

B I P R O S P E C T

Dvacátýprvní ročník
Číslo 4/2011

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

BULLETIN BIOTECHNOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

zakládajícího člena Českého svazu
vědeckotechnických společností
(ČSVTS)

a
člena „European Federation
of Biotechnology“ (EFB)

Redakční rada

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

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

Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6

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

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

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

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

Ing. Jan Kopečný, DrSc.
(Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.
(Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci)

Doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc.
(Ústav biochemie, PřF MU, Brno)

RNDr. Ivan Babůrek, CSc.
(Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Praha)

Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.
(Katedra biochemie PřF UK, Praha)

Doc. Ing. Radovan Bílek, CSc.
(Endokrinologický ústav, Praha)

B I P R O S P E C T

21th Volume
No. 4/2011

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

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

member of European Federation
of Biotechnology

SUMMARY

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the 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 and Slovak Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both

research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. In each issue there will be advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared on the Czech and Slovak market, or are projected enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive 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 cooperations with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

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

For more information contact the editorial board or directly:

Petra Lipovová, PhD. (editor in chief)
ICT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

loučíme se s rokem 2011 tímto čtvrtým číslem našeho Bioprospectu a připomínáme si naše významnější aktivity. Tou prvou byl již tradiční seminář „Novinky v oblasti genetických modifikací“. Stručný obsah většiny přednášek byl letos poprvé publikován v našem Bioprospectu (č. 2) místo dříve vydávaného samostatného sborníku. Termín semináře v r. 2012 oznámíme začátkem příštího roku. Nejvýznamější událostí tohoto roku bylo mezinárodní biotechnologické symposium Biotech 2011, které probíhalo společně s 5. Česko-švýcarským symposiem ve dnech 15. – 17. června 2011 v Národní technické knihovně v Praze. Bezprostředně po pražském symposiu následovalo ve dnech 19. – 22. června 2011 postsymposium Olomouc Biotech 2011 organizované našimi partnery z Centra pro biotechnologický a zemědělský výzkum regionu Haná a Palackého univerzity v Olomouci. Toto symposium bylo specializované na rostlinné biotechnologie. Všem účastnícím i ostatním zájemcům bychom rádi připomněli, že jsou a budou aktuální webové stránky našeho symposia (www.biotech2011.cz). Na těchto webových stránkách jsou vystaveny vybrané fotografie a tiskové zprávy o našem symposiu, česko-švýcarské spolupráci v biotechnologiích, spolupráci mezi VŠCHT v Praze a ZHAW ve Wadenswilu a ETH v Zurichu a jiné zajímavosti. Další symposium Biotech 2014 se plánuje opět za 3 roky v Praze a pak by se organizace symposia měla opět vrátit do Švýcarska. Jak jsme Vás již informovali, vybrané články ze symposií v Praze a v Olomouci budou publikovány ve zvláštním čísle významného biotechnologického časopisu vydávaném nakladatelstvím Elsevier „Biotechnology Advances“. V současné době probíhá recenzní řízení dodaných rukopisů.

Významným krokem v rozšíření spolupráce s EFB (Evropskou federací biotechnologií) je dohoda na zřízení regionální kanceláře při Centru pro biotechnologický a zemědělský výzkum regionu Haná v Olomouci (viz www.efb-central.org, otevři regional branch offices). Domníváme se, že tato událost podpoří nejen naši spolupráci s EFB, ale také oživí činnost naší společnosti v oblasti celé Moravy.

Ve druhé polovině roku proběhla řada aktivit ve spolupráci s našimi partnery. Uvedl bych např. konferenci ANAEROBIE 2011, semináře studentů ústavů VŠCHT v rámci prezentace studentské odborné činnosti a tradiční biotechnologický seminář studentů Ústavu biochemie a mikrobiologie. Příznivě je také přijímán celoroční e-mailový informační servis naší společnosti. Pro nával práce spojený zejména s organizací mezinárodního symposia se nám naopak nepodařilo aktualizovat web naší společnosti, což patří mezi naše důležité úkoly v příštím roce. Příští rok je také rokem volebním. Podle našich nových stanov uskutečníme volby per rollam na podzim příštího roku. Vaše návrhy a podněty můžete podávat již nyní na adresu

danka.pokorna@vscht.cz (resp. poštou na adresu Ing. Dana Pokorná, CSc, Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT, Technická 3, 166 28, Praha 6). Na tyto adresy také laskavě pošlejte změny Vaší poštovní adresy (posílání Bioprospectu) i e-mailové adresy (pro snadnější komunikaci a informační servis).

V příštím roce proběhne opět řada významných biotechnologických akcí. Z nich bychom snad mohli připomenout 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition konané 16. – 21. 9. 2012 v Daegu, Korea (www.ibs2012.org) a European Congress on Biotechnology ve dnech 23. – 26. 9. 2012 v Istanbulu (www.ecb15.org). Deadline k poslání abstrakt je koncem února, resp. března (u ECB). Data konání obou kongresů jsou nešťastně blízka, takže účast na obou je nemožná. Ostatní akce EFB naleznete na již uvedených webových stránkách (www.efb-centra.org).

Doufáme, že výběr článků publikovaných v tomto čísle Vás potěší a rádi si je přečtete, těšíme se na Vaše příspěvky pro další čísla Bioprospectu a na Vaši účast na našich akcích. Přejeme Vám příjemné prožití Vánoc a po celý příští rok pevné zdraví, pohodu a mnoho úspěchů ve Vašem osobním i profesním životě.

S pozdravy Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová



1ST WORLD CONGRESS OF ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY-2011 (WCEB-2011) – DOJMY A POZNATKY

Pokorná Dana, Záborská Jana

Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT Praha

Ve dnech 19. – 22. října 2011 se v čínském městě Dalian uskutečnil BIT's 1st Annual Low Carbon Earth Summit 2011, v jehož rámci proběhl jako subkonference World Congress of Environmental Biotechnology EnviroBio 2011 (WCEB 2011) s tématem „zdravější, bezpečnější a šetrnější k životnímu prostředí“. Celé akce se zúčastnilo přibližně 300 účastníků ze všech kontinentů světa. Česká republika zde měla své čtyři zástupce (z nichž tři jsou členy Biotechnologické společnosti), kteří se aktivně zapojili do programu kongresu (přednášky „Denitrification of Industrial Wastewater with High Concentration of Nitrates and Sulfates“, „Biological Removal of Hydrogensulfide from Biogas“, „Biological Pumping of the Atmospheric Carbon by the Plants“ and „Nanoparticles and Plants in Environment“).

Dějiště kongresu, město Dalian, leží na východě Číny na jižním cípu poloostrova Liandong na pobřeží Žlutého moře. Příjemné klima, nádherná příroda a rozsáhlé pláže z něj dělají významné turistické letovisko. Kromě turistiky se město rozvíjí i po stránce průmyslové a obchodní a není divu, že se zde koná celá řada světových kongresů, pro jejichž účely je zde World Expo Center. Tento rozsáhlý komplex byl postaven v roce 2004 a hostí každoročně řadu mezinárodních a národních veletrhů, výstav a kongresů.

V říjnu se tedy toto centrum stalo hostitelem WCEB 2011. Hlavním cílem této akce byla výměna poznatků a zkušeností s aplikacemi biotechnologií v oblasti snižování emisí a ochrany životního prostředí a posílení vztahů mezi průmyslem, výzkumnými laboratořemi, vládními agenturami, soukromým sektorem a vysokými školami. Tematicky měl tento kongres velmi široký záběr, takže si každý z účastníků našel to, co ho právě zajímalo.

Konference byla tematicky rozdělena do 9 okruhů.

1. Výzkum v oblasti životního prostředí

Tento okruh byl velice úzce zaměřen na speciální otázky z oblastí výzkumu environmentální mikrobiologie s důrazem na půdní mikrobiologii a mikrobiálního inženýrství. Rozsah a charakter příspěvků potvrdil rostoucí zájem o výzkum biotechnologií v oblasti mikrobiologie moří, geomikrobiologie, toxikologie a ochrany životního prostředí.

