymu, která obsahují serin. K tvorbě můstku u lidského analogu nedochází, kvůli nepřítomnosti serinu. Z toho důvodu mohou být tato antibiotika navržena tak, aby podporovala tvorbu tohoto můstku (Aldred, Schwanz et al. 2013).

Tak jak byly zkoumány rozdíly v působení na různé organismy byly zkoumány i rozdíly v působení na grampozitivní a gramnegativní druhy bakterií. V některých studiích se začal objevovat názor, že klíčový enzym je různý pro různé generace těchto antibiotik. Pro první generaci chinolonů, kam řadíme například kyselinu nalidixovou, mělo být typické dominantní působení na gyrasu. Tuto skutečnost naznačuje například studie na gramnegativní bakterii *E. coli* (Khordusky 1995). Studie genomu u grampozitivní bakterie *S. pneumoniae* provedena skupinou Pan et al. naopak zjistila, že ciprofloxacin, který je příkladem antibiotika druhé generace, cílí primárně na topoisomerasu IV (Pan, Ambler et al. 1996). Na základě těchto poznatků vznikla hypotéza o různých cílech pro grampozitivní a gramnegativní bakterie. Před-



Obr. 4: Různé mechanismy vzniku rezistence k chinolonovým antibiotikům. Bod 1 znázorňuje změnu ve vazebném místě na cílovém enzymu. Bod 2 označuje plazmid, který nese informaci 2a pro změnu ve vazebném místě proteinu, 2b pro vznik acetyltransferasy, která acetyluje molekulu antibiotika, čímž snižuje jeho účinnost nebo 2c pro tvorbu efluxních pump. Bod 3 představuje chromosomově kódovanou rezistenci, která má za následek 3a snížení exprese přenašečů chinolonů do buňky nebo 3b zvýšenou expresi efluxních pump. (vytvořeno v programu BioRender)

poklad byl ale následně vyvrácen studií *Fournier et al.*, která byla komplexnější než předešlé studie. Předpokládá se, že selektivita antibiotika ke konkrétnímu enzymu bude různá pro různá léčiva a nebude souviset s druhem bakterie, na kterou cílí (Fournier, Zhao et al. 2000).

V obecném principu antimikrobiální chinolony působí tak, že inhibují syntézu DNA stabilizací štěpícího komplexu. Stabilizaci provedou tak, že fyzicky zabrání topoisomerase v ligaci. Ligace je inhibována nekovalentní vazbou chinolonu na vzniklý komplex DNA a topoisomerasy. Po kontaktu stabilizovaného komplexu s proteiny, které jsou zodpovědné za replikaci nebo transkripci dojde k uvolnění komplexu v místě navázání a vytvoří se DNA zlom. Ke vzniku jednoho DNA zlomu je zapotřebí dvou molekul chinolonu, přičemž každá molekula se váže na jedno vlákno. Tento mechanismus se nazývá proteinově nezávislá cesta (Aldred, Kerns et al. 2014).

Proteinově závislá cesta je podpůrným mechanismem působení chinolonů, který se spouští při vzniku oxidačního stresu. Ten je vyvolán zlomy v DNA způsobenými přítomností chinolonů. Podle Pham *et al.* aktivuje oxidační stres protein RecA a podpoří samoštěpení represoru LexA (Pham, Ziora et al. 2019). Obecně se tyto proteiny účastní regulace SOS oprav DNA. LexA je represor, což znamená, že normálně potlačuje expresi genů souvisejících s SOS odpovědí. Když je DNA poškozena, RecA může interagovat s LexA a indukovat jeho autoproteolýzu. To vede k odstranění LexA z DNA a aktivaci SOS odpovědi (Markham, Harper et al. 1985). Vzhledem ke kumulaci množství DNA fragmentů při působení chinolonů aktivují SOS mechanismy proces zakončený buněčnou smrtí (Pham, Ziora et al. 2019, Millanao, Mora et al. 2021).

Mechanismus proteinově nezávislé cesty, tedy blokáce replikace či transkripce doprovázená vznikem zlomů DNA, nebyl vyvrácen. Mechanismy působení dalších proteinů a vlivu oxidačního stresu jsou ale stále předmětem studií. Většina studií se však shodne, že mechanismy vyvolané reakcí buňky na přítomnost zlomů DNA jsou pro následné antibakteriální účinky zásadní (Pham, Ziora et al. 2019).

I přes nejasnosti ohledně mechanismu působení chinolonů bylo prokázáno, že opravné procesy sice mohou ve výsledku urychlit smrt bakteriální buňky, ale také mohou být příčinou vzniku rezistence k těmto antibiotikům. Výše zmíněné proteiny fungují na principu oprav náchylných k chybám (z angl. error-prone), což znamená, že jsou při nich využívány DNA polymerasy bez opravných mechanismů, takže může dojít ke změně genetické informace. V důsledku toho mohou vznikat mutace vedoucí ke změnám ve struktuře cílových proteinů (Bush, Diez-Santos et al. 2020).

Mechanismus rezistence

Stejně jako proti většině antibiotik vzniká i proti chinolonům bakteriální rezistence. Nevýznamnější je proti fluorochinolonům, zejména pro jejich velké rozšíření. Často se může také jednat o kombinovanou rezistenci s rezistencí k dalším antibiotikům, nejčastěji například k β -laktamovým antibiotikům. Tento typ rezistence je často kódován na plazmidech. Mechanismy rezistence můžeme rozdělit do tří základních kategorií naznačených na Obr. 4 (Aldred, Kerns et al. 2014, San Millan 2018).

První z mechanismů funguje na principu změn přímo cílového místa. Může docházet k strukturním změnám přímo v aktivních místech gyrasy či topoisomerasy IV.

Tím dojde k oslabení interakce chinolon-enzym, která byla popsána výše. Největší problém nastává ve chvíli, kdy dojde ke změnám v obou enzymech zároveň a antibiotikum přestane působit úplně (Yoshida, Bogaki et al. 1990).

Nejčastější změna je záměna serinu, který je zásadní pro selektivitu chinolonu k prokaryotní topoisomerase, jak už bylo výše zmíněno. Pro bakterii nepředstavuje mutace v serinu problém, jelikož nevede ke změnám katalytické schopnosti příslušného enzymu. Další možností je změna kyselých residuí (např. kyseliny glutamové nebo kyseliny asparágové), přes které rovněž mohou interagovat některé druhy chinolonových antibiotik. Tyto záměny se vyskytují výrazně méně neboť ovlivňují katalytickou aktivitu bakteriálního enzymu (Pham, Ziora et al. 2019).

Druhý z mechanismů představuje rezistence zprostředkovaná plazmidem, která snižuje účinnost interakce enzym-antibiotikum. Tento typ rezistence je z hlediska boje s rezistencí problematický, jelikož může dojít k horizontálnímu přenosu genů pomocí konjugace. Představuje tedy vyšší riziko kvůli rychlejšímu šíření, než je tomu u jiných typů rezistence. Ty se přenášejí pouze vertikálně, tedy při dělení na dceřiné buňky (Bush, Diez-Santos et al. 2020). Za tento typ rezistence jsou odpovědné proteiny ze tří různých rodin.

První rodina zahrnuje proteiny kódované *qnr* geny. Tyto proteiny vyvazují místa na gyrase a topoisomerase IV, a tím znemožňují vazbu chinolonů. To následně vede k interakci, která brání v navázání antibiotika.

Druhá rodina zahrnuje proteiny *aac(6')Ibcr*, které zastávají funkci aminoglykosid acetyltransferas (aminoglykosid 6'N-glykosid transferasa, EC2. 3. 1.82), které ovlivňují přímo strukturu antibiotika. Tyto enzymy acetylují nechráněnou hydroxyskupinu pyrimidinového kruhu v pozici R7, což značně snižuje jeho aktivitu. Tento typ rezistence je typický například pro ciprofloxacin.

Poslední rodinu tvoří efluxní pumpy *OqxAB*, *QepA1*, a *QepA2*, které snižují koncentraci chinolonu v buňce jeho transportem vně (Aldred, Kerns et al. 2014).

Posledním typem rezistence je rezistence kódovaná přímo na chromozomu. Ta souvisí s expresí proteinů kotvených na membráně a má za důsledek snížení koncentrace antibiotika uvnitř cílového mikroorganismu. Kvůli rozdílu v buněčných stěnách je tento typ rezistence častější pro gramnegativní bakterie, kde proteinové přenašeče zprostředkovávají největší podíl látkové výměny (Tang, Zhou et al. 2023). Při tomto typu rezistence dochází k nadprodukci efluxních pump nebo dochází ke snížené expresi přenašečů, které by za normálních okolností umožnily vstup antibiotika do buňky. K mutacím nejčastěji dochází v oblastech kódujících regulační geny. Pouhé snížení koncentrace antibiotika v cílové buňce obvykle k rozvoji rezistence nestačí, poskytuje ale prostor pro rozvoj dalších typů rezistence (Aldred, Kerns et al. 2014).

Léčba tuberkulózy

Tuberkulóza (TBC) je dle WHO jedno z 10 nejsmrtelnějších onemocnění planety, které má ročně na svědomí 1,4 milionu obětí (Organization 2019). Původcem tohoto onemocnění je bakterie *M. tuberculosis*, která

má oproti jiným bakteriím atypickou strukturu a složení buněčné stěny, kterou nelze barvit Gramovým barvením a její zařazení je tedy sporné. Kvůli svým odlišnostem je také velmi odolná vůči mnohým běžným antibiotikům a vytváří potřebu nacházet léčiva pro ni specifická. V současné době jsou k léčbě TBC používána antibiotika isoniazid, rifampicin a pyrazinamid, ale ta mají mnoho vedlejších účinků, navíc vůči nim vzniká rozsáhlá bakteriální rezistence (Rahlwes, Dias et al. 2023). Tyto skutečnosti vedou k potřebě hledat nové způsoby léčby tohoto závažného onemocnění.

Jako vhodnou možností se zdají být i chinolony, které byly k této indikaci využity již v minulosti. Používal se například ciprofloxacin nebo levofloxacin. V současné době jsou zkoumány další deriváty, které by mohly vykazovat v boji s touto bakterií ještě lepší účinky. Bylo zjištěno, že cyklopropyl nebo benzyl v pozici R1 a methoxyskupina v pozici R8 významně zvyšují lipofilní charakter molekuly, čímž napomáhají přestupu derivátu přes velmi polární buněčnou stěnu (Beteck, Jordaán et al. 2021). Jako pro všechny bakterie, i zde se osvědčil fluor v pozici R6, který zvyšuje aktivitu vůči gyrase. Ještě lepší výsledky byly získány pro substituci pozice R6 nitroskupinou. Působení proti TBC podpoří i zavedení esteru karboxylové skupiny do polohy R3. Jako vůbec nejúčinnější se v případě tuberkulózy ukázalo zavedení azolové skupiny do polohy R7. Pro výsledné léčivo je důležité použít vhodnou kombinaci substitucí, která bude mít aditivní nebo synergický účinek (Carta, Palomba et al. 2011, Sharma, Das et al. 2022).

Další aktivity chinolonů

I přes selektivní působení antibakteriálních chinolonů na prokaryotní organismy, mohou ostatní chinolony nacházet své uplatnění i v léčbě onemocnění, která souvisí s malignitami eukaryotních buněk. Mezi tyto malignity patří tvorba rakovinných buněk, jejich napadení virem nebo infekce způsobená eukaryotním patogenem. Jejich mechanismus působení vždy souvisí s inhibicí některého z proteinů, který se účastní tvorby nukleové kyseliny, DNA nebo RNA. V drtivé většině dochází k cílení na topoisomerasy. Výjimku tvoří například některé molekuly působící jako antivirotika. Existuje mnoho studií prokazujících, že změnou struktury se mění specifita vazby na konkrétní topoisomerasu nebo podobný protein a s ní i účinek. Důsledkem toho je významný potenciál chinolonů v různých klinických aplikacích. Tyto aplikace zahrnují léčbu malárie, protinádorovou aktivitu, terapii virových onemocnění, jako je například AIDS (z angl. acquired immune deficiency syndrome) způsobený virem HIV (z angl. human immunodeficiency virus), léčbu mykóz od kvasinkových infekcí po mikromycetové infekce a mnoho dalších (Liang, Wu et al. 2019, Senerovic, Opsenica et al. 2020, Sharma, Das et al. 2022).

Závěr

Mechanismus účinku chinolonových antibiotik, zejména fluorochinolonů, spočívá v inhibici bakteriálních enzymů, gyrasy a topoisomerasy IV. Chinolony tedy

narušují procesy spojené s bakteriální DNA, což vede ke smrti bakteriálních buněk. Vzhledem k dynamické povaze bakteriálních populací a jejich adaptabilitě, vzniká na chinolonová antibiotika rezistence. Protože chinolony zůstávají důležitou součástí antibiotické léčby, je nezbytné neustále sledovat výskyt rezistence a vyvíjet nové strategie pro její prevenci a řešení. Pouze tak můžeme zajistit efektivní léčbu bakteriálních infekcí a minimalizovat riziko šíření rezistentních

mikroorganismů. Další klinické využití chinolonů je předmětem řady studií.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu „Národní institut virologie a bakteriologie“ (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

Literatura

Aldred, K. J., R. J. Kerns and N. Osheroff (2014). "Mechanism of Quinolone Action and Resistance." *Biochemistry* **53**(10): 1565-1574.

Aldred, K. J., H. A. Schwanz, G. Li, S. A. McPherson, C. L. Turnbough, Jr., R. J. Kerns and N. Osheroff (2013). "Overcoming Target-Mediated Quinolone Resistance in Topoisomerase IV by Introducing Metal-Ion-Independent Drug-Enzyme Interactions." *ACS Chemical Biology* **8**(12): 2660-2668.

Anderson, V. R. and C. M. Perry (2008). "Levofloxacin: a review of its use as a high-dose, short-course treatment for bacterial infection." *Drugs* **68**: 535-565.

Beneš, J. (2018). *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*, Grada Publishing.

Berger, J. M., S. J. Gamblin, S. C. Harrison and J. C. Wang (1996). "Structure and mechanism of DNA topoisomerase II." *Nature* **379**(6562): 225-232.

Beteck, R. M., A. Jordaan, R. Seldon, D. Laming, H. C. Hoppe, D. F. Warner and S. D. Khanye (2021). "Easy-to-access quinolone derivatives exhibiting antibacterial and anti-parasitic activities." *Molecules* **26**(4): 1141.

Brar, R. K., U. Jyoti, R. K. Patil and H. C. Patil (2020). "Fluoroquinolone antibiotics: An overview." *Adesh University Journal of Medical Sciences & Research* **2**(1): 26-30.

Bush, N. G., I. Diez-Santos, L. R. Abbott and A. Maxwell (2020). "Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance." *Molecules* **25**(23): 5662.

Carta, A., M. Palomba, I. Briguglio, P. Corona, S. Piras, D. Jabes, P. Guglielame, P. Mollicotti and S. Zanetti (2011). "Synthesis and anti-mycobacterial activities of triazoloquinolones." *European journal of medicinal chemistry* **46**(1): 320-326.

De Oliveira, D. M., B. M. Forde, T. J. Kidd, P. N. Harris, M.A. Schembri, S. A. Beatson, D. L. Paterson and M. J. Walker (2020). "Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens." *Clinical microbiology reviews* **33**(3).

Fàbrega, A., S. Madurga, E. Giralt and J. Vila (2009). "Mechanism of action of and resistance to quinolones." *Microbial Biotechnology* **2**(1): 40-61.

Fournier, B., X. Zhao, T. Lu, K. Drlica and D. C. Hooper (2000). "Selective Targeting of Topoisomerase IV and DNA Gyrase in *Staphylococcus aureus*." *Differe*

rent Patterns of Quinolone- Induced Inhibition of DNA Synthesis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(8): 2160-2165.

Hampl, F., Rádl S., Paleček J. (2015). *Farmakochemie*. Praha 6, Vysoká škola chemicko-technologická.

Haria, M. and H. M. Lamb (1997). "Trovaflaxacin." *Drugs* **54**: 435-445.

Hutchings, M. I., A. W. Truman and B. Wilkinson (2019). "Antibiotics: past, present and future." *Curr Opin Microbiol* **51**: 72-80.

Jian, J. Y. and N. Osheroff (2023). "Telling Your Right Hand from Your Left: The Effects of DNA Supercoil Handedness on the Actions of Type II Topoisomerases." *International Journal of Molecular Sciences* **24**(13): 11199.

Kaur, P., Anuradha, A. Chandra, T. Tanwar, S. K. Sahu and A. Mittal (2022). "Emerging quinoline-and quinolone-based antibiotics in the light of epidemics." *Chemical Biology & Drug Design* **100**(6): 765-785.

Khordusky (1995). "Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**(25): 11801-11805.

Kodíček, M., O. Valentová and R. Hynek (2015). *Biochemie, chemický pohled na biologický svět*, Praha.

Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey and R. P. Brundage (1962). "1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents." *Journal of Medicinal Chemistry* **5**(5): 1063-1065.

Liang, X., Q. Wu, S. Luan, Z. Yin, C. He, L. Yin, Y. Zou, Z. Yuan, L. Li, X. Song, M. He, C. Lv and W. Zhang (2019). "A comprehensive review of topoisomerase inhibitors as anticancer agents in the past decade." *European Journal of Medicinal Chemistry* **171**: 129-168.

Lincova, D. and H. Farghali (2002). "Základní a aplikovaná farmakologie.[Basic and applied pharmacology]." *Galen, Universita Karlova*.

Markham, B. E., J. E. Harper and D. W. Mount (1985). "Physiology of the SOS response: Kinetics of *lexA* and *recA* transcriptional activity following induction." *Molecular and General Genetics MGG* **198**(2): 207-212.

Millanao, A. R., A. Y. Mora, N. A. Villagra, S. A. Bucarey and A. A. Hidalgo (2021). "Biological Effects of Quinolones: A Family of Broad-Spectrum Antimicrobial Agents." *Molecules* **26**(23): 7153.

Literatura (pokračování):

Organization, W. H. (2019). The WHO special initiative for mental health (2019-2023): universal health coverage for mental health, JSTOR.

Pan, X.-S., J. Ambler, S. Mehtar and L. M. Fisher (1996). "Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**(10): 2321-2326.

Pham, T. D., Z. M. Ziora an, M.A. Blaskovich (2019). "Quinolone antibiotics." *Medchemcomm* **10**(10): 1719-1739.

Plackett, B. (2020). "Why big pharma has abandoned antibiotics." *Nature* **586**(7830): S50-S52.

Pommier, Y., E. Leo, H. Zhang and C. Marchand (2010). "DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs." *Chemistry & biology* **17**(5): 421-433.

Rahlwes, K. C., B. R. Dias, P. C. Campos, S. Alvarez-Arguedas and M. U. Shiloh (2023). "Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*." *Virulence* **14**(1): 2150449.

San Millan, A. (2018). "Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context." *Trends in microbiology* **26**(12): 978-985.

Senerovic, L., D. Opsenica, I. Moric, I. Aleksic, M. Spasić and B. Vasiljevic (2020). Quinolines and Quinolones as Antibacterial, Antifungal, Anti-virulence, Antiviral and Anti-parasitic Agents. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health: Volume 14*. G. Donelli. Cham, Springer International Publishing: 37-69.

Sharma, V., R. Das, D. Kumar Mehta, S. Gupta, K. N. Venugopala, R. Mailavaram, A. B. Nair, A. K. Shakya and P. Kishore Deb (2022). "Recent insight into the biological activities and SAR of quinolone derivatives as multifunctional scaffold." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **59**: 116674.

Tang, K. and H. Zhao (2023). "Quinolone Antibiotics: Resistance and Therapy." *Infection and Drug Resistance* **16**(null): 811-820.

Tang, K. and H. Zhao (2023). "Quinolone antibiotics: Resistance and therapy." *Infection and Drug Resistance*: 811-820.

Tang, Y., Y. Zhou, B. He, T. Cao, X. Zhou, L. Ning, E. Chen, Y. Li, X. Xie, B. Peng, Y. Hu and S. Liu (2023). "Investigation of the immune escape mechanism of *Treponema pallidum*." *Infection* **51**(2): 305-321.

Thai, T., B. H. Salisbury and P. M. Zito (2023). Ciprofloxacin. *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing.

Vann, K. R., A. A. Oviatt and N. Osheroff (2021). "Topoisomerase II Poisons: Converting Essential Enzymes into Molecular Scissors." *Biochemistry* **60**(21): 1630-1641.

Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura and S. Nakamura (1990). "Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*." *Antimicrobial agents and chemotherapy* **34**(6): 1271-1272.

Zhang, B. (2019). "Quinolone derivatives and their antifungal activities: An overview." *Archiv der Pharmazie* **352**(5): 1800382.

Souhrn

Chinolony a zejména pak jejich fluorované deriváty se pro své baktericidní účinky využívají v klinické praxi jako širokospektrá antibiotika. Mechanismus účinku chinolonových antibiotik spočívá v inhibici enzymů topoisomerasy, které jsou klíčové pro regulaci syntézy DNA bakterií. Výskyt rezistence vůči těmto antibiotikům se ale zvyšuje, což komplikuje jejich terapeutické využití. Pochopení mechanismů účinku a rezistence je klíčové pro vývoj strategií pro prevenci a řešení problému rezistence a zachování účinnosti chinolonových antibiotik v léčbě bakteriálních infekcí.

Klíčová slova: chinolony, fluorochinolony, antibiotika, antibiotická rezistence, tuberkulóza

Summary

Quinolones and especially their fluorinated derivatives are used in clinical practice as broadspectrum antibiotics due to their bactericidal effects. The mechanism of action of quinolone antibiotics is the inhibition of topoisomerase enzymes, which are crucial for the regulation of bacterial DNA synthesis. However, the incidence of resistance to these antibiotics is increasing, complicating their therapeutic use. Understanding the mechanisms of action and resistance is key to developing strategies to prevent and address the problem of resistance and to maintain the efficacy of quinolone antibiotics in the treatment of bacterial infections.

Keywords: quinolones, fluoroquinolone, antibiotics, antibiotics resistance, tuberculosis

MARGARÍN A ROZTÍRATELNÉ TUKY V NAŠÍ VÝŽIVĚ

Vladimír Filip, Markéta Berčíková, Katsiaryna Kalenchak

Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

vladimir.filip@vscht.cz

Úvod

V letošním roce uplyne již 155 let, co byl v tehdejší Francouzské císařství zveřejněn objev margarínu a zavedena jeho výroba nejprve ve Francii a následně v řadě zemí Evropy a světa. I když jeho počátky vycházely z poznatků o výrobě másla, lépe řečeno, byly přímo máslem inspirovány, tak dnes se jedná o svěbytný produkt. I když legislativa nezakazuje používat pro jeho výrobu i živočišné tuky, zpravidla se jedná o výrobkovou skupinu založenou na produkci rostlinných olejů a tuků. Ve vzájemném synergismu s expanzí produkce margarínu byla ve 20. století technologie parciální katalytické hydrogenace, známá spíše jako ztužování olejů, která na počátku století byla zavedena, expandovala a v závěru století a počátkem 21. století, v souvislosti s novými poznatky o výživě, zcela zanikla a byla nahrazena technologií transesterifikace triacylglycerolů. Tato reakce je v současnosti heterogenně katalyzována specifickými *sn-1,3* – lipasami imobilizovanými na pevném nosiči.

Objev margarínu a další vývoj za uplynulých 150 let

Ve 2. polovině 19. století dochází v Evropě a v Severní Americe k výraznému nárůstu populace, tato rychlost byla tehdy větší nežli v Asii nebo v Africe. S tím je spojen růst poptávky po potravinách. Možnosti růstu tradiční produkce živočišných tuků již byly omezené. Týkalo se to zejména másla a na tuto situaci reagovala vláda Ludvíka Napoleona – Napoleona III. ve Francii, která za vypsala cenu na výrobu levnější, a více údržné náhrady másla, určené pro občany s nižšími příjmy a pro armádu¹. Tuto cenu vyhrál francouzský chemik Hippolyte Mège-Mouriés, který v roce 1869 za svůj objev obdržel patent² a získal koncesi na výstavbu závodu na výrobu produktu v Poissy u Paříže. Produkt nejprve označoval jako levnější máslo (*beurre économique*) a následně jako margarín. A nyní jak se k tomuto názvu přišlo, a z čeho byl vůbec tento produkt vyráběn?

Zde je na místě uvést historické souvislosti:

Název margarín je odvozen od kyseliny margarové, kterou popsal v roce 1814 francouzský chemik Michel Eugène Chevreul. Když izoloval po zmýdelnění vepřového sádla mastné kyseliny, domníval se, že objevil novou mastnou kyselinu, která se mu jevila jako perleťově zbarvené krystaly; v řečtině márgaron znamená perlu, v latině je perla margarita. Dnes víme, že se jednalo o eutektickou směs kyselin palmitové a stearové, nikoliv o kyselinu heptadekanovou (Andersen 1965).