2. Hlavní biotechnologie v oblasti životního prostředí

V oblasti biotechnologií ochrany životního prostředí byl věnován velký zájem otázkám genových technologií, technologiím mikrobiální imobilizace. Dále byla zastoupena bioinformatika, použití senzorů pro online

monitoring kvality vod, biofilmových reaktorů i použití izotopů v bioremediacích a biodegradaci, např. použití izotopu uhlíku jako indikátoru biologické aktivity. Velká pozornost byla zaměřena na procesy kultivace mikrobiální kultury v suspenzních a náplňových reaktorech v oblasti denitrifikace a v anaerobních technologiích.

3. Biotechnologie pro průmyslové odpady

V sekci zabývající se biotechnologiemi pro průmyslové odpady (potravinářské, textilní apod.) se účastníci mohli seznámit s celou řadou postupů a technologií spojených s jejich zpracováním a likvidací. Toto téma je natolik rozsáhlé a příspěvky byly natolik tematicky roztržštěné, že není jednoduché udělat shrnující závěr z této sekce. Objevily se zde příspěvky popisující např. biologickou rozložitelnost chlorovaných herbicidů, odstraňování Cr(VI) pomocí adsorpčních gelů, modelování a simulace Anammox procesu v membránovém reaktoru aj.

4. Nakládání s komunálními a krajinnými odpady

Sekce zabývající se zpracováním tohoto typu odpadů byla velice zajímavá, protože se zabývala hlavně netradičními postupy jejich využití či jiného nakládání. Mezi zajímavé postupy využití na př. biologicky rozložitelného komunálního odpadu byla jeho aplikace jako substrátu při pěstování hub. Po jejich sklizni může být zbylý nerozložený kompost obsahující konsorcium mikroorganismů a lignocelulolytických enzymů úspěšně použit na odstraňování kontaminantů v půdě, vodě a vzduchu nebo při výrobě bioethanolu. Byly také zmíněny biotechnologické postupy např. pro systém čištění zasolených vod z odvodnění kanadských dálnic v zimě, biotechnologie pro likvidaci pesticidů atd. Nedílnou součástí sekce byla témata monitoringu znečištění vzduchu a jeho dopadu na lidské zdraví z pohledu odborníků z různých míst naší planety.

5. Biologické procesy odstraňování znečištění

Tato sekce byla zaměřena na hlavní polutanty životního prostředí. Velká pozornost byla věnována sloučeninám dusíku a síry a procesům spojeným s jejich odstraňováním – biologická nitrifikace, denitrifikace a odsiřování. Pozornost byla rovněž zaměřena na toxické kovy – As, Cu, Zn, Cd a způsoby zapojení bakterií nebo rostlin do jejich zpracování. Zajímavý byl příspěvek věnovaný odstraňování kadmia z půdy pěstováním Cd akumulující rýže (Japonsko). Jako zařízení vhodná pro odstraňování polutantů ze životního prostředí byly zmiňovány např. vysokoúčinné biofiltrace či membránové bioreaktory.

6. Monitoring toxinů

Vliv amonných iontů na vodní živočichy, biomarkery, na základě jejichž biologické odezvy na polutanty je hodnocen jejich toxický vliv na živé organismy, ELISA detekce dioxinů, to jsou jen některé metody a postupy hodnocení látek, které mají toxický vliv na životní prostředí, prezentované na této akci.

7. Bioprodukty a biometody

Tato sekce přinesla zajímavý pohled na inovativní metody a materiály nahrazující materiály považované dříve za neškodné. Ovšem s rozvojem postupů hodnocení jejich škodlivého vlivu na životní prostředí a lidské zdraví byl přístup k nim přehodnocen a i zpřísněním limitů byly zařazeny mezi látky zdraví škodlivé. Zmiňme zde např. nahrazení amalgámových plomb, které byly již v některých státech (Japonsko, Norsko, Dánsko, Švédsko) zakázány, dentálním biomateriálem vyvinutým z derivátů palmového oleje.

8. Obnovitelná energie z odpadů

S rostoucím odporem k jaderné energii, který se projevuje již i v některých evropských státech rozhodnutím o uzavření jejich jaderných elektráren, a s ohledem na klimatické změny v souvislosti s produkcí skleníkových plynů, se do popředí zájmů dostávají technologie produkující alternativní zdroje energie. Vedle fotovoltaických a větrných elektráren jsou to právě biotechnologie, které dokážou vyprodukovat ekologickou energii z odpadů, čímž přispívají k jejich likvidaci. Příspěvky zmiňovaly vedle produkce biopaliv z odpadního oleje z kuchyní nebo palmového oleje také produkci bioplynu z komunálního nebo zemědělského odpadu nebo cíleně pěstovaných plodin. Rostlinný materiál je

všeobecně vhodným substrátem pro produkci bioplynu anaerobními technologiemi, ovšem jejich obsah hůře rozložitelných celulóзовých a ligninových složek inspiroval autory některých příspěvků k prezentaci enzymatických přísadků, které by jejich rozložitelnost měly příznivě ovlivnit. Jako metoda vhodná pro produkci ekologické energie z biomasy byla rovněž zmíněna možnost její pyrolýzy a zkapalnění za vysokého tlaku (1 – 6 atm) a teploty (200 – 300 °C).

9. Legislativa a obchod v oblasti biotechnologií životního prostředí

Tato sekce byla nejméně zastoupena a v podstatě se omezila na firemní prezentace. Z vědeckého hlediska tedy nepřinesla příliš nového. Účastníci se mohli ale seznámit s konkrétními prezentovanými komerčně dodávanými biotechnologiemi.

Vedle zmíněných tematických sekcí byla součástí kongresu také posterová sekce, ve které prezentovali své výsledky mladí vědci. Tato sekce nebyla příliš rozsáhlá snad i proto, že mladí vědečtí pracovníci měli vyhrazenou sekci, kde mohli prezentovat výsledky své práce formou přednášek. Objevila se tu velice úzce specializovaná témata, která byla ve většině případů prezentací výsledků disertačních prací.

Celkově přinesl kongres účastníkům kongresu cenné informace prezentované v mnoha velice kvalitních příspěvcích. Vedle toho byla velkým přínosem také společenská stránka této akce, která přispěla k navázání mnoha osobních kontaktů mezi vědci z různých kontinentů, během kterých docházelo k výměnám konkrétních zkušeností z řešených problematik a může v budoucnosti rezultovat v možné spolupráci mezi špičkovými výzkumnými pracovišti a univerzitami.

Tento příspěvek vznikl v rámci řešení projektu č. TA01020798, program Alfa, TA ČR.

VYUŽITÍ β -KAROTENU V ORGANISMU

Eliška Glasová

Ústav Biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, glasovae@vscht.cz

Úvod

β -Karoten má v našem těle mnoho funkcí. Stimuluje růst živočišných buněk, správný vývoj kosterního skeletu a má taktéž vliv na reprodukci. Je také prekurzorem vitamínu A, který se dává do souvislosti s naší odolností proti zhoubnému bujení.

Klinický význam má stanovení β -karotenu především jako screeningový test při podezření na malabsorpční syndrom. Zvýšená hladina β -karotenu je popsána u hypothyreózy, diabetu mellitu, myxedému, nefrotického syndromu, hyperlipoproteinémií a u žen v těhotenství.

Při provádění epidemiologických studií, byl prokázán pozitivní vliv β -karotenu na lidech se zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob, či rakoviny. Klinické testy však ukázaly, že synteticky připravený β -karoten, byť má stejnou strukturu, nemá stejný fyziologický účinek jako β -karoten získaný z ovoce a zeleniny.

Karotenoidy a β -karoten

Z chemického hlediska patří karotenoidy do skupiny tetraterpenoidů a jedná se o oligomery isoprenu. Vlastní karotenoidy se vyznačují pouze několika variantami uhlíkového skeletu: mají buď ryze alifatický řetězec nebo řetězec zakončený jedním či dvěma cykly (šestičlenným nebo pětičlenným). Karotenoidy se dělí na dvě základní skupiny: nenasyčené alifatické uhlovdíky nazývané karoteny a kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů, které se nazývají xanthofyly.

Spolu s dalšími karotenoidy byl β -karoten i se svou strukturou popsán v roce 1930 a nejprve byl považován za vitamín.¹ Dnes již víme, že se jedná o prekurzor esenciálního vitamínu A u živočichů a o žlutočervené barvivo u rostlin. Ze všech karotenoidů se vyskytuje nejčastěji.

Vitamin A

Vitamin A (retinol) je polyisoprenová sloučenina obsahující β -ionový kruh. Pod názvem vitamin A jsou zahrnovány látky živočišného původu, mající biologickou aktivitu vitamínu A. Jsou skladovány, převážně jako retinolester, v játrech. Většinu aktivity v těle představuje retinol (nutný pro reprodukci většiny živočišných druhů) a jeho dva deriváty, retinal (důležitý pro vidění) a kyselina retinová (podporuje růst, zrání buněk a jejich diferenciaci a má také důležitou roli v udržení normální funkce a struktury epiteliálních buněk.²

Isomery β -karotenu: 9-cis versus all-trans

Isomery β -karotenu lze najít ve všech různých formách. Každá dvojná vazba na uhlíkovém řetězci může existovat jak v cis, tak i v trans podobě. Cis isomery jsou více polární a více rozpustné v tucích než trans isomery.^{3, 4.}

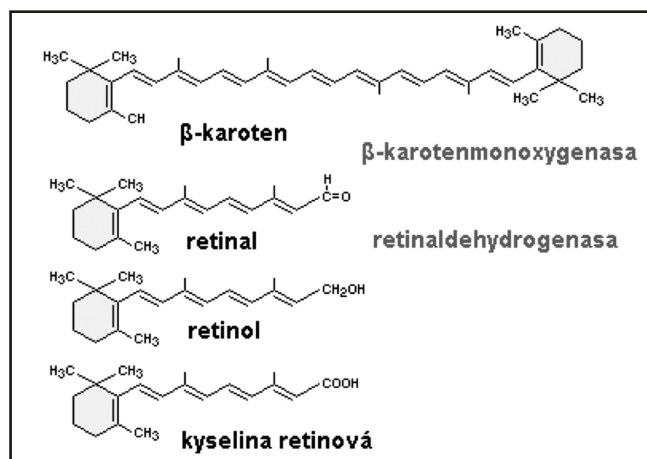
Nejvíce se v přírodních zdrojích vyskytují all-trans formy, které jsou strukturně identické jako synteticky produkovaný β -karoten.^{5.}

Jak však bude popsáno dále, navzdory tomu, že strukturně jsou tyto molekuly stejné, v klinických studiích nemají stejné výsledky.

Metabolismus β -karotenu a retinolu

Enzymovým štěpením β -karotenmonooxygenasou (EC 1.14.99.36), která se nachází ve stěnách trávicího traktu a v játrech^{6.}, jedné molekuly β -karotenu vznikají dvě molekuly retinolu. Toto štěpení využívá molekulární kyslík a je vyšší v přítomnosti žlučových solí. Ve střevní sliznici je retinal redukován na retinol enzymem retinaldehydroduktasou (EC 1.1.1.300) využívající k tomu NADPH.⁷ Pouze malá část retinalu je oxidována na kyselinou retinovou. Většina retinolu je esterifikována s nasycenými mastnými kyselinami a inkorporována do chylomikronů v lymfě, a ty pak vstupují do krevního oběhu. Jsou přeměněny na chylomikronové částice, které i s retinolem v nich obsaženým vychytávají játra.^{6.}

Ke štěpení β -karotenu dochází, pouze pokud tělo nedostává dostatečné množství vitamínu A v potravě. Jako zdroj tohoto vitamínu je totiž β -karoten 6x méně účinný než samotný retinol.^{6.}



Obr. 1: Struktura β -karotenu, a jeho metabolitů.
http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathophys/misc_topics/vitamina.html (upraveno)

Zdroje β -karotenu v potravě

Největší obsah β -karotenu je v zelenině s červeným nebo žlutým zabarvením a v zeleně zabarvených listech zeleniny. Vstřebávání β -karotenu závisí na tom, zda zelenina byla syrová či vařená (u vařené zeleniny je vstřebávání větší) či jakou stravu běžně konzumujeme. Bylo popsáno, že pokud se v naší stravě vyskytuje více tuku, bude β -karoten lépe vstřebáván.⁸

Nadbytečný β -karoten v těle se vyloučí močí nebo stolicí. Pouze v případě, že tělo nemá dostatek vitamínu A bude β -karoten metabolizován na retinol. Denní dávka β -karotenu by se měla pohybovat mezi 5 000 – 25 000 IU (mezinárodní jednotka – International Unit, což odpovídá hodnotě 3 – 15 mg).⁹

Karotenemie, hypervitaminoza, hypovitaminoza a avitaminoza vitamínu A

β -Karoten lze bezpečně konzumovat ve velkých dávkách (až 180 mg, tj. 300 000 IU denně). Ve větších dávkách může způsobit stav zvaný karotenemie. U takto postiženého člověka se jeho pokožka zbarví žluto-oranžově díky zvýšenému ukládání pigmentu. Nejvíce je toto zabarvení vidět na dlaních a chodidlech. Jedná se o vratný stav a od hypervitaminozy vitamínu A se dá odlišit pozorováním barvy skléra očí. U karotenemie je sklérum bílé a u hypervitaminozy žluté.

Hypervitaminoza vitamínu A může být nebezpečnější. Opakované nadměrné dávky jsou toxické (např. během těhotenství mohou ohrožovat vývoj plodu). Toxicita vzniká již při denním příjmu 50 – 60 mg retinolu. Nejčastější symptomy jsou alopecie, ataxie, bolesti ve svalech a kloubech, bolesti hlavy, projevy hepatotoxicity a poruchy kůže a vidění.

β -Karoten je podmíněně esenciální složka naší potravy. Stává se esenciálním pouze v případě, že tělo trpí nedostatkem vitamínu A tj. nedostatkem živočišné potravy. V západním světě je dnes nedostatek vitamínu A vidán jen zřídka. Jedná se většinou o poruchy vstřebávání tuků (např. nedostatek žluči při onemocnění žlučových cest) a o pacienty v dlouhodobé intenzivní péči. Jinde ve světě je nedostatek vitamínu A samozřejmě spojen s hladověním.

Příznaky jsou šeroslepost, poruchy kůže a sliznic, poškození spojivek a rohovky, změknutí oční rohovky, ztráta chuti k jídlu, suchá pigmentovaná kůže kolem vlasových folikulů a degenerace hlenotvorných buněk. Vysychání a rohovatění sliznic se projevuje nejen u očí, ale i u sliznic trávicího, dýchacího a močového ústrojí. Je také porušena imunitní funkce, nejvíce aktivita T buněk.¹⁰

Avitaminoza způsobuje zástavu růstu (vitamín A působí také jako růstový faktor) a vývoje orgánů (jedná se hlavně o pohlavní orgány) a těžké oční onemocnění.

β -Karoten a jeho vliv na pacienty a AIDS

β -Karoten je potenciální anti-oxidant. Zháší totiž singletový kyslík a inhibuje lipidovou peroxidaci. Stejně účinný je i v nápravě škody způsobené volnými radikály.¹¹

Podporuje také naši imunitu, protože zvyšuje produkci T buněk, monocytů a NK (z *angl.* natural killer) buněk.¹² Také produkce CD4+ buněk může být zvýšena podáváním velkých dávek β -karotenu.¹³

Díky své schopnosti zvyšovat imunitu, byl β -karoten zařazen do klinických studií zabývajících se studiem viru HIV a autoimunitní poruchy, kterou tento virus způsobuje AIDS. Tyto studie se zabývaly vlivem β -karotenu na bílé krvinky pacientů nakažených virem HIV nebo trpících jinou autoimunitní chorobou. Hladina β -karotenu v krvi byla u těchto pacientů snížena.¹⁴

Zvýšení příjmu β -karotenu v potravě (ne jako potravinový doplněk) způsobilo zvýšení produkce CD4+ buněk a u více jak 11 % pacientů byla pozorována remise příznaků jako jsou noční pocení, horečka, ztráta hmotnosti, vyčerpanost a průjem.¹⁵

β -Karoten a nemoci srdce a kardiaskulárního systému

Literární údaje o vlivu β -karotenu na kardiaskulární systém jsou často protichůdné. Po mnoho let ukazovaly epidemiologické studie pozitivní vliv zvýšeného příjmu karotenů. Proto, když byly provedeny klinické studie, byl očekáván podobný výsledek. Nicméně se ukázal pravý opak. Zvýšený příjem syntetického β -karotenu zvýšil riziko propuknutí kardiaskulární choroby. Toto téma není ještě dostatečně objasněné, ale má se za to, že příjem karotenů v potravě má ochranný účinek, zatímco syntetický β -karoten může být škodlivý.¹⁶

β -Karoten jako anti-karcinogen rakoviny plic?