Z pohledu výběru zdroje tuku, H. Mège-Mouriés vyšel z úvahy o příbuznosti tuku mléčného a tělního – kravského loje, protože pochází ze stejného zvířete. Když byly krávy drženy několik dní bez potravy, dávaly mléko i nadále, i když v menším množství a postupně

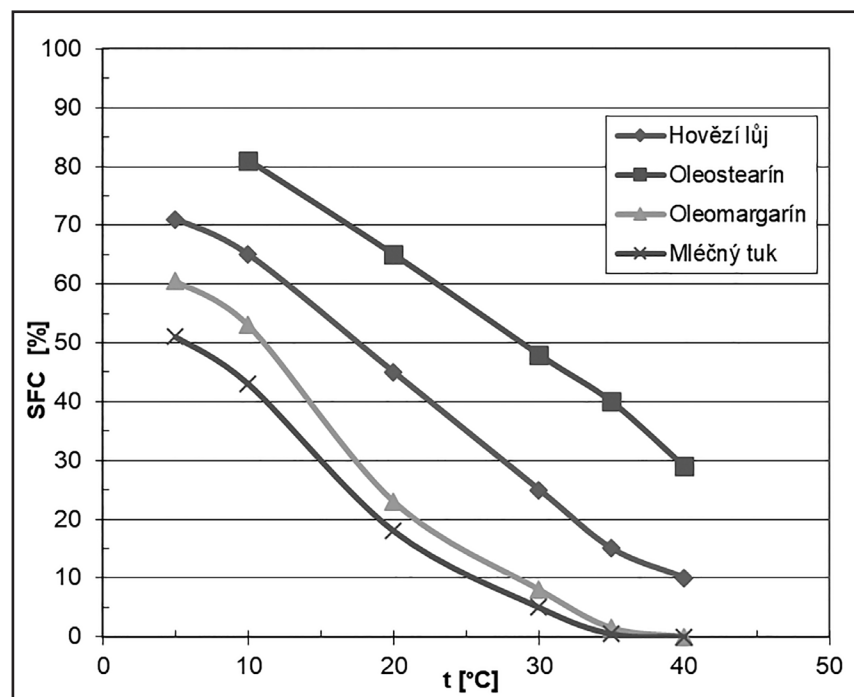
ztrácely tělesnou hmotnost, ale mléko stále obsahovalo tuk, který podle jeho závěru mohl pocházet pouze z tělesného tuku, tedy z loje krávy. Protože lůj je mnohem tvrdší a výše tající nežli tuk mléčný, domníval se, že určitým metabolickým a resorpčním procesem dochází k frakcionaci tuku, přičemž měkčí frakce s bodem tání podobným tuku mléčnému jsou krevním řečištěm transportovány do mléčných žláz vemene, kde se působením enzymů mění na tuk mléčný¹.

Dnes působí tato úvaha úsměvně, nicméně Mège-Mouriés provedl frakcionaci hovězího loje fyzikálně krystalizací při teplotě 25 – 30 °C, oddělil tvrdou oleo-stearinovou frakci (cca 40 %) a tukovou směs o nižším bodu tání, která měla bod tání přibližně jako mléčný tuk, nazval oleo-margarín (cca 60 %) a použil ji pro výrobu svého produktu. Absenci kratších mastných kyselin, typických pro kravský mléčný tuk, vysvětloval, že vznikají až v mléce degradačními pochody. Za hlavní mastné kyseliny triacylglycerolů oleo-margarínu byla považována kyselina margarová – heptadekanová a kyselina olejová, zatímco oleo-stearinová frakce měla obsahovat hlavně kyselinu stearovou. Tak se stalo, že vůbec nebyla uvažována existence kyseliny palmitové, která se „ztratila“ společně s kyselinou stearovou v eutektiku, které bylo považováno za kyselinu heptadekanovou. Přitom existence samotné kyseliny stearové byla potvrzena v oleostearinové frakci (Andersen 1965, Bockisch 1998). Nicméně nápad s frakční krystalizací loje byl úspěšný minimálně z pohledu fyzikálních vlastností: jak tuk mléčný, tak oleomargarínová frakce krystalizují, resp. jejich triacylglyceroly, v modifikaci β' , jejíž malé krystaly vytvářejí prostorovou síť a velmi podobné jsou i závislosti obsahu pevných podílů (SFC – *solid fat content*) na teplotě (Obr. 1). Za předpokladu, že dva tuky mají stejný teplotní profil tuhých podílů a při krystalizaci vykazují stejné polymorfy, lze předpokládat korelaci reologických parametrů s SFC profilem.

Další postup napodoboval vznik smetany a vlastní výrobu másla ze smetany. Emulgace oleo-margarínu s odstředěným mlékem se provedla přibližně ve stejném poměru při tělesné teplotě a dokonce za přítomnosti extraktu z kravského vemene, aby vznikly tukové kuličky, jako při tvorbě mléka! Emulze se ochladila ledovou vodou a ztuhlá zrnitá hmota, podobná máselnému zrnku při stloukání másla, se mechanicky zpracovala a nasolila⁴. Vynálezce označil svůj produkt nejprve jako „odrůdu pravého másla odebraného u zdroje“, později jako „umělé máslo“ nebo butterine a nakonec jako margarín (Andersen 1968, Fr. Pat 1869).

Hned na počátku vznikl ve Francii problém s názvem, který by obsahoval slovo máslo, takže již 12. dubna 1872 rozhodla Hygienická rada v Paříži, že se nový výrobek může vyrábět a distribuovat, ale pod neklamavým názvem.

V průběhu 70. let se výroba margarínu velmi rychle rozšiřovala v evropských zemích (1873 – 74 v Rakousku, Itálii a v Německu), technologie byla patentována v USA a výrobu převzala společnost United States Dairy Company. Ale některé země jako Kanada a Jihoafrická unie ze začátku výrobu a prodej zakázaly. Problém s názvem a s rozlišením od másla řešily jednotlivé země vlastními silami, včetně zákonných ustanovení.



Obr. 1: Závislost obsahu pevných podílů (SFC) na teplotě pro hovězí lůj, jeho frakce oleostearín a oleomargarín a pro kravský mléčný tuk.

Na začátku byla výroba margarínu úzce spojena s chovem skotu a s mlékárenstvím. Použitá tuková surovina – lůj, pocházela z depotního tuku skotu a vlastní výroba margarínu v podstatě kopírovala technologii výroby másla, používala se stejná zařízení. To vedlo ke zvýšené poptávce po hovězím loji a v Americe vzrostla jeho produkce. Brzy se však ukázalo, že to nestačí na růst poptávky v Evropě. Vedle hlavní suroviny, která zpravidla činila 70 %, se proto začal používat i vnitřnostní lůj, označovaný jako Premier Jus a částečně rostlinné oleje. Koncem 19. století jsou již zvládnuty technologie jejich rafinace. Nicméně se surovin nedostává a relativně omezené je i množství vhodných rostlinných tuků – z pohledu konzistence. Nicméně před 1. světovou válkou podíl rostlinných olejů a tuků na výrobě margarínu v Evropě je již 80 %, a z toho 60 – 65 % činí podíl laurových tuků, tedy kokosový a palmojádrový olej, ale i tyto zdroje byly ve své době omezené (Andersen 1965).

Zlom v dostupnosti tuků vhodné konzistence přináší od let 1910 – 1911 technologie parciální katalytické hydrogenace rostlinných a živočišných, velrybích, olejů. Technologii procesu hydrogenace a přípravy Ni-katalyzátoru rychle přejímají společnosti Procter and Gamble v USA, Schicht v Ústí n/L, Van den Bergh v Holandsku a Ölwerke Germania v Německu (Gemeinschaftsarbeiten 1976).

Výrobci margarínu se tak stávají nezávislími na zdrojích hovězího loje a sádla. Podíl ztužených tuků brzy dosahuje 20 – 30 % tukového podílu veškeré výroby margarínu.

Vývoj technologie výroby margarínu

Postupně se technicky a technologicky vyvíjí vlastní výroba, ve které se uplatňují dvě jednotkové operace:

emulgace mléka a tuku za vzniku emulze v/o a krystalizace části tukového podílu s následnými fyzikálními změnami. Původní vynález využívá emulgačních schopností mléčných složek, hlavně proteinů a vedení emulgace probíhá na stejném zařízení, jako stloukání smetany na máslo. Máselnice pro emulgaci byla brzy nahrazena emulzním zařízením s příhradovými míchadly zvaným kirna (máselnice, kde vzniká máselné zrno, staroseversky karna, švédsky kärna, hornoněmecky Kern) (<https://bastmattan.blogspot.com/2017/11/smorigt.html> (8. 4. 2024)).

Přímé chlazení vzniklé emulze ledovou vodou je málo účinné, dochází ke ztrátám jak mléčné, tak i části tukové složky. První významné zlepšení proto představuje nepřímé chlazení na vnější ploše otáčejícího se, vnitřně chlazeného válce, tzv. chladičího bubnu s účinnými hodnotami výměny tepla. Odškrábání šupinky margarínu poté fyzikálně zrají, před finálním mechanickým zpracováním a balením. Tato šaržová technologie kirna – chladičí buben se objevuje

po 1. světové válce a udržela se až do 50. let minulého století (Andersen 1965, Bockisch 1998). Byla dále doplněna hnětači na homogenizaci vložek margarínu po krystalizaci – fyzikálním zrání, a tím se umožňovalo i částečné odvzdušnění (Bockisch 1998).

Průlom v technologii margarínu znamenal rok 1938, kdy americká společnost Girdler Corporation ukončuje vývoj tzv. oškrabovaného chladiče – votátoru (Andersen 1965, Bockisch 1998). Tato koncepce umožnila spojení jednotkových operací emulgace a krystalizace, tedy procesů výměny hmoty a tepla, do jednoho zařízení a kontinualizaci výroby. Votátor jako výměník tepla je konstrukce trubka v trubce, chladičem je amoniak. Uvnitř vnitřní trubky je rotor, jehož lišty stírají teplosměnnou plochu a zde proudí margarínová hmota. V soustavě 3 votátorů s vřazeným krystalizátorem je ukončena emulgace a probíhají fáze nukleace a počáteční růst krystalů. To je postačující pro soft-margaríny („kelímkové“), protože ve fázi balení musí hmota ještě téci. V případě výroby margarínu stolního a tažného je posledním členem navíc tzv. uzrvač, kde dobiehá proces krystalizace a začíná fáze post-krystalizačních změn³. Tato technologie tvoří základ výroby margarínu v současnosti a odlišnost spočívá zpravidla ve způsobu přípravy margarínové emulze, který je buď kontinuální nebo šaržový – premixový. Premixový způsob přípravy

hrubé emulze je dnes, díky použití automatického vá-
žicího systému, automatizovaný.

Na konci tohoto historického exkurzu lze konstatovat, že dlouho trvalo, nežli se výroba margarínu od-
dělila od způsobu výroby másla, a to nejen z pohledu
vlastní technologie, ale i emulgace založené na povr-
chově aktivních vlastnostech mléčných proteinů, a tím
obecněji na charakteru vodné fáze. Teprve zavedení
výroby monoacylglycerolových emulgátorů ve 30. le-
tech a později, umožnilo eliminovat mléko, jehož pro-
teiny tvořily do té doby hlavní emulgační složku, pouze
doplňovanou vaječnými fosfolipidy (Andersen 1965).

Vodnou fázi klasického margarínu představovalo pl-
notučné mléko, později odstředěné, a nakonec obno-
vené ze sušeného mléka. Mléko se podrobovalo mléč-
né fermentaci mezofilní smetanovou kulturou a tím se
stalo nositelem kyselin (mléčná, octová) a aromatic-
kých látek jako je diacetyl a acetoin. Poválečný vývoj
vedl k úplnému vyřazení mléka, místo něj se použí-
vá zředěná sladká syrovátka nebo pouze pitná voda
a kyseliny i aromatické látky se do této vodné fáze
přidávají. Standardně se používá monoacylglycerolový
emulgátor, někdy v kombinaci s rostlinným lecitinem
(<https://bastmattan.blogspot.com/2017/11/smorigt.html> (8. 4. 2024)). Tím se otevřela cesta pro možnost
výroby prakticky sterilních margarínů.

Otázka mikrobiologické stability

V počátcích výroby margarínu jeho doba úchovy ko-
pírovala úchovu másla, podmínky výroby a zacházení
se surovinami byly podobné. Z pohledu nárůstu nežá-
doucích bakterií situaci zlepšovala hodnota pH, díky
mléčné fermentaci se jednalo o kyselou potravinu.
Nicméně fakt, že všechna zařízení byla otevřená, činil
otázku mikrobiální čistoty a stability vždy problematic-
kou. Postupně se začíná pasterovat, případně sterilovat
vodná fáze, na počátku mléko, dnes hlavně sladká
obnovená syrovátka nebo pitná voda.

Aby se dosáhlo praktické sterility výrobku, je nut-
né jej pasterovat celý, v tomto případě celou emulzi.
Původně se používaly systémy trubkových výměníků
s turbulentním tokem emulze (Andersen 1965), mo-
derní zařízení pracují na podobném principu jako votá-
tor⁸: nestabilní emulze je zahřívána ve válci nepřímo
a je neustále na teplosměnném povrchu míchána. Tím
je zaručen poměrně rovnoměrný přestup tepla i obno-
vování kineticky nestabilní emulze. Tím je umožněna
i výroba margarínů s nižšími obsahy tuku, než je 80 %,
zejména z obsahu tuku 40 – 60 %.