Podobně jako u nemocí kardiaskulárního systému, existuje podobná otázka i co se týče funkce β -karotenu jakožto anti-karcinogenu.

Epidemiologické studie ukazují pozitivní vliv, ale klinické studie prokázaly zvýšené riziko vzniku rakoviny plic. Bohužel ani tento výsledek není možné prezentovat s jistotou, neboť některé tyto studie byly prováděny na dlouholetých kuřácích a lidech se zvýšenou rodinnou zátěží. Tím byl znehodnocen i výsledek testu.¹⁷

Závěr

β -Karoten, přestože byl popsán již před 80-ti lety v sobě skrývá ještě mnohá tajemství. Sledování jeho hladiny v organismu využíváme při stanovení diagnóz různých chorob a při sledování celkového stavu organismu. Naděje, že nám pomůže v boji s rakovinou či onemocněními kardiaskulárního systému sice klesla, ale je třeba provést ještě další studie. Ze současných poznatků však vyplývá to, co se potvrzuje znovu a znovu, že jíst zdravě a konzumovat ovoce a zeleninu je naprostá nutnost a tento životní styl se nedá nahradit konzumací potravinových doplňků.

Literatura:

1. Karrer P, Helfenstein A, Wehrli H, Wettstein A: *Helvetica Chimica Acta* 13, 1084 (1930).
2. Velíšek J: *OSSIS Tábor* (1999).
3. Chandler LA, Schwartz SJ: *J Food Sci* 52, 669 (1987).
4. Krinsky NI, Russett MD, Handelman GJ, et al.: *J Nutr* 120,1654 (1990).
5. Woutersen R, Wolterbeek APM, Appel MJ, et al.: *Crit Rev Toxicol* 29, 515 (1999).
6. Goodman DS, Huang HS, Shiratori T: *J Biol Chem* 241, 1929 (1966).
7. Marqués N, Albalat RJ: *Epub* 2007274(14), 3739 (2006).
8. Dimitrov NV, Meyer C, Ullrey DE, et al.: *Am J Clin Nutr* 48, 298 (1988).
9. US Department of Agriculture, Agriculture Research Service. USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 15. Nutrient Data Laboratory Homepage (2002).
10. Hynie S: *Praha Karolinum* (1998 – tisk 2000)
11. Favier A, Sappey C, Leelere P, et al. *Chem Biol Interact* 91, 165 (1994).
12. Wang XD, Russell RM: *Nutr Rev* 57, 263 (1999)
13. Alexander M, Newmark H, Miller RG: *Immunol Lett* 9, 221 (1985).
14. Tomaka FL, Cimoch PJ, Reiter MM, et al.: *Int Conf AIDS* 10, 221 (1994).
15. Bianchi-Santemaria A, Fedeli S, Yale SL: *J Biol Med* 68, 19 (1995).
16. Tavani A, La Vecchia C: *Biomed Pharmacother* 53, 409 (1995).
17. Paolini M, et al.: *Mutat Res* 543(3), 195 (2003).

Souhrn

Glasová E.: Využití β -karotenu v organismu.

Prekursor vitamínu A, β -karoten, je esenciální složkou naší potravy. Stimuluje vývoj živočišných buněk, kosterního skeletu a rovněž má vliv i na reprodukci. K jeho metabolickému zpracování, kdy z jedné molekuly β -karotenu vznikají štěpením dvě molekuly retinolu, dochází pouze při nedostatečném příjmu vitamínu A z potravy. Epidemiologické studie prokázaly pozitivní vliv vyššího příjmu β -karotenu v potravě. U sledovaných skupin došlo ke snížení rizika propuknutí kardiovaskulárních chorob a rakoviny. Klinické testy prováděné se syntetickým β -karotem však tento závěr nepotvrdily a naopak naznačily potenciální škodlivost syntetického β -karotenu. Tyto testy však bude třeba ještě zopakovat.

Klíčová slova: β -karoten, vitamin A, karotenemie, fyziologický význam β -karotenu

Summary

Glasová E.: Use of β -carotene in the organism.

Precursor of vitamin A, β -carotene, is an essential component of our diet. It stimulates the development of animal cells, skeletal frame and also stimulates the reproduction. Metabolic processing of β -carotene, where splitting of one molecule of β -carotene formed two molecules of retinol, only occurs when the body has insufficient intake of vitamin A. Epidemiological studies have demonstrated the positive effect of higher intake of β -carotene in the diet. The monitored groups shown reduced risk of outbreaks of cardiovascular diseases and cancer. However clinical trials with synthetic β -carotene did not confirm this conclusion and indicated the potential harmfulness of synthetic β -carotene, but these tests will need to be repeated.

Keywords: β -carotene, vitamin A, carotenemia, physiological importance of β -carotene

MIKROBIÁLNÍ PRODUKCE 1-BUTANOLU

Michaela Linhová

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, linhovam@vscht.cz

Úvod

Zájem o tzv. biopaliva v posledních letech roste hlavně díky stálému zvyšování znečištění životního prostředí spolu s globálním oteplováním a omezenými zásobami fosilních paliv. Hledá se tedy energie, která by byla přívětivější k životnímu prostředí a zároveň také aby tento zdroj energie byl obnovitelný¹. Tyto snahy vyústily ve vydání směrnic Evropského parlamentu a rady č. 2003/30/ES a 2009/28/ES. Přímo reakcí na tyto směrnice bylo vydání českých zákonů 86/2002 Sb. o ochraně ovzduší spolu s jeho změnami 180/2007 Sb.

a 172/2010, které stanoví povinnost přidávat biosložku do pohonných hmot používaných pro dopravní účely v České republice od 1. června 2010 v množství minimálně 4,1 % objemových biosložky do motorových benzínů a 6 % objemových biosložky do motorové nafty. Dnes jsou nejrozšířenějšími biopalivy bio-nafta (nejčastěji tzv. MEŘO – methylester řepkového oleje, případně EEŘO – ethylester řepkového oleje), bioethanol (ethanol vyrobený kvasnou cestou) a bioplyn². Další biosložkou, kterou lze použít, je 1-butanol produkovaný mikrobiální cestou, jeho

Tabulka I: Porovnání vybraných vlastností 1-butanolu, ethanolu a benzínu^{4, 5}

vlastnosti	n-butanol	ethanol	benzín
spalné teplo při 25°C [kJ.mol ⁻¹]	2676	1377	4230 – 4442
výhřevnost [MJ.l ⁻¹]	29,2	23,6	34,7
molární hmotnost [g.l ⁻¹]	74,12	46,07	100 – 105
hustota při 15°C [kg.l ⁻¹]	0,8135	0,7935	0,725 – 0,775
hygroskopický, možnost využití stávajícího potrubního zařízení	méně než ethanol, lze využít stávající potrubí	ano, nelze využít stávající potrubí	–
oktanové číslo (výzkumná metoda měření – městský provoz)	96	129	91 – 98
oktanové číslo (motorová metoda měření – provoz na dálnici)	78	102	82 – 88
stechiometrický poměr vzduch/palivo	11,2	9,0	14,6
výparné teplo [MJ.kg ⁻¹]	0,43	0,92	0,36