Struktura a textura margarínu

Typická laická odpověď je, že se jedná o emulzi, to
je jen částečná pravda. Jednoduchá emulze je sou-
stava dvou omezeně mísitelných kapalin, kde jed-
na je rozptýlena v druhé. V případě margarínu tento
stav odpovídá fázi emulgace. Jakmile začne probíhat
krystalizace, uvnitř tukové fáze začne vznikat nová
fáze. Vznikají krystaly pevné fáze a je otázkou, jak se
vůči sobě vzájemně chovají.

Klíčové pro strukturu, a následně texturu margarínu,
je chování triacylglycerolů tukové násady v průběhu

krystalizace. Tuková násada je složena ze strukturního
tuku a kapalného oleje. Ideální je vývin malých krystalů
triacylglycerolů strukturního tuku, které jsou schopné
spolu asociovat a vytvořit *prostorovou krystalovou síť*,
která je obklopena kapalnými triacylglyceroly (Heertje
2014). Takové požadavky splňují polymorfy triacylgly-
cerolů strukturního tuku β' , zatímco polymorfy β jsou
pro margarín nežádoucí. Polymorfy β vytváří velké kry-
staly, které spolu minimálně asociují (takové chování je
typické pro pokrmové tuky, primárně pro sádlo).

Dalším požadavkem na vzniklé krystaly polymorfu
 β' je kinetická stabilita po dobu doporučené spotřeby
při doporučených skladovacích teplotách, zpravidla do
10 °C (termodynamicky stabilní je ale polymorf β).

Prostorovou krystalovou síť lze chápat jako základ
oleogelu, stukturní tuk jako oleogelátor (Chai 2022).
Na specifickém povrchu prostorové krystalové sítě jsou
pak adsorbovány molekuly kapalných triacylglycerolů,
tato interakce se popisuje jako imobilizace kapalných
triacylglycerolů na prostorové krystalové síti (Heertje
2014).

Margarín je tedy tvořen třemi fázemi: nespojitou
vodnou fází, která vytváří kapénky emulze v/o, spoji-
tou fází pevných podílů strukturního tuku a spojitou
fází kapalných podílů triacylglycerolů. Z reologického
pohledu se jedná o viskoelastickou newtonskou ka-
palinu s výraznou tixotropií.

Strukturní tuk a tuková násada

Základem pro strukturu a texturu margarínu je
strukturní tuk. Jak již bylo uvedeno, původně se po-
užívala frakce hovězího loje, kokosový, palmojádrový
nebo palmový olej a jejich směsi, tedy tuky „vhod-
né konzistence“. Tyto zdroje přestávaly časem stačit,
a hlavní technologií pro výrobu strukturních tuků se
ve 20. století stala technologie ztužování tuků, přes-
něji parciální katalytická hydrogenace. Podstatou
procesu bylo postupné vysycování násobných vazeb
polynenasycených mastných kyselin triacylglycerolů
a reakci bylo nutné zastavit v momentě, kdy hlavním
produktem jsou monoenové řetězce a současně ještě
nedošlo k významnému nárůstu obsahu nasycených
mastných kyselin. Souběžně probíhají izomerace dvoj-
ných vazeb, geometrická izomerace do rovnovážného
poměru cca 7:3, ve prospěch *trans*-izomerů. Nejběž-
nější ztužené tuky pro výrobu margarínů jako řepkový
nebo sójový s bodem tání 31 – 33 °C tak obsahova-
ly 55 – 60 % *trans*-izomerů (Bockisch 1998), které
ve skutečnosti představovaly hlavní reakční produkt.

Tak jak se v 80. – 90. letech objevují nové poznatky
o negativním vlivu *trans*-tuků na lidské zdraví, typic-
ky na hladinu cholesterolu (Mensink 1990, Ascherio
1997), tak v ČR a v EU v průběhu 90. let technologie
parciální katalytické hydrogenace končí. Definitivní
tečku pak učinilo rozhodnutí FDA v USA o povinném
značení *trans*-tuků od 1. 1. 2006 a Nařízení komise
(EU) 2019/649 z 24. 4. 2019. Za zmínku stojí uvést, že
ještě po 2. světové válce se hydrogenovaly rybí oleje
a velrybí trány obsahující C20 a C22 mastné kyseliny,
včetně esenciálních řady n-3, které tak byly nenávrat-
ně ztraceny. Margaríny z rostlinných olejů a tuků začaly

dominovat na trhu až ve 2. polovině minulého století (Andersen 1965, Bockisch 1998).

Průmysl na tuto situaci reagoval vývojem strukturálních tuků vyrobených na bázi transesterifikace směsi triacylglycerolů. Strukturální tuky na bázi nasycených mastných kyselin se vyrábí reakcí palmojádřového tuku buď s palmstearinem nebo s plně nasyceným rostlinným tukem ve vhodném poměru. Tím se získá směs TAG obsahující středně dlouhé (C8 – C12) a dlouhé (C14 – C16 – C18) mastné kyseliny. Reakce se katalyzuje buď alkalicky, typicky methoxidem sodným³ nebo enzymově. V současné době se odhaduje, že již téměř celá evropská produkce strukturálních tuků je vyráběna za katalýzy imobilizovanými lipasami. S výhodou se používají specifické *sn*-1,3-lipasy imobilizované na polymerní matici, např. na SiO₂, což umožňuje vedení procesu v reaktorech s pevným ložem katalyzátoru (Willis 2008). Z nutričního pohledu se považuje za významné, že poloha acylu v *sn*-2-poloze triacylglycerolu, zůstává zachována (Cui 2022, Zhang 2021). Na konec je třeba uvést, že do tukových násad se používají frakce palmového oleje, které se pak rovněž podílejí na struktuře a texturní charakterizaci margarínu.

Strukturální tuk vyrobený transesterifikací umožňuje výrobu tukových násad s obsahem trans mastných kyselin < 1 %, což představuje technologické minimum. Trans mastné kyseliny byly z pohledu struktury nahrazeny nasycenými mastnými kyselinami. Rostlinné oleje jsou zdrojem nenasyčených, a hlavně esenciálních mastných kyselin.

Poměr strukturálního tuku a rostlinného oleje (typicky řepkový, sójový, slunečnicový) v tukové násadě umožňuje měnit teplotní profil obsahu tuhých podílů (Obr. 2) a tím i reologické parametry – typicky např. roztíratelnost v závislosti na teplotě. Tak se vyrábějí margaríny určené pro snadné roztírání při chladnič-

kových teplotách („soft margarines“, podle balení „kelímkové“), pro přípravu těst, pro pečení („stick“ nebo „hard“, podle balení „tabletové“), speciální margaríny s vysokými nároky na reologické vlastnosti určené pro přípravu plundrových nebo listových těst (tzv. „tažný margarín“).

V zásadě dnešní možnosti a stav technologie umožňuje koncipovat tukovou násadu ve vyvážených poměrech monoenových (hlavně kyselina olejová) a n-6 a n-3 esenciálních mastných kyselin – linolové a linolenové dle výživových doporučení. V nejjednodušším případě plní tuto funkci řepkový olej. Na druhé straně není dobré použití pouze slunečnicového oleje, i v kombinaci s olivovým, protože v těchto případech prakticky abscentují n-3 esenciální mastné kyseliny.

Z pohledu obsahu biologicky aktivních látek rostlinné oleje obsahují vysoké obsahy tokoferolů a tokotrienolů (102 mg/kg). Z pohledu vitaminizace se obvykle do tukových násad margarínů přidávají vitaminy A (retinyl-acetát) a D (cholekalCIFerol), případně beta-karoten, i když ten primárně jako barvivo.

Legislativa a závěr

Legislativa másla a margarínu byla vždy složitá, ke sjednocení dochází v rámci harmonizace legislativy EU. Nadřazeným pojmem je kategorie „Roztíratelné tuky“ a základní klasifikace (nařízení EU č. 1308/2013) vymezuje z hlediska obsahu tuku interval < 39 – 90 % hm.

Z hlediska složení tuku jsou vymezeny tři kategorie:

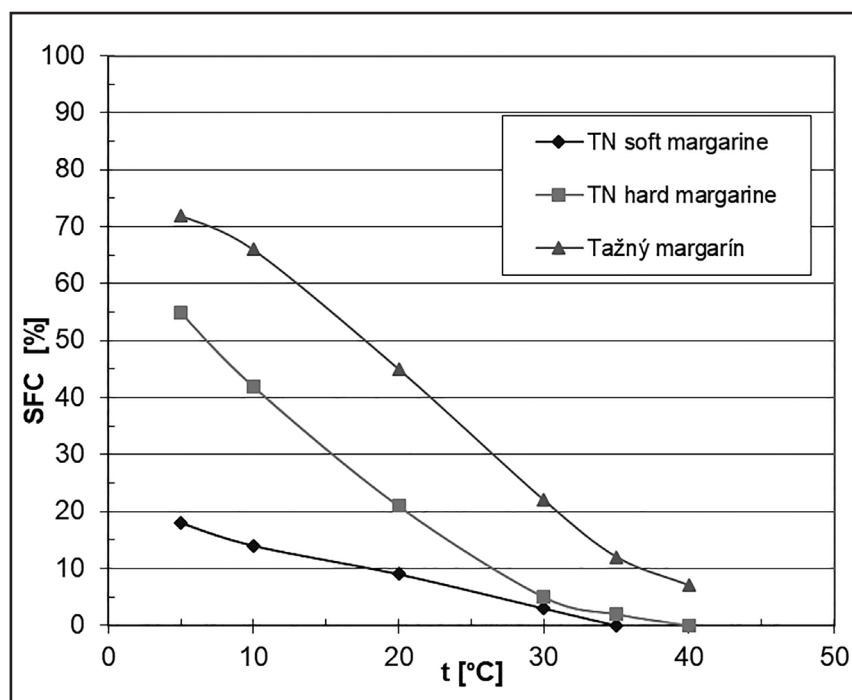
- Mléčné tuky
- Tuky
- Tuky složené z rostlinných nebo živočišných tuků (ale bližší specifikace v českém překladu dále užívá termín „směsné tuky“).

Podstatným legislativním specifikem je, že z množiny živočišných tuků je vyjmut mléčný tuk, což je důležité pro kategorii „Tuky“, kde obsah mléčného tuku může být < 3 % z celkového obsahu tuku – tím je ošetřeno například používání mléčného zákysu a jiné případy. Obsah mléčného tuku pak vytváří a definuje kategorii složených, resp. „směsných“ tuků, kde obsah mléčného tuku z celkového tuku je mezi 10 až 80 %.

V zásadě pro kategorie „Tuky“ a „Složené tuky“ mohou být použity jak rostlinné, tak živočišné tuky a jejich směsi, praktický pohled na evropský trh však dává jednoznačný obraz. Používají se téměř výhradně rostlinné tuky. Z pohledu zdrojů živočišných tuků by přicházely do úvahy vepřové sádlo, hovězí lůj a jeho frakce, případně rybí tuky.

Podle obsahu tuku se dosáhlo ve všech kategoriích sjednocení:

Obsah tuku ≥ 80 ≤ 90 % hm.: Máslo, Margarín a Směsný tuk (pouze máslo ≥ ≥ 82 % hm.).



Obr. 2: Závislost obsahu pevných podílů (SFC) na teplotě pro tukovou násadu soft margarínu („kelímkový“), hard-margarínu („tabletový“) a tažného margarínu.

Obsah tuku $\geq 60 \leq 62$ % hm.: Tříčtvrteční máslo, margarín, resp. směsný tuk.

Obsah tuku $\geq 39 \leq 41$ % hm.: výrobky se označují jako „Poloviční...“

Obsah tuku < 39 a > 41 < 60 a > 60 < 80 % hm.: Mléčná pomazánka X %, Roztíratelný tuk X % a Roztíratelný směsný tuk X %.

Výrobky jsou dále definovány jako emulze převážně v/o získané z mléka, resp. z tuhých a/nebo kapalných tuků a olejů.

Literatura

Andersen AJC, Williams PN (1965). *Margarine*, 2nd rev. ed., Pergamon Press, Oxford.

Ascherio A, Willett WC (1997). Health effects of trans fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1006S-10S.

Bockisch M (1998): *Fats and Oils Handbook*, AOCS Press, Champaign Ill.

Boudet, F. *Moniteur Scientifique*, Sept., 1872, 740.

Cui R, Xu L, Lan D et al. (2022). A novel *sn*-1, 3 specific lipase from *Janibacter* sp. as catalysts for the high-yield synthesis of long-medium-long type structured triacylglycerols. *Food Chem.* 266, 130523.

Chai X, Zhang Y, Shi Y, Liu Y (2022). Crystallization and Structural Properties of Oleogel-Based Margarine. *Molecules*, 27, 8952. doi.org/10.3390/molecules27248952.

Fr. Pat. (1869). 86,480.

Gemeinschaftsarbeiten der DGF, 67. Mitteilung Die Hydrierung von Fetten I; Fette, Seifen, Anstrichmittel 78, 385-394 (1976).

Heertje I (2014). Structure and function of food products. *Food Structure* 1, 3-23, doi.org/10.1016/j.foostr.2013.06.001.

[https:// bastmattan.blogspot.com/2017/11/smorigt.html](https://bastmattan.blogspot.com/2017/11/smorigt.html) (8. 4. 2024).

<https://useddairyequipment.com/en/stock/pasteuriser-for-margarine-emulsion> (8. 4. 1956).

Mensink RP, Katan MB (1990). Effect of Dietary trans Fatty Acids on High-Density and Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Healthy Subjects. *The new England J. of Medicine* 323, 439-445.

Whitehurst RJ (ed.) (2004). *Emulsifiers in Food Technology*, Blackwell Publ.

Willis WM, Marangoni AG (2008). Enzymatic Interestereification. In *Food Lipids*, 3rd ed., pp. 807-840, Akoh CC, Min DB editors, CRC Press.

Zhang Z, Lee WJ, Xie X et al. (2021). Enzymatic Interesterification of Palm Stearin and Palm Olein Blend Catalyzed by *sn*-1,3-Specific Lipase: Interesterification Degree, Acyl Migration, and Physical Properties. *Agric. Food Chem.* 69, 9056.

Souhrn

Vynález margarínu francouzským chemikem (H. Mège-Mouriés 1869) byl reakcí na řešení nedostatku tukových potravin při rychlém populačním růstu. Původně byl zamýšlen jako náhrada másla pro chudší vrstvy a pro armádu. Postupně se z něj stal svěbytný výrobek, resp. výrobová skupina v rámci segmentu roztíratelných tuků. S rostoucí poptávkou je spojen vývoj jednotkových operací emulgace a krystalizace tukových disperzí, zavedení i ukončení technologie parciální katalytické hydrogenace olejů a tuků mezi léty 1911 – 2019, která je pro výrobu strukturních tuků plně nahrazena transesterifikací tuků. Tato interesterifikační reakce je dnes v Evropě katalyzována téměř výhradně imobilizovanými specifickými *sn*-1,3-lipasami na pevném nosiči. To umožňuje výrobu margarínů požadované konzistence i složení mastných kyselin a jejich zastoupení v triacylglycerolech podle výživových doporučení.

Klíčová slova: margarín, historie výroby, technologie výroby, legislativa

Summary

The invention of margarine by a French chemist (H. Mège-Mouriés 1869) was a response to the shortage of fatty foods in the face of rapid population growth. It was originally intended as a substitute for butter for the poorer classes and for the military. Gradually, it became a distinct product or product group within the spreadable fat segment. The increasing demand is associated with the development of unit operations of emulsification and crystallization of fat dispersions, the introduction and discontinuation of the technology of partial catalytic hydrogenation of oils and fats between 1911 and 2019, which is fully replaced by transesterification of fats for the production of structural fats. This interesterification reaction is nowadays catalyzed almost exclusively by immobilized specific *sn*-1,3-lipases on solid support in Europe. This allows the production of margarines of the desired consistency and composition of fatty acids and their representation in triacylglycerols according to nutritional recommendations.

Keywords: margarine, production history, production technology, legislation

VLIV FOSFORU NA SPECIFICKOU PRODUKCI KALU A ÚČINNOST DENITRIFIKACE PRŮMYSLOVÝCH ODPADNÍCH VOD

Radim Staněk*, Jana Zábranská**

*Královéhradecká provozní, a. s. Víta Nejedlého 893, 500 03 Hradec Králové

**Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

radim.stanek@khp.cz, jana.zabranska@vscht.cz

Úvod

Fosfor je klíčovou živinou pro denitrifikační mikroorganismy, přičemž jeho hojnost pozitivně ovlivňuje jejich aktivitu. Heterotrofní denitrifikační bakterie patří mezi nejběžněji používané denitrifikační bakterie, které mohou přeměňovat dusičnany a dusitany na plyný dusík nebo oxidy dusíku, využívající organické látky jako dárce elektronů (Feng, Yang et al. 2020). Více bakteriálních kmenů s různými funkcemi a synergickými účinky je integrováno a vytváří spolehlivý mikroekosystém. Tato integrace je dosažena funkční komplementací různých bakteriálních kmenů, což vede k účinnému odstranění různých forem dusíku z odpadních vod. Aby se zabránilo nadměrnému množství fosforu v odtoku, ale aby se udržela denitrifikační aktivita v reaktoru, doporučuje se udržovat zásobování fosforem alespoň na úrovni 0,3 – 0,6 mg/L (Feng, Wu et al. 2023).

Denitrifikace neprobíhá kompletně bez dostatečného přísunu fosforu. Omezení fosforu ovlivňuje strukturální a funkční diverzitu bakterií (Samaddar, Chatterjee et al. 2019). Omezení fosforu snižuje efektivitu využití dusíku mikroby tím, že zvyšuje investice do tvorby extracelulárních enzymů (Sun, Li et al. 2023). Složení smíšené denitrifikační kultury se přizpůsobuje změnám podmínek, což vede k změnám zastoupení jednotlivých druhů, včetně specifických požadavků na fosfor (Xu, Peng et al. 2015, Fan, Wang et al. 2018). Mikroorganismy mohou v prostředí s omezeným fosforem nahradit fosfor jinými prvky, ale pouze do určité míry (de Vet, van Loosdrecht et al. 2012). Extrémně nízká koncentrace orthofosforu ($\text{PO}_4\text{-P}$), což je rozpustná reaktivní složka celkového fosforu, je primárním indikátorem podmínek omezujících rychlost v denitrifikačních reaktorech. Byly nalezeny prahové hodnoty, pod kterými se $\text{PO}_4\text{-P}$ stává živinou omezující rychlost: $\text{SP/SN} = 0,0086 \text{ g/g [P/N]}$ a $\text{SP/SM} = 0,0013 \text{ g/g [P/ChSK]}$, (SP je spotřeba fosforu, SN je spotřeba dusičnanového dusíku) (Boltz, Morgenroth et al. 2012).

Heterotrofní denitrifikace byla účinnější a nákladově efektivnější než autotrofní denitrifikace pro čištění povrchových vod, ale omezení přísunu fosforu inhibovalo heterotrofní denitrifikační bakterie více než autotrofní denitrifikanty. Výkon denitrifikace byl periodicky ovlivňován omezením koncentrace fosforu, zejména při nízkých teplotách vody (Wang, He et al. 2018).

Denitrifikace průmyslových odpadních vod

Průmyslové odpadní vody s vysokým obsahem dusičnanů a síranů představují velkou zátěž pro klasickou

technologii čištění odpadních vod (De Lucas, Rodríguez et al. 2005, Feng, Wu et al. 2023). Je možné pro čištění průmyslových odpadních vod aplikovat technologii denitrifikace, ale s ohledem na jejich extrémní složení vyžadující speciální podmínky. Mnohé chemické výroby používají přímo koncentrované směsi kyseliny dusičné a sírové, zejména pro výrobu nitrosloučenin, a výsledné odpadní vody obsahují nejen dusičnany, ale i sírany. Sírany by mohly být redukovány bakteriemi redukujícími sírany (SRB) na toxický a silně zapáchající sulfan v přítomnosti vysoké koncentrace síranů a snadno rozložitelného substrátu. Několik studií však ukázalo, že denitrifikační bakterie jsou schopny kompetitivní inhibice SRB, což může snížit aktivitu SRB, a dokonce i jejich zastoupení, což vede ke snížení koncentrace generovaných sulfidů (Zhao, Wang et al. 2013). Redukce síranů může nastat až po úplném odstranění dusičnanů, pokud je organický substrát stále přítomen, což souvisí s redox potenciálem.

Cílem studie bylo prozkoumat možnosti optimalizace stávající technologie denitrifikace aplikované na průmyslové odpadní vody z výroby nitrocelulózy. Odpadní voda obsahuje zbytky kyseliny dusičné a sírové a vláknatou nitrocelulózu uniklé z výroby, které je nutné odstranit před biologickou úpravou, aby se předešlo nepříznivým explozivním vlastnostem nadměrného biologického kalu. Koncentrace dusíkatého dusíku v surové odpadní vodě se pohybuje od 100 do 400 mg/L, síranové síry od 330 do 650 mg/L, pH kolem 1,5 a teplota 15 – 35 °C. Obsah fosforu a biologicky odbouratelných organických látek je zanedbatelný; proto je nutné pro úspěšnou denitrifikaci přidávat metanol a kyselinu fosforečnou. Hlavním cílem experimentů bylo zjistit limitní koncentraci dávkovaného fosforu, která bude stále zajišťovat požadovanou účinnost denitrifikace. Dalším cílem bylo zjistit, zda snížení dávky fosforu může vést ke snížení specifické produkce denitrifikační biomasy.

Materiál a metody

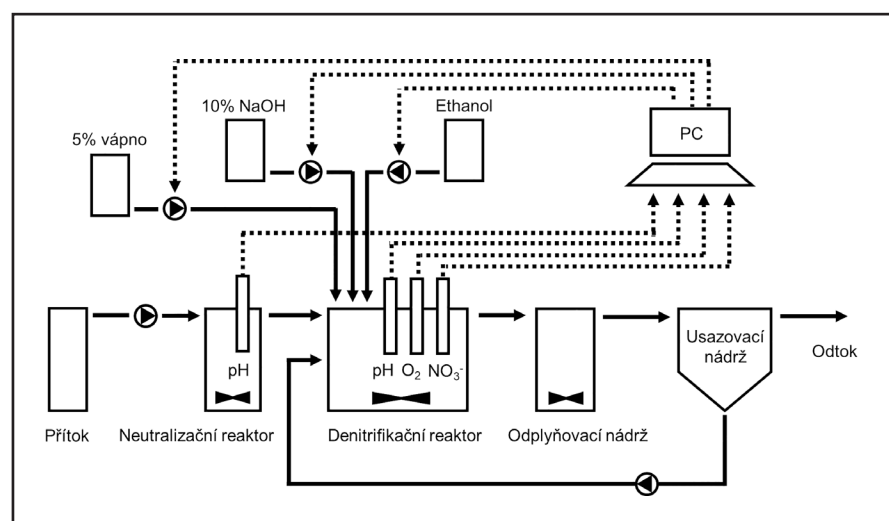
Popis denitrifikační čistírny průmyslových odpadních vod

Objem skutečně produkované odpadní vody je přibližně 2 miliony m^3 /rok. Čištění odpadní vody sestává z filtrace vláken nitrocelulózy, neutralizace a biologické denitrifikace. Z filtrační stanice je odpadní voda čerpána přes statický směšovač 1, kde se přidává 50% roztok hydroxidu sodného, do neutralizačního reaktoru. Vápno a hydroxid sodný slouží jako neutralizační činidla. Neutralizační reaktor o objemu 100 m^3 je mí-

chán ponornými míchadly. Po neutralizaci bylo pH odpadní vody asi 2,5. Další zvýšení pH na optimální hodnotu je zajištěno hydroxylovými ionty produkovanými procesem denitrifikace. Odpadní voda z neutralizačního reaktoru prochází statickým směšovačem do denitrifikačního reaktoru o objemu 3000 m³. Dávkování metanolu a kyseliny fosforečné zajišťuje podmínky pro denitrifikaci. Denitrifikační aktivovaný kal v denitrifikačním reaktoru je míchán dvěma ponornými míchadly. Směsný likér proudí z denitrifikačního reaktoru do odplyňovací nádrže. V této fázi jsou odstraňovány odpadní plynové bubliny obsahující hlavně dusík a oxid uhličitý, aby nedocházelo k zhoršení sedimentace kalu v následující dosazovací nádrži. Nadbytečný kal z biologického stupně a chemický kal z terciárního čištění jsou smíchány a jdou na úpravu kalu. Produkce nadbytečného kalu vede k vysokým provozním nákladům.

Popis pilotního modelu denitrifikace

Aby bylo možné otestovat možné zásahy do technologie, aniž by byla ohrožena účinnost plnoprovozní čistírny odpadních vod, byl postaven pilotní model čistírny. Návrh a objemy pilotního modelu odpovídají v měřítku 1: 100 000 velké čistírny odpadních vod. Schéma a fotografie modelu jsou uvedeny na Obr. 1 a Obr. 2.

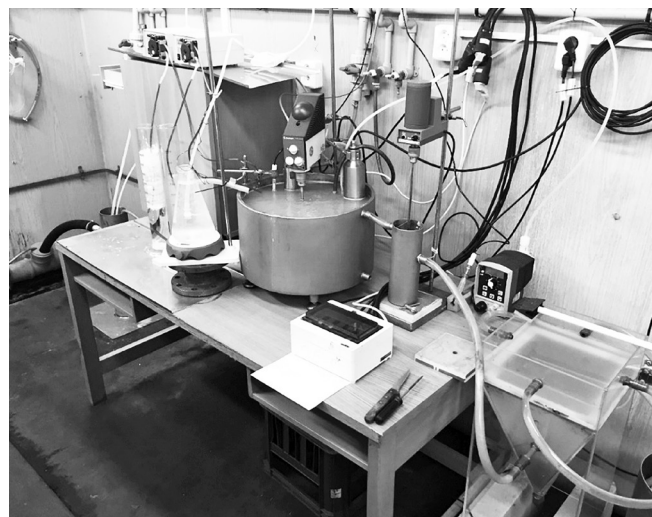


Obr. 1: Schéma pilotního modelu denitrifikačního procesu.