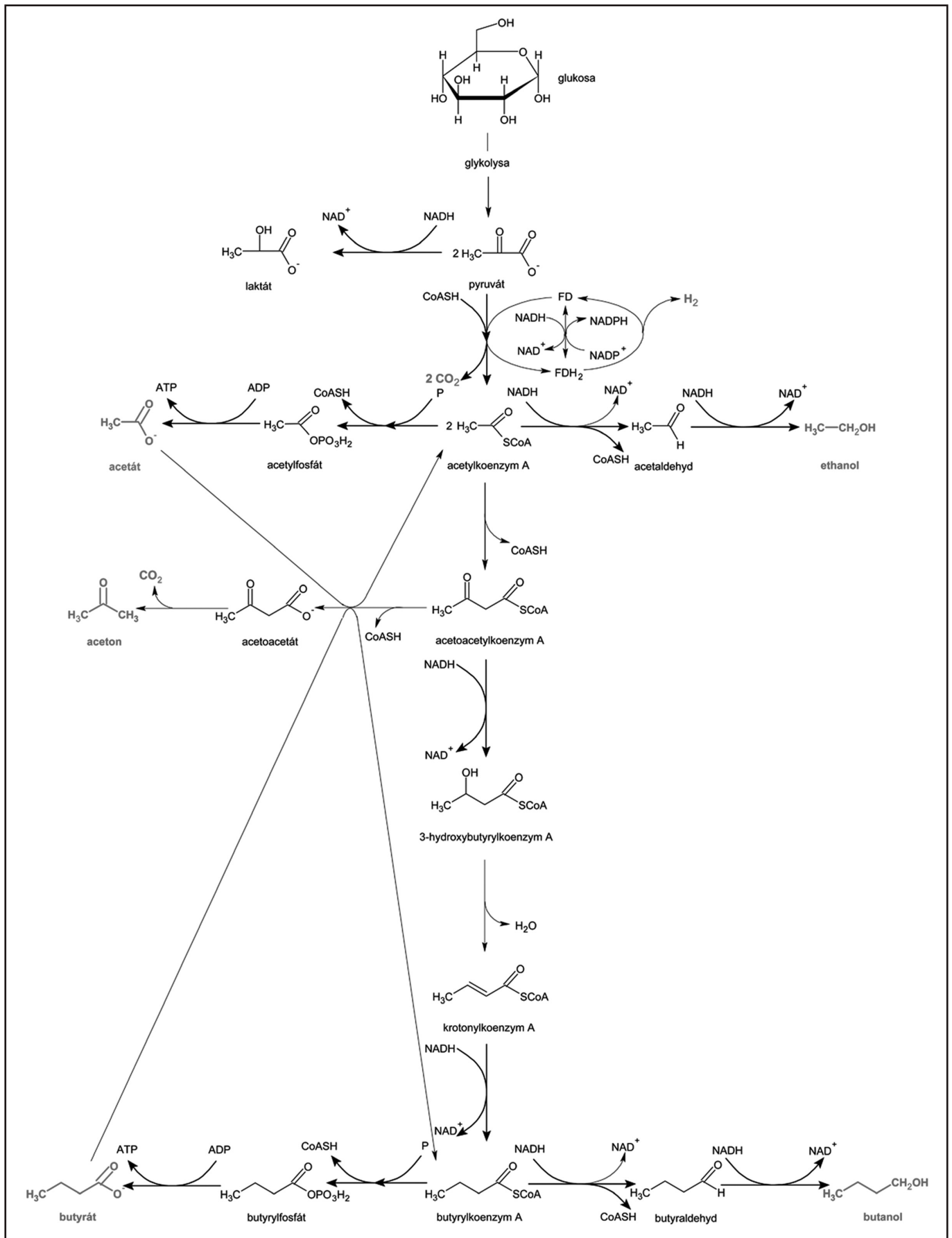
výhodou je to, že má podobné vlastnosti jako benzín, a proto jím lze nahradit (stejně jako ethanol) část fosilních paliv využívaných v sektoru dopravy. Další výhodou 1-butanolu oproti ethanolu jako biopaliva je nižší výbušnost a korozivita spolu s nižší náchylností k pohlcování vody a vyšším obsahem energie v molekule. Vyšší koncentrace bioethanolu v palivu může vést až k zamrznání paliva v nádrži v zimních měsících. Ethanol ve směsi s vodou je navíc korozivní, a proto je zde nebezpečí narušení standardně používaných těsnících materiálů v zařízeních používaných při přepravě paliva². Nejvýznamnější rozdíly ethanolu a 1-butanolu jsou uvedeny v Tab. I spolu s porovnáním těchto hodnot s benzínem.

Pokud srovnáme biotechnologickou výrobu 1-butanolu a ethanolu, je ekonomicky výhodnější proces výroby ethanolu. 1-butanol je produkován solventogenními druhy rozsáhlého bakteriálního anaerobního rodu *Clostridium*. Nejznámějšími zástupci jsou *C. acetobutylicum* a *C. beijerinckii*, kteří produkují 1-butanol během tzv. aceton-butanol-ethanolové (ABE) fermentace. Hlavní produkty 1-butanol a aceton nemají žádný potravinářský význam (jako je tomu v případě fermentační výroby ethanolu), jsou používány jako rozpouštědla pro technické aplikace³. Významnou výhodou klostridií oproti kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* (nejvíce využívaný producent ethanolu), kterou je také nutné brát v úvahu, je jejich schopnost zkvašování širší škálu surovin.

Metabolismus solventogenních klostridií

Rod *Clostridium* je velice rozsáhlý a jeho zástupci se vyskytují na mnoha místech s různými zdroji energie a uhlíku (sedimenty, půda, v trávicím traktu zvířat, na kompostech atd.), proto mají také rozdílný metabolismus a enzymovou výbavu. Z hlediska získávání energie a využívání zdrojů uhlíku jsou solventogenní klostridie chemoorganotrofové⁶. Velké množství druhů je také schopno fixovat atmosférický dusík. Jako zdroj uhlíku a energie využívají převážně sacharidy (některé druhy jsou schopny využívat také glycerol), které jsou metabolizovány v první řadě na organické kyseliny a následně pak na aceton, butanol a ethanol (ABE) rozpouštědla. K rozkladu monosacharidů využívají Embden-Meyerhof-Parnasovu (EMP) metabolickou dráhu³.

Fermentace hexos je rozdělena na 2 části, acidogenní a solventogenní (Obr. 1). Během první fáze buňky rychle rostou a produkují karboxylové kyseliny (máselnou a octovou) spolu s vodíkem a CO₂. Produkce těchto kyselin snižuje extracelulární pH a zřejmě stimuluje tvorbu enzymů nutných k tvorbě rozpouštědel. V solventogenní fázi se produkce kyselin a vodíku snižuje, zpomaluje se růst buněk a pH média se mírně zvýší v závislosti na množství spotřebovaných kyselin⁶. Převážná část kyseliny máselné je redukována na 1-butanol, zatímco u kyseliny octové je to asi jen 55 % a zbytek je dekarboxylován na aceton a CO₂⁷.



Obř. 1: Schéma rozkladu glukosy na ABE pomoci klostridií⁸. Enzymy katalyzující tyto reakce: (1) laktát dehydrogenasa, (2) pyruvát-ferredoxin oxioreduktasa, (3) NADH:ferredoxin oxioreduktasa, (4) NADPH:ferredoxin oxioreduktasa, (5) hydrogenasa, (6) fosfát acetyltransferasa, (7) acetát kinasa, (8) acetaldehyd dehydrogenasa, (9) ethanol dehydrogenasa, (10) thiolasa, (11,12) acetoacetyl-CoA:acetát/butyřát-CoA transferasa, (13) acetoacetát dekarboxylasa, (14) 3-hydroxybutyřyl-CoA dehydrogenasa, (15) krotonasa, (16) butyřyl-CoA dehydrogenasa, (17) fosfát butyřyltransferasa, (18) butyřát kinasa, (19) butyřaldehyd dehydrogenasa, (20) butanol dehydrogenasa

Předpokládá se, že přechod metabolismu z acidogenního na solventogenní je odpovědí buněk na nepříznivé podmínky (nízké pH), tzv. detoxifikační obranný mechanismus⁷.

Hlavním produktem ABE fermentace je 1-butanol doprovázený acetonem a zanedbatelným množstvím ethanolu⁶. Přesné složení produktů závisí na použitém klostridiálním kmenu a vnějších podmínkách fermentace, poměry jednotlivých látek se mohou měnit, aceton se v některých případech nemusí tvořit nebo je dále redukován na isopropanol pomocí isopropanol dehydrogenasy (*C. beijerinckii*)⁷. *C. butyricum* naopak produkuje 1,3 propandiol⁶.

Sporulace solventogenních klostridií

Pro většinu druhů klostridií je tvorba 1-butanolu vázána na tvorbu charakteristických oválných nebo sférických endospor, které často „duří“ tyčinky, čímž vznikají typické klostridiální (cigárovité) tvary buněk^{8,3}. Tvorba endospor je velice starý, komplexní proces, známý hlavně u Gram-pozitivních bakterií. Je to charakteristický rys rodů *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum* a *Sporomusa*. Pro bakteriální endospory jsou charakteristické následující vlastnosti: jejich metabolismus lze popsat jako dormantní (klidový), je to důsledkem zcela dehydratované cytoplazmy; při pozorování ve fázovém kontrastu jsou to světlé až zářivé objekty; jsou rezistentní vůči mnoha chemickým a fyzikálním činitelům, které by vegetativní buňky usmrtily⁹.

Rozsáhlé morfologické a molekulární studie klostridií a *Bacillus subtilis* (modelový mikroorganismus sporulace) naznačují, že mají velice podobný mechanismus

sporulace, i když jejich požadavky na vnější prostředí jsou značně odlišné. U rodu *Bacillus* je podnětem ke sporulaci nedostatek živin na rozdíl od klostridií, kde je ke sporulaci nutný dostatek glukosy (nebo jiného zdroje uhlíku a energie) spolu s amonnými ionty a vlastním sporulačním stimulem je pokles pH fermentačního média. Popsáním genomu *C. acetobutylicum* ATCC 824 (jako modelového mikroorganismu ABE fermentace) bylo zjištěno, že mnoho genů, identifikovaných jako důležitých pro sporulaci rodu *Bacillus*, zde chybí¹. Tabulka II shrnuje některé rozdíly mezi *C. pasteurianum* a *B. subtilis* jakožto zástupců rodů *Clostridium* a *Bacillus*, u kterých byla velice dobře popsána sporulace. *C. pasteurianum* je výjimečný druh z pohledu vývinu sporového pláště, který na rozdíl od ostatních klostridiálních druhů předchází tvorbu kortexu.

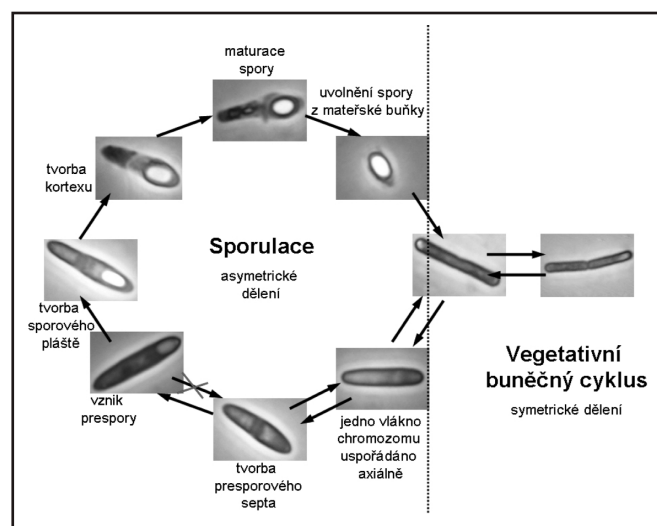
Ke sporulaci klostridií dochází nejčastěji ke konci exponenciální fáze růstu a trvá přibližně 10 hodin v závislosti na kmenu a podmínkách sporulace. Akumulace kyselin v médiu jako konečných metabolitů počáteční fáze kultivace způsobuje inhibici buněčného dělení následovanou iniciací sporulace a přechodem k solventogenní fázi metabolismu¹¹. Obrázek 2 znázorňuje právě tento přechod od symetrického buněčného dělení k asymetrickému dělení buňky za vzniku dvou nestejně velkých polovin s úplným genomem, ale s různou budoucností spory a sporangia (mateřská buňka, ve které vznikla spora).

Spora po přenesení do vhodných podmínek opět přechází ve vegetativní buněčnou formu procesem, který se nazývá klíčení (germinace). Pokud jsou spory vystaveny nějakému vhodnému stimulu, jsou schopny

Tabulka II: Rozdíly mezi *C. pasteurianum* a *B. subtilis*^{10, 8}

vlastnost při sporulaci	<i>B. subtilis</i>	<i>C. pasteurianum</i>
indukce nedostatkem živin	+	-
7 morfologických stádií sporulace	+	+
tvorba granulosity	-	+
„klostridiální“ tvar buňky	-	+
vývin sporového pláště před kortexem	+	-
délka sporulace	6 – 7 h	9 – 10 h
maturace spóry spojena s tvorbou dipikolinové kys. a změnou indexu lomu světla	+	+
<i>Spo0A</i> hlavním regulátorem sporulace	+	+

přejít na aktivní metabolismus (a to i po až několikaleté dormanci) v 1 minutě. Základní podmínkou je dostatek vody, která však musí obsahovat vhodné živiny pro budoucí množení vegetativních forem. Poté dochází ke ztrátě ochranných prvků spory (exosporium, plášť, kortex) s následným uvolněním dipikolinové kyseliny. Po proteolytickém odstranění proteinů chránících genom dochází již k nastartování metabolismu a vytvoření všech struktur vegetativní formy. Potřebná energie v ranných stádiích klíčení je získána rozkladem 3-fosfoglycerátu, který je akumulován ve velkém množství ve spoře¹².



Obr. 2: Buněčný cyklus a stádia sporulace *Clostridium pasteurianum*^{13, 14}

Spojení sporulace s tvorbou rozpouštědel je z biotechnologického hlediska nevýhodné, protože se zpomalí růst a buňky spotřebovávají značnou dávku energie na vlastní sporulaci, proto se objevily snahy tyto procesy oddělit. Zlepšení efektivity procesu by mohla zajistit příprava asporogenních mutantů; asporogenní buňky *C. acetobutylicum* jsou schopné produkovat rozpouštědla až v koncentraci 11 g.l⁻¹¹⁴.

Suroviny pro mikrobiální výrobu 1-butanolu

Nejčastěji používanými surovinami pro ABE fermentaci jsou kukuřice, cukrová řepa nebo melasa a syrovátkový permeát. Cena substrátu nejvíce ovlivňuje ekonomickou rentabilitu výroby 1-butanolu fermentační cestou⁴.

Melasa, průmyslový vedlejší produkt při výrobě cukru z cukrové třtiny, byla úspěšně používána při průmyslové produkci rozpouštědel v jižní Africe do počátku osmdesátých let. Melasa obsahuje zhruba 50 % sacharosy, která je mikroorganismy rozkládána na glukosu a fruktosu a dále pak degradována glykolytickými drahami. Syrovátkový permeát je odpadním produktem při výrobě sýrů a obsahuje 44 – 50 g.l⁻¹ laktosy. Tento substrát je bohatý na minerální látky, a proto není potřeba je přidávat do fermentačního média¹⁵. Díky vysoké amylolytické aktivitě klostridií jsou schopny tyto

mikroorganismy efektivně využívat škrob. Mohou tedy využívat kukuřici, žito, kasavu a brambory jako substrát k produkci rozpouštědel bez nutnosti hydrolytické předúpravy. Brambory a odpad z brambor se jeví jako ekonomicky vhodný substrát pro výrobu rozpouštědel, ale bylo dosaženo pouze nižších koncentrací rozpouštědel¹⁵. Kasava se nepotvrdila jako vhodný substrát pro klostridie ani, pokud byla obohacena o 20 % kukuřičnou kaši nebo o nějaký další zdroj dusíku. Dalším substrátem mohou být jeruzalémské artyčky, které obsahují velké množství oligomerních fruktanů, a proto musí být hydrolyzovány za použití inuliny a musí být také doplněny kukuřičnou nebo sojovou kaší¹⁵. Jablečné vylisky jsou zemědělským odpadem obsahující zhruba 100 g.kg⁻¹ cukrů (67 g.kg⁻¹ fruktosy, 23 g.kg⁻¹ glukosy a 10 g.kg⁻¹ sacharosy) a jsou další možnou surovinou pro klostridie¹⁶. Bylo zjištěno, že biomasu mikroskopických řas *Dunaliella* lze taktéž použít jako substrát pro ABE fermentaci. Ukázalo se, že tuto biomasu je vhodné doplnit o glycerol a použít pro fermentaci *C. pasteurianum*, kdy kromě 1-butanolu je produkován také 1,3-propandiol⁷.