Pilotní model se skládá z radiálního nerezového denitrifikačního reaktoru o objemu 40 L, míchaného vertikálním laboratorním míchadlem Heidolph, a dále z nerezové válcové odplyňovací nádrže, míchané vertikálním laboratorním míchadlem IKA. V této fázi jsou odstraňovány bubliny odpadních plynů obsahujících hlavně dusík a oxid uhličitý, aby se zabránilo zhoršení sedimentace kalu v následující separační fázi. Tato fáze je vertikální čtvercový usazovák vyrobený z plexiskla o objemu 18 L. Vracený kal je čerpán membránovým čerpadlem Prominent Gama. Odtoková voda se akumuluje v nerezovém válci pro sběr vzorků.

V reaktoru jsou instalovány tři online sondy: Nitratex (Hach), která měří koncentraci dusičnanů a dusitanů

pomocí principu UV absorpce, LDO sonda (Hach) pro měření koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH sonda (Gryf HB).



Obr. 2: Foto kontinuálního denitrifikačního modelu.

Pilotní model byl provozován s reálnou odpadní vodou, přičemž požadované množství bylo odebíráno přímo z filtrační stanice odpadních vod. Odpadní voda je do pilotního modelu čerpána membránovým čerpadlem Prominent Gama, přičemž přítok je nastaven na 3 L/h.

Dávkování substrátu a neutralizačních činidel bylo automaticky řízeno systémem Gryf XBC. Hlavním neutralizačním činidlem bylo vápenné mléko o koncentraci 5 %, a pro vyrovnání neutralizace byl připraven 10% roztok hydroxidu sodného. pH v denitrifikačním reaktoru bylo udržováno v rozmezí 6,6 – 6,8. Jako substrát byl použit zředěný metanol s koncentrací ChSK 44 g/L, jehož dávkování bylo řízeno sondou Nitratex umístěnou v denitrifikačním reaktoru. Koncentrace dusíku v denitrifikačním reaktoru byla v rozmezí 9,5 – 10,5 mg/L. Analýzy SS, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, P-PO₄³⁻ a ChSK byly prováděny podle metod U.S. EPA.

Experimenty s různými dávkami fosforu

Kyselina fosforečná byla do denitrifikačního reaktoru dávkována jednou denně, uvedené koncentrace fosforu jsou počáteční v dávkovacím cyklu. Během experimentů byla dávka postupně snižována až do zastavení denitrifikace, poté bylo dávkování obnoveno a opět postupně zvyšováno podle Tab. 1.

Během experimentů byly sledovány záznamy online sond. Byla monitorována denní spotřeba substrátu a neutralizačního činidla, koncentrace oxidovaných forem dusíku, sedimentační vlastnosti kalu a množství nadbytečného kalu.

Tab. 1: Experimenty s různými dávkami kyseliny fosforečné.

experiment	trvání experimentu	dávka 85% H_3PO_4	P	P
	[d]	[mL/d]	[g/d]	[mg/L]
1	30	1,00	0,27	2,40
2	47	0,50	0,13	1,20
3	44	0,25	0,07	0,60
4	46	0,10	0,03	0,24
5	22	0,00	0,00	0,00
6	70	0,10	0,03	0,24
7	24	0,20	0,05	0,48

Výsledky a diskuze

Účinek omezení fosforu

Fosfor je spolu s dusíkem esenciální živinou nezbytnou pro fungování a růst každého živého organismu, včetně denitrifikačních mikroorganismů. Proto při sni-

žování dávky fosforu bylo zásadní určit bod, kdy se kapacita denitrifikace kalu zhorší kvůli nedostatku této živiny. Indikativním parametrem mohla být koncentrace oxidovaných forem dusíku, které by mohly přestat klesat i v přítomnosti organického substrátu. Nicméně při výrazných výkyvech koncentrace dusičnanů v přítokové reálné odpadní vodě nemusí být tento parametr snadno a včas detekovatelný.

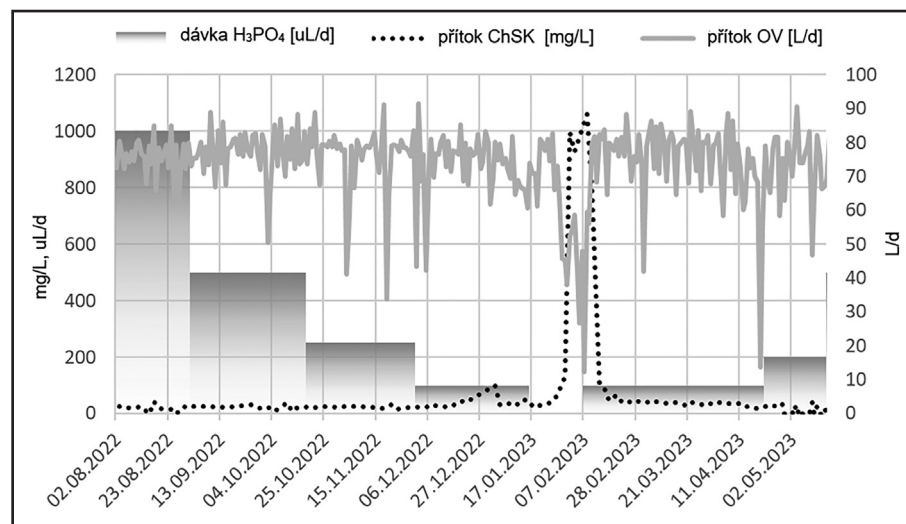
Pro řešení tohoto problému byla upravena kontrola dávkování odpadní vody do pilotního zařízení. Když koncentrace dusičnanů v reaktoru přesáhne 13,5 mg/L, čerpadlo se vypne a čeká na opětovné snížení koncentrace. Sledované provozní hodiny čerpadla za den a koncentrace dusíkatého dusíku představují míru zatížení dusičnanovým dusíkem. Ilustrace přítokové odpadní vody s dusičnany ve vztahu k dávce kyseliny fosforečné a koncentraci ChSK na odtoku je na Obr. 3.

K nejvýraznějšímu poklesu přítoku odpadních vod, který byl řízen podle koncentrace dusičnanů v reaktoru, došlo v období 5, kdy bylo zcela zastaveno dávkování kyseliny fosforečné. Po spuštění přítokového čerpadla koncentrace dusičnanů v reaktoru okamžitě

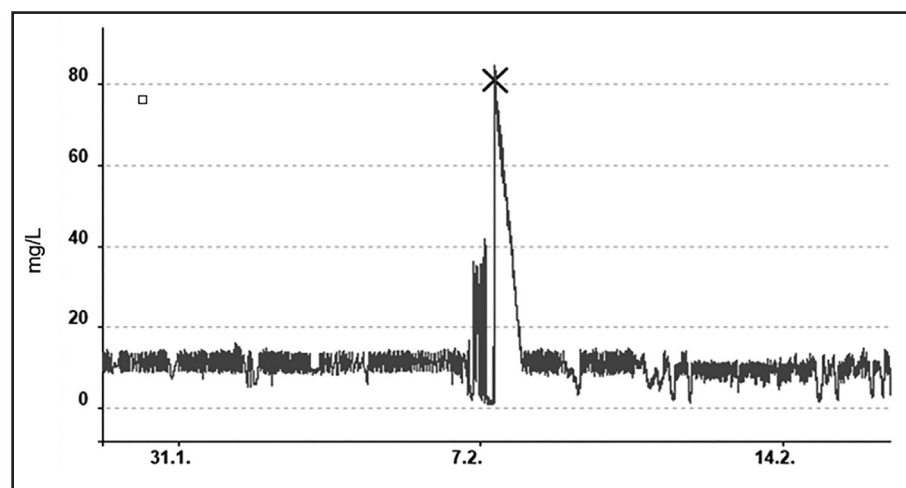
překročila limit, který přiměl čerpadlo k vypnutí. V tomto období nebyl reaktor schopen zpracovat ani relativně malou zátěž dusíkem. Současně se organický substrát již nespoteboval, což způsobilo nárůst koncentrace na 1000 mg/L ChSK.

Sonda Nitratex, reprezentující hodnoty oxidovaných forem dusíku, především dusičnanů, v období výrazného úbytku denitrifikační kapacity dosáhla maximální odezvy, jak dokumentuje Obr. 4. Po 22 dnech bez dávkování kyseliny fosforečné dosáhl signál ze sondy Nitratex horních hodnot. mez měřítka sondy, indukující zastavení procesu denitrifikace. Současně se nekontrolovaně zvýšila koncentrace nespotebovaného substrátu v reaktoru (Obr. 3).

V experimentu 6 bylo dávkování kyseliny fosforečné obnoveno na předchozí dávku 0,1 mL/d, která představovala koncentraci fosforu 0,24 mg/L. Systém se rychle zotavil, koncentrace dusičnanů se vrátila na regulovanou hodnotu do 14 hodin. Pokles ChSK byl pomalejší a koncentrace dusičnanů se během týdne vrátili k normálním hodnotám. Nejnižší dávka kyseliny fosforečné 0,1 mL představující koncentraci P 0,24 mg/L byla aplikována do denitrifikačního reaktoru během experimentů 4 a 6. Účinnost denitrifikace byla dostatečná pro splnění požadavků na kvalitu odpadních vod. Hodnota koncentrace fosforu je v těchto případech o něco nižší,



Obr. 3: Časový průběh přítoku dusičnanových odpadních vod, dávky fosforu a koncentrace ChSK na odtoku.



Obr. 4: Záznam průběhu koncentrace oxidovaných forem dusíku sondou Nitratex.

ale blíží se 0,3 mg/L doporučené Fengem et al. (2023) jako nejnižší limit v rozmezí 0,3 – 0,6 mg/L P.

Specifická spotřeba organického substrátu

Experimenty byly také hodnoceny na vliv omezení fosforem na spotřebu substrátu. Data pro výpočet specifické spotřeby substrátu na odstraněný dusičnanový dusík a specifické dávky P na odstraněný dusík a ChSK jsou uvedena v Tab. 2. Odebraný dusičnanový dusík a spotřebovaná ChSK se vypočítá jako rozdíl mezi denním hmotnostním přítokem a odtokem.

Změnu měrné spotřeby substrátu pro denitrifikaci v závislosti na dávce kyseliny fosforečné ilustruje Obr. 5. Výsledky ukazují, že poměr odstraněné ChSK k odstraněnému dusíku se zvýšil, když byla snížena dávka fosforu. Nejvyšších hodnot vychytávání ChSK bylo dosaženo při zastavení dávkování fosforu.

Mnoho bakterií je schopno akumulovat organické substráty, když je nedostatek fosforu. To je často spojeno s jejich schopností přežít v nepříznivých podmínkách. Při nedostatku fosforu mohou bakterie omezovat růst a zvyšovat hromadění zásobních látek, jako jsou polyhydroxyalkanoáty (PHA), které slouží jako zdroj uhlíku a energie. Denitrifikační bakterie rodu *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus* a *Achromobacter* mají vysokou potřebu fosforu, který je klíčový pro jejich růst a metabolické funkce. Při nedostatku fosforu

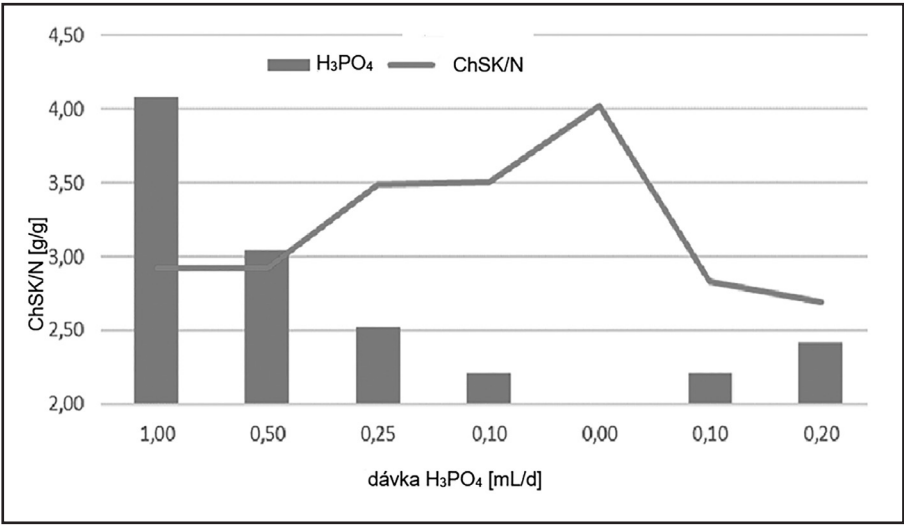
jsou schopny akumulovat organické substráty, což jim umožňuje přežít v nepříznivých podmínkách a využít nahromaděné zásoby, jakmile se podmínky zlepší (Song, Kim et al. 2024). Koncentrace extracelulárních polymerních látek (EPS) byla v souladu s výkonem denitrifikace (Tang, Huang et al. 2024).