Vysoká cena melasy, kukuřice a syrovátkového permeátu dělá z ABE fermentace výrobu rozpouštědel, která není schopna ekonomicky konkurovat syntetické výrobě z ropy. Proto byly hledány jiné možné substráty pro tento proces, vhodnými se jeví tzv. energetické plodiny například proso, štovík, ozdobnice čínská a pšeničná, žitná, rýžová a kukuřičná sláma¹⁵, které obsahují vysoký podíl celulózy a hemicelulózy. Například pšeničná sláma, která je v Evropě běžným zemědělským odpadem, obsahuje 35 – 40 % celulózy, 20 – 30 % hemicelulózy a relativně nízký obsah ligninu (pod 20 %). Solventogenní klostridie bohužel nedokážou lignocelulosové materiály přímo zkvašovat, proto je nutné tuto surovinu před vlastní fermentací převést na jednoduché sacharidy. To se děje většinou kombinací fyzikálně-chemické hydrolyzy za zvýšené teploty a tlaku a působení činidel (nejčastěji zředěných kyselin), po které následuje enzymová hydrolyza pomocí komerčních celulytických preparátů, což zase cenu suroviny zvýší.

Produkční mikroorganismy

Dnes je známo velké množství druhů produkujících ABE, které se od sebe liší nejčastěji v typu a poměru rozpouštědel, které produkují a typem substrátu, na kterém nejlépe rostou. Pro produkci rozpouštědel se nejčastěji využívají druhy *C. beijerinckii* a *C. acetobutylicum*. *C. beijerinckii* produkuje rozpouštědla v téměř stejném poměru jako *C. acetobutylicum* ale místo acetonu může v některých případech tvořit isopropanol. Další kmeny produkující rozpouštědla jsou *C. pasteurianum*, *C. saccharobutylicum*, *C. aurantibutyricum*, *C. carboxidivorans* a *C. tetanomorphum*. *C. aurantibutyricum* produkuje spolu s 1-butanolem aceton i isopropanol¹. *C. carboxidivorans* ATCC BAA-624, izolovaný ze zemědělské kalové nádrže v Oklahomě, dokáže využívat syngas k tvorbě rozpouštědel. Hlavním

produktem této fermentace ale není 1-butanol ale ethanol¹⁷. Z hlediska využití ABE fermentace pro výrobu biosložky do benzínu a nafty se jako významný kmen jeví *C. tetanomorphum*, kde výsledné produkty fermentace tvoří pouze ethanol a 1-butanol bez acetonu, kdy obě tyto složky lze přidávat do paliv (aceton přidávat nelze). Další výhodou tohoto kmene je produkce rozpouštědel již v exponenciální fázi růstu u nesporulujících buněk, což by bylo z biotechnologického hlediska výhodnější¹⁸.

Další možností jsou tzv. asporogenní kmeny, u kterých se zachovala produkce rozpouštědel a které byly připraveny jako GM kmeny nebo izolovány z dlouhodobě kontinuálně kultivované kultury¹⁹. Jak již bylo zmíněno dříve, sporulace není z biotechnologického hlediska pro výrobu 1-butanolu výhodná. S těmito kmeny bylo dosaženo často velice dobrých výsledků převážně, co se týká výtěžnosti a produktivity 1-butanolu, v současné době se tyto kmeny jeví jako velice vhodné pro budoucí průmyslovou výrobu 1-butanolu.

Další možností jsou kmeny geneticky upravené s cílem zvýšit produkci rozpouštědel, zvýšit toleranci k 1-butanolu, rozšířit množství využitelných substrátů, zvýšit výtěžnost 1-butanolu na využívaný substrát a snížit produkci kyselin ve prospěch rozpouštědel nejlépe přímo 1-butanolu. Například inaktivací genu *solR*^{20,21} dojde k tvorbě rozpouštědel dříve než u nemodifikovaných kmenů (časově nástup rozpouštědlové fáze odpovídá kyselinotvorné fázi)⁴. Další možností je inaktivace genů *buk* a *pta*, které kódují enzymy butyrát kinasu a fosfotransacylasu, čímž dojde ke zvýhodnění metabolické dráhy produkce rozpouštědel⁴. Nair *et al.*²⁰, Harris *et al.*^{21,22} a Tummala *et al.*²³ s geneticky modifikovanými kmeny dosáhli velice slibných výsledků pro případnou průmyslovou produkci. Bylo také učiněno velké množství pokusů o sestavení kmene, který by dokázal přímo využívat celulosu jako substrát (bez nutnosti předúpravy). Dalším krokem byly snahy o vnesení některých genů z celulólytických klostridií jako jsou *C. thermocellum*, *C. cellulolyticum* a *C. cellulovorans* do solventogenních kmenů, nicméně celulasová aktivita takto vytvořených kmenů je stále velice nízká⁴.

Kromě cílených zásahů do genomu mikroorganismů se používá chemická nebo fyzikální mutagenese. K těmto účelům se používají různé chemické mutageny nebo UV záření. V roce 2002 si Blaschek *et al.*²⁴ nechali patentovat dnes již velice známý a úspěšný kmen *C. beijerinckii* BA101, zmutovaný *N*-methyl-*N*9-nitro-*N*-nitrosoguanidinem, se kterým lze dosáhnout vyšší koncentrace 1-butanolu (18,6 g.l⁻¹ oproti běžně dosahovaným 13 g.l⁻¹).

V dnešní době je vkládáno také mnoho nadějí do konstrukce rekombinantního neklostridiálního mikroorganismu, který by produkoval výrazně vyšší množství 1-butanolu. Nemožnost produkce 1-butanolu nad 20 g.l⁻¹ se přisuzuje toxickému efektu 1-butanolu na produkční mikroorganismus. Vnesením klostridiál-

ních genů do mikroorganismů tolerujících vyšší koncentrace 1-butanolu by se tedy zlepšila celá ekonomika procesu ABE fermentace. Tolerance k 1-butanolu je ale u většiny mikroorganismů velice podobná 2 %⁵. Možným kandidátem na hostitelský mikroorganismus se však jeví *Pseudomonas putida*, u které bylo zjištěno, že dokáže růst i při 60 g.l⁻¹ 1-butanolu²⁵.

Uspořádání procesu ABE fermentace

Při snaze učinit ABE fermentaci ekonomicky konkurenceschopnou vůči syntetické výrobě 1-butanolu je kladen důraz mezi jinými také na to, jakým způsobem co nejvýhodněji uspořádat tento proces. V průmyslu se používala nejčastěji vsádková fermentace. Mezi její výhody patří menší riziko kontaminace, jednoduchá realizace a nižší investiční náklady na zařízení. Mezi nevýhody zase neproduktivní časy procesu (lag fáze, sterilace, plnění a čištění bioreaktoru), možná inhibice substrátem a produktem.

Výhodou přítokovaného uspořádání procesu fermentace je postupné dávkování substrátu do bioreaktoru a tím zamezení substrátové inhibice a zvýšení produktivity. Při současném odstraňování produktu během přítokované kultivace lze dosáhnout prodloužení doby kultivace a celkově tak získat větší množství produktu.

Kontinuální uspořádání bioprocesu je vhodné ke zvýšení produktivity procesu hlavně z důvodu odstranění neproduktivních časů procesu. Naopak nevýhodou tohoto otevřeného systému je vyšší riziko kontaminace a degenerace produkční kultury spolu s vyššími nároky na udržení anaerobní atmosféry. Degenerace je způsobena především selekčním tlakem, který zvýhodňuje rostoucí populaci, tvořící kyseliny. Díky dvoufázovému procesu produkce rozpouštědel (acidogenní a solventogenní fáze), který je spojen se sporulací, je dosahováno při kontinuálních kultivacích pouze tzv. pseudoustáleného stavu. Pokud nejsou buňky v bioreaktoru nějakým způsobem imobilizovány, je koncentrace rozpouštědel v médiu zhruba poloviční v porovnání se vsádkovým procesem. Imobilizací nebo recyklací buněk spolu se separací 1-butanolu z média, lze zvýšit produktivitu²⁶.