Po mírném obnovení dávkování se však poměr ChSK/N vrátil na výchozí hodnoty, a to i při nejnižší dávce kyseliny fosforečné 0,1 mL/den, která je téměř třikrát nižší. Po obnovení specifického dávkování fosforu na 0,0006 g/g P/ChSK a obnovení denitrifikační kapacity organismů byly využity i zásobní látky. Specifická spotřeba ChSK dále klesala při zvýšení specifické dávky fosforu. Z výsledků experimentů lze usoudit, že specifická potřeba substrátu závisí na dostupnosti fosforu a roste při nedostatku fosforu v důsledcích s druhovým složením bakteriální biomasy. Bai a kol. ve svých experimentech zjistili, že 15,8 % dusičnanového dusíku bylo odstraněno denitrifikací organismů akumulujících fosfor. Analýza genu 16S rRNA a stechiometrické poměry ukázaly, že systém byl bohatý na organismy *Dechloromonas* a *Ca* akumulující fosfor *Accumulibacter* (Bai, McKnight et al. 2022).

Poměr dostupného fosforu k organickému substrátu jako ChSK je v literatuře uváděn jako 0,0013 g/g P/ChSK (Boltz, Morgenroth et al. 2012), v našem případě 0,0006 g/g zjevně stačilo, ale proto, že vzhledem k délce experimentů došlo ke změně složení denitrifikační kultury na druhy s nižšími specifickými nároky na množství dostupného fosforu, jak uvádí Wang 2018 a Feng 2023.

Specifická produkce kalu

Dalším cílem experimentů bylo zjistit vliv dávkování fosforu na specifickou produkci kalu, vyjádřenou jako poměr množství produkované organické sušiny k množství odstraněné ChSK. Během experimentů bylo přesně měřeno množství produkce kalu, množství kalu odcházejícího v odpadní vodě, koncentrace nerozpuštěných látek v přítoku a organická část kalu. Dále byla produkce kalu korigována na rozdíl mezi



Obr. 5: Specifická spotřeba substrátu pro denitrifikaci vyjádřená jako ChSK na N a dávka kyseliny fosforečné.

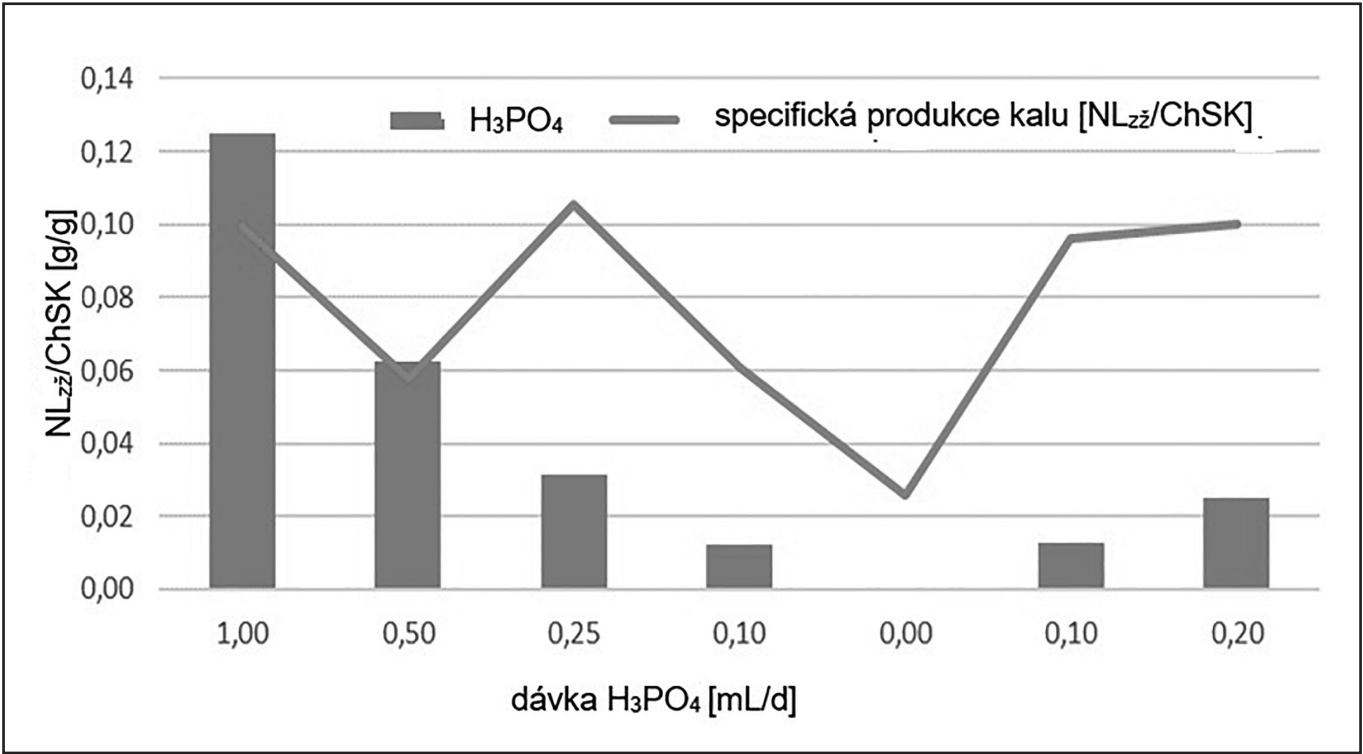
Tab. 2: Specifická spotřeba substrátu při různých dávkách fosforu

85% H ₃ PO ₄	odstraněný N-NO ₃	methanol		ChSK v odtoku	odstraněná ChSK	P	P
mL/d	g/d	mL/d	g /d ChSK	g/d	[g/d]	[g/d]	g/g
1,00	16,1	1090	48,1	1,0	0,27	0.27	2,9
0,50	15,7	1063	46,9	1,0	0,13	0.13	2,9
0,25	14,4	1164	51,4	1,2	0,07	0.07	3,5
0,10	13,6	1119	49,4	1,8	0,03	0.03	3,5
0,00	12,6	1409	62,1	11,9	0,00	0.00	4,0
0,10	16,3	1095	48,3	2,4	0,03	0.03	2,8
0,20	14,4	916	40,4	2,1	0,05	0.05	2,7

počáteční a konečnou koncentrací sušiny v reaktoru pro každý jednotlivý krok experimentu. Získaná data jsou uvedena v Tab. 3.

Výpočet specifické produkce kalu byly zjištěny dva poznatky, které jsou vizuálně znázorněny na následujícím Obr. 6.

Pokles specifické produkce kalu po počátečním poklesu dávky kyseliny fosforečné byl ale následován zvýšením s dalším snížení dávky fosforu. I když se berou v úvahu potenciální nejistoty ve vstupních datech, možným vysvětlením by mohla být zpočátku nízká přítomnost organismů tolerantních k nižším koncentracím.



Obr. 6: Závislost specifické produkce kalu na dávce kyseliny fosforečné.

Tab. 3: Nerozpuštěné látky NL a jejich organický podíl NL_{zz} v reaktoru a specifická produkce kalu vztažená obsah organických látek vyjádřených jako ChSK

P	NL v reaktoru		NL			čistá produkce kalu (NL)	organický podíl kalu (NL _{zz})	produkce organického podílu kalu (NL _{zz})	specifická produkce kalu (NL/ChSK)
	start	konec	odstraněné	přítok	odtok				
g/d	g /L	g /L	g /d	g/d	g/d	g /d	%	g/d	g /g
0,27	3,1	3,3	4,5	0,6	1	5,2	90	4,7	0,1
0,13	3,5	3,3	3,5	1	0,6	2,9	90	2,7	0,06
0,07	3,3	4,7	5	0,8	0,6	6,1	86	5,3	0,11
0,03	4,6	2,8	4,6	0,8	1,1	3,2	90	2,9	0,06
0	2,9	1,8	3,1	0,8	1,2	1,5	89	1,3	0,03
0,03	2,7	1,9	4,6	0,9	1,7	4,9	91	4,4	0,1
0,05	2,0	2,6	2,4	0,7	1,6	4,3	89	3,8	0,1

racím fosforu v biocenóze kalu. Jak se tyto organismy pomnožovaly, produkce kalu se zvyšovala, a to i při nižší dávce fosforu. Následné snížení dávky kyseliny fosforečné na 0,1 mL/d vedlo k poklesu produkce kalu. Po zastavení dávkování došlo k dalšímu výraznému poklesu produkce biomasy ovšem spojenému s kolapsem denitrifikace. Po obnovení dávkování fosforu se denitrifikace i růst biomasy znovu rozběhly, ale na vysoké úrovni specifické produkce pozorované na začátku testu s desetinásobnou dávkou fosforu. Důvodem by mohlo být vyšší zastoupení organismů tolerantních k nízkým koncentracím fosforu, které iniciovaly odloženou reprodukci po obnovení přísunu fosforu a využití zásobních látek (Samaddar, Chatterjee et al. 2019). Dostupný fosfor ovlivnil složení směsné denitrifikační kultury, která se dokáže přizpůsobit změnám podmínek, což má za následek rozdílné zastoupení jednotlivých druhů s různými specifickými nároky na fosfor (Xu, Peng et al. 2015, Fan, Wang et al. 2018).

Fosfor v kalu

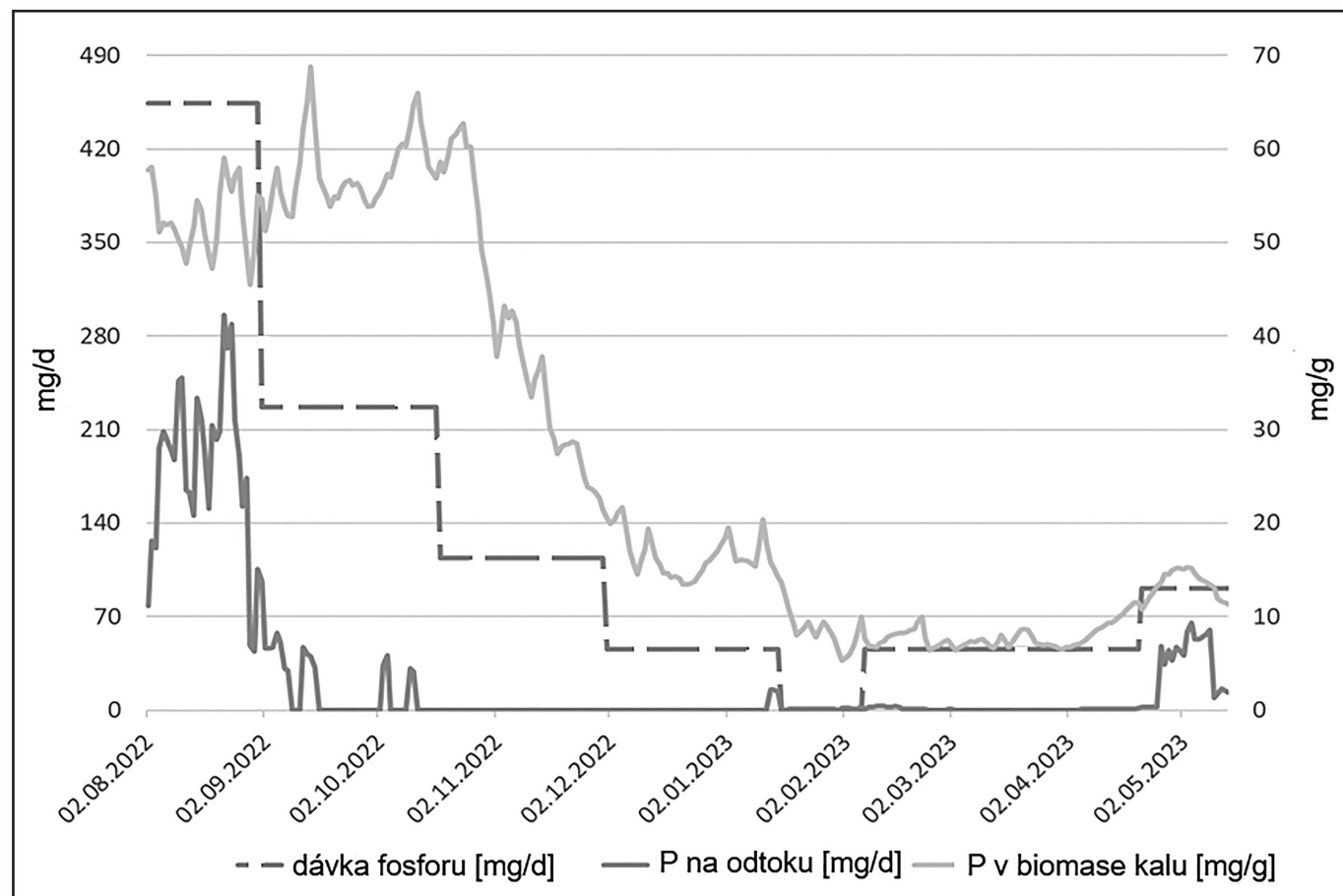
Z naměřených dat jsme se pokusili popsat vývoj koncentrace fosforu v organické frakci kalu pomocí denních bilancí vstupního a výstupního fosforu (Obr. 7). Jednalo se o množství fosforu odcházejícího na odtoku ve formě rozpuštěného fosforečnanového fosforu za každý den a také množství fosforu odcházejícího z denitrifikačního reaktoru s přebytkem kalu a v nerozpuštěné formě na odtoku. Na základě množství kalu v reaktoru bylo možné vypočítat koncentraci fosforu v organické sušině kalu.

Počáteční koncentrace fosforu v kalu byla stanovena jako průměrná hodnota poměru odstraněného fosforu k produkci sušiny organického kalu během prvního dílčího testu, kdy byla dávka kyseliny fosforečné 1 mL/d. Vzhledem ke koncentraci fosforu ve výtocích v tomto období bylo evidentní, že fosforu byl dostatečný přebytek. Nově vzniklá biomasa by proto měla obsahovat stejné množství fosforu jako veškerá stávající biomasa v reaktoru.

Na začátku experimentů, v období přebytku fosforu, se koncentrace fosforu v organické sušině kalu pohybovala mezi 5 a 6 %. Po snížení dávky fosforu na polovinu se koncentrace v kalu okamžitě nesnížila, ale fosfor přestal odcházet do odpadní vody. Prakticky vše bylo využito biomasou. Po dalším snížení dávky kyseliny fosforečné na 0,25 mL/d došlo k rychlému poklesu průměrné koncentrace fosforu v biomase doprovázeném zvýšením produkce kalu. Po dalším snížení dávky se koncentrace fosforu v biomase ustálila někde pod 2 %, doprovázená poklesem produkce biomasy.

Vývoj koncentrace fosforu v organickém podílu kalu spolu s denní dávkou fosforu a množstvím rozpuštěného fosforu opouštějícího systém na odtoku je znázorněn na Obr. 7.

Po zastavení dávkování koncentrace fosforu v biomase rychle klesla na méně než 1 %. Minimální hodnoty 0,6 % bylo dosaženo těsně před kolapsem denitrifikační kapacity kalu. Produkce kalů byla v tomto období také minimální.



Obr. 7: Vývoj koncentrace fosforu v biomase kalu.

Po obnovení dávkování kyseliny fosforečné dávkou 0,1 mL/d zůstala koncentrace fosforu v biomase kolem 0,8 %. Tyto podmínky však již nemusí být tak nepříjemné, protože kal rychle obnovil svou denitrifikační kapacitu a reprodukci. Po dalším zvýšení dávkování byl v odpadní vodě dokonce nalezen rozpuštěný fosfor, což naznačuje, že kal není schopen využít takové množství fosforu jako na začátku experimentu. Jeho specifická produkční a denitrifikační schopnost však zůstala prakticky stejná. To by potvrzovalo vyšší podíl organismů s nižšími nároky na fosfor.

Závěry

Dlouhodobé experimenty denitrifikace průmyslových odpadních vod, které trvaly 287 dnů, ukázaly, že omezení přísunu fosforu nemůže dlouhodobě snížit specifickou produkci kalu bez ohrožení denitrifikační účinnosti. Specifická produkce kalu se sice snížila se snížením přísunu fosforu, ale zhoršila se denitrifikační kapacita. Když byl přísun fosforu zcela zastaven a koncentrace fosforu v biomase klesla na 0,6 %, denitrifikace přestala probíhat úplně. Po obnovení dávková-

Literatura

Bai, X., M. McKnight, J. Neufeld and W. Parker (2022). "Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from municipal wastewater at low temperature." *Bioresource Technology* **368**: 128261.

Boltz, J. P., E. Morgenroth, G. T. Daigger, C. DeBarbado, S. Murthy, K. H. Sørensen and B. J. W. R. Stinson (2012). "Method to identify potential phosphorus rate-limiting conditions in post-denitrification biofilm reactors within systems designed for simultaneous low-level effluent nitrogen and phosphorus concentrations." *Water Research* **46**(19): 6228-6238.

De Lucas, A., L. Rodríguez, J. Villaseñor and F. J. Fernández (2005). "Denitrification potential of industrial wastewaters." *Water Research* **39**(15): 3715-3726.

de Vet, W. W. J. M., M. C. M. van Loosdrecht and L. C. Rietveld (2012). "Phosphorus limitation in nitrifying groundwater filters." *Water Research* **46**(4): 1061-1069.

Fan, C., P. Wang, W. Zhou, S. Wu, S. He, J. Huang and L. Cao (2018). "The influence of phosphorus on the autotrophic and mixotrophic denitrification." *Science of The Total Environment* **643**: 127-133.

Feng, L., G. Wu, Z. Zhang, Z. Tian, B. Li, J. Cheng and G. Yang (2023). "Improving denitrification performance of biofilm technology with salt-tolerant denitrifying bacteria agent for treating high-strength nitrate and sulfate wastewater from lab-scale to pilot-scale." *Bioresource Technology* **387**: 129696.

Feng, L., J. Yang, H. Yu, Z. Lan, X. Ye, G. Yang, Q. Yang and J. Zhou (2020). "Response of denitrifying community, denitrification genes and antibiotic resistance genes to oxytetracycline stress in polycaprolactone supported solid-phase denitrification reactor." *Bioresour Technol* **308**: 123274.

ní se však produkce kalu i denitrifikace rychle vrátily na původní hodnoty, a to i při mnohem nižší dávce fosforu, než byla původně použita.

Naopak specifická spotřeba substrátu se s poklesem dostupného fosforu zvýšila, což bylo způsobeno akumulací substrátu v bakteriích a tvorbou zásobních látek. Tento jev se však po obnovení dávkování také vrátil na původní úroveň, a to i přes významně nižší dávku fosforu.

Tyto výsledky ukazují, že dlouhodobé snížení přísunu fosforu vede ke zvýšení podílu organismů v s výrazně nižšími požadavky na fosfor. Za dlouhodobých podmínek nízké koncentrace fosforu došlo k selekci organismů s nižšími nároky na obsah fosforu v jejich biomase, který byl jen kolem 1 % ve srovnání s počátečními 5 %. Zjištěná minimální potřebná dávka fosforu bez snížení účinnosti denitrifikace byla přibližně 1 mg P na g přivedené ChSK, což je méně než hodnoty dosud uváděné v literatuře.

Potenciální úspory bez snížení účinnosti denitrifikace lze dosáhnout použitím nižší dávky kyseliny fosforečné, ale produkce přebytečného kalu nebyla výrazně ovlivněna.

Samaddar, S., P. Chatterjee, J. Truu, R. Anandham, S. Kim and T. Sa (2019). "Long-term phosphorus limitation changes the bacterial community structure and functioning in paddy soils." *Applied Soil Ecology* **134**: 111-115.

Song, H., T. Kim, H. Cha and S. Jung (2024). "Performance and Microbial Community analysis on denitrification of electronic wastewater using various External Carbon Source." *Journal of Korean Society of Environmental Engineers* **46**: 48-56.

Sun, L., J. Li, L. Qu, X. Wang, C. Sang, J. Wang, M. Sun, W. Wanek, D. L. Moorhead, E. Bai and C. Wang (2023). "Phosphorus limitation reduces microbial nitrogen use efficiency by increasing extracellular enzyme investments." *Geoderma* **432**: 116416.

Tang, X., Y. Huang, S. Tan and H. Yang (2024). "Vertical spatial denitrification performance and microbial community composition in denitrification biofilters coupled with water electrolysis." *RSC Advances* **14**: 15431-15440.

Wang, Z., S. He, J. Huang, W. Zhou and W. Chen (2018). "Comparison of heterotrophic and autotrophic denitrification processes for nitrate removal from phosphorus-limited surface water." *Environmental Pollution* **238**: 562-572.

Xu, G., J. Peng, C. Feng, F. Fang, S. Chen, Y. Xu and X. Wang (2015). "Evaluation of simultaneous autotrophic and heterotrophic denitrification processes and bacterial community structure analysis." *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**(15): 6527-6536.

Zhao, W., Y. Wang, S. Liu, M. Pan, J. Yang and S. Chen (2013). "Denitrification activities and N₂O production under salt stress with varying COD/N ratios and terminal electron acceptors." *Chemical Engineering Journal* **215-216**: 252-260.

Souhrn

Průmyslové odpadní vody vznikající při výrobě nitrovaných produktů obsahují vysoké koncentrace zbytkových kyselin dusičné a sírové, které vyžadují denitrifikaci. Aby byly splněny nutriční potřeby denitrifikačních mikroorganismů, přidává se do denitrifikačního reaktoru methanol jako organický substrát spolu s kyselinou fosforečnou jako zdroj fosforu. Byl proveden poloproduční experiment pro posouzení možnosti snížení množství přebytečného kalu omezením dávkování fosforu. Výsledky ukázaly, že samotné omezení přísunu fosforu nemůže udržitelně snížit specifickou produkci kalu bez negativního dopadu na denitrifikační účinnost. Snížení přísunu fosforu mělo za následek zvýšený podíl organismů v biocenóze denitrifikačního kalu s výrazně nižšími nároky na fosfor. Zatímco náklady spojené s manipulací s přebytečným kalem nelze snížit, potenciálních úspor lze dosáhnout optimalizací dávky kyseliny fosforečné.

Klíčová slova: limitace fosforem, denitrifikace, průmyslové odpadní vody, vysoké zatížení dusičnany, produkce biomasy.

Summary

The industrial wastewater resulting from the production of nitrated products contains high concentrations of residual nitric and sulfuric acids, necessitating denitrification treatment. To fulfill the nutritional needs of denitrifying microorganisms, methanol is introduced as an organic substrate along with phosphoric acid in the denitrification reactor. This study aimed to optimize the existing denitrification technology with a specific focus on minimizing sludge production through the controlled addition of phosphorus. A pilot plant test was conducted to assess the feasibility of reducing excess sludge by limiting phosphorus dosage. The results showed that limiting phosphorus supply alone cannot sustainably reduce specific sludge production without negatively impacting denitrification capacity. A decrease in phosphorus supply resulted in an increased proportion of organisms within the denitrifying sludge biocenosis with significantly lower phosphorus requirements. While the costs associated with excess sludge handling may not be reduced, potential savings can be achieved by optimizing the dose of phosphoric acid.

Keywords: phosphorus limitation, denitrification, industrial wastewater, high nitrate load, biomass production.



OBSAH

Úvodem	21
Pokorná D., Zábranská J.: Životní jubileum předsedy biotechnologické společnosti prof. Ing. Jana Káše, DrSc.	22
Ludvíková A., Třešňáková P., Strnad O., Viktorová J.: Mechanismus účinku chinolonových antibiotik a vznik rezistence	24
Filip V., Berčíková M., Kalenchak K.: Margarín a roztíratelné tuky v naší výživě	31
Staněk R., Zábranská J.: Vliv fosforu na specifickou produkci kalu a účinnost denitrifikace průmyslových odpadních vod	36

CONTENT

Editorial	21
Pokorná D., Zábranská J.: Life Anniversary of the Chairman of the Biotechnology Society prof. Jan Kas	22
Ludvíková A., Třešňáková P., Strnad O., Viktorová J.: Mechanism of quinolone antibiotics effect and emergence of resistance	24
Filip V., Berčíková M., Kalenchak K.: Margarine and spreadable fats in our food	31
Staněk R., Zábranská J.: Effect of phosphorus on specific sludge production and efficiency of industrial wastewater denitrification	36

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Dana Pokorná, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu jsou uváděny ve formě Author-Date v příslušném místě textu, včetně tabulek a obrázků (McKnight et al. 2022). V seznamu literatury jsou potom uváděny v abecedním pořadí. Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují arabskými číslicemi (příklad formátu **Tab. 1:**). Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nevkládějte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na Danka.Pokorna@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References to the literature are referenced in Author-Date form at the appropriate point in the text, including tables and figures (McKnight et al. 2022). They are then listed in alphabetical order in the reference list. Journal abbreviations are used according to Chemical Abstract Service Source Index convention.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z.: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are identified by Arabic numerals (example format **Tab. 1:**). Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or Danka.Pokorna@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737 (Print)
ISSN 2570-8910 (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).