Modifikací kontinuální kultivace je dvoustupňové kontinuální uspořádání bioprocesu, kdy v prvním stupni jsou produkovány převážně kyseliny, zatímco ve druhém stupni naopak rozpouštědla. Tento proces²⁷ umožňuje dosáhnout podobných výsledků jako při vsádkové kultivaci.

Závěr

Ačkoli tradice fermentační výroby 1-butanolu sahá až do doby první světové války, v důsledku neschopnosti této výroby ekonomicky konkurovat výrobě butanolu z ropných zdrojů, došlo k jejímu výraznému omezení. V současné době se průmyslově vyrábí biobutanol pouze v Číně²⁸. Vzhledem ke snižujícím se zásobám ropy lze v budoucnu očekávat rostoucí zájem o tuto technologii. Pokud se podaří eliminovat nedostatky, které tento proces provázejí, vytvořit stabilní hyperpro-

dukční kmen s vysokou tolerancí vůči 1-butanolu (klostridiální nebo jiný geneticky upravený mikroorganismus), který je schopen využívat levné suroviny, mohla by fermentační výroba 1-butanolu výrazně

příspět ke zpomalení využívání ropných zásob a prodloužit tak čas pro hledání nových zdrojů energie.

Tato studie byla zpracována s finanční podporou projektů TIP č. FR-T11/218, výzkumného záměru MŠM6046137305 a z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT č. 21/2011

Literatura

1. Kharkwal S, Karimi IA, Chang MW, et al.: *Recent Pat. Biotechnol.* 3, 202 (2009).
2. Kozák P: *Autoexpert* 7-8, 28 (2007).
3. Robinson RK, Batt CA, Patel PD: *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 1, Elsevier, New York 2000.
4. Lee SY, Park JH, Jang SH, et al.: *Biotechnol. Bioeng.* 101, 209 (2008).
5. Fisher CR, Klein-Marcuschamer D, Stephanopoulos G: *Metab. Eng.* 10, 295 (2008).
6. Gheshlaghi R, Scharer JM, Moo-Young M, et al.: *Biotechnol. Adv.* 27, 764 (2009).
7. Jones DT, Woods DR: *Microbiol. Rev.* 50, 484 (1986).
8. Vos PD, Garrity GM, Jones D, et al.: *Bergey's manual of Systematic bacteriology: vol. 3: The Firmicutes*, Springer, New York 2009.
9. Brun YV, Shinkets LJ: *Prokaryotic Development*, American Society for Microbiology, Washington 2000.
10. Hilbert DW, Piggot PJ: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 234 (2004).
11. Long S, Jones TD, Woods DR: *Biotechnol. Lett.* 6, 529 (1984).
12. Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontier*, ASM Press, Washington 1997.
13. Errington J: *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 117 (2003).
14. Bernandes MADS: *Biofuel's Engineering Process Technology*, InTech, Rijeka 2011.
15. Schaechter M.: *Encyclopedia of Microbiology*, Elsevier, Oxford 2009.
16. Voget CE, Mignone CF, Ertola RJ: *Biotechnol. Lett.* 7, 43 (1985).
17. Patent č. 2007/0275447: 2007-11-29
18. Gottwald M, Hippe H, Gottschalk G: *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 573 (1984).
19. Patent č. 4521516: 1985-06-04
20. Nair RV, Green EM, Watson DE, et al.: *J. Bacteriol.* 181, 319 (1999).
21. Harris LM, Blank L, Desai RP, et al.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 322 (2001).
22. Harris LM, Desai RP, Welker NE, et al.: *Biotechnol. Bioeng.* 67, 1 (2000).
23. Tummala SB, Junne SG, Papoutsakis ET: *J. Bacteriol.* 185, 3644 (2003).
24. Patent č. US6358717B1: 2002-03-19
25. Rühl J, Schmid A, Blank LM: *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4653 (2009).
26. Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP: *The Chemical Record* 4, 305 (2004).
27. Bahl H, Andersch W, Gottschalk G: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15(4), 201 (1982).
28. Ni Y, Sun Z: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 415 (2009).

Souhrn

Linhová M.: Mikrobiální produkce 1-butanolu

V posledních desetiletích je snahou Evropského společenství snížit závislost svých členských států na ropných zdrojích, což vede k zájmu o procesy, které využívají obnovitelné zdroje energií. Jedním z nich je proces výroby 1-butanolu, který je realizován pomocí různých solventogenních druhů klostridií. Butanol se fermentačním způsobem produkuje při aceton-butanol-ethanolové fermentaci, kdy v první fázi procesu dochází k tvorbě organických kyselin a v druhé fázi procesu, často spojené se sporulací produkčního kmene, se tvoří rozpouštědla. Dvoufázový charakter fermentace výrazně komplikuje regulaci procesu a toxicita produktů brání dosažení jejich vysoké koncentrace. Aby byla zvýšena efektivita tohoto procesu, je prováděn intenzivní výzkum, zaměřený hlavně na zlepšení produkčních vlastností kmenů, zvýšení jejich odolnosti k 1-butanolu, využití levných surovin a zvýšení celkové produktivity procesu. Pokud se podaří výrobní cenu biobutanolu snížit, mohl by díky svým výhodným vlastnostem sloužit jako kosolvent do motorového paliva, do kterého se dnes již přidává ethanol a oddálit tak nevyhnutelné vyčerpání fosilních paliv.

Klíčová slova: 1-butanol, *Clostridium*, ABE fermentace, sporulace

Summary

Linhová M.: Microbial production of 1-butanol

An effort of European Community to reduce its dependence on fossil fuels provokes increased interest on processes using renewable energy resources. One of them is the fermentation process of 1-butanol production using various types of solventogenic clostridia. Biobutanol is produced by aceton-butanol-ethanol fermentation process consisting of two phases – acidogenic and solventogenic, which is associated with sporulation. Biphasic nature of fermentation significantly complicates the process control and product toxicity prevents the achievement of high concentration of solvents.

To increase the efficiency of this process, an inventive research focused on improving the production characteristics of strains, increasing their resistance to 1-butanol, the use of cheap raw materials and amelioration of overall productivity of the process is carried out. If the production cost of biobutanol would be reduced, it could be advantageously used as an additive to petrol which could postpone the depletion of fossil fuels.

Keywords: 1-butanol, *Clostridium*, ABE fermentation, sporulation

SOUČASNÉ TRENDY APLIKACE ENZYMŮ DO PRACÍCH PRÁŠKŮ A ČISTICÍCH PROSTŘEDKŮ

Miroslava Špácová

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, miroslava.spacova@vscht.cz

Úvod

Prací prášky a čisticí prostředky již dávno nejsou pouze směsí chemických detergentů, surfaktantů a bělicích činidel. Moderní biotechnologie mají zásluhu na tom, že se tyto civilizační nezbytnosti staly za posledních 60 let mnohem „zelenější“ k životnímu prostředí. Prostředkem k tomuto pokroku byla především aplikace enzymů. Jako první byly do formulace pracích prášků v 60. letech 20. století zavedeny proteolytické enzymy, postupně doplněné o amylasy, lipasy a v neposlední řadě i celulasy. Kromě zvýšení účinnosti při odstraňování jednotlivých složek nečistot a špíny, poskytly proteasy, lipasy a amylasy další výhody pro životní prostředí v redukci spotřeby vody, zkrácení doby praní a především snížení teploty praní. Celulasy zase pomáhají ochraňovat prané prádlo a udržet jeho stále nový vzhled. Navíc jsou enzymy získávány z obnovitelných zdrojů a jsou v přírodě odbouratelné. Zvýšení efektivity pracích a čisticích prostředků vedlo také k formulaci vysoce koncentrovaných prostředků a tím snížení spotřeby v přírodě těžko degradovatelných obalových materiálů. Za posledních 40 let se enzymy staly z minoritní složky klíčovou komponentou pracích a čisticích prostředků.¹

Enzymy se staly středem zájmu pro vylepšování a inovace. Enzymy musí být schopné působit ve formulaci pracích prášků často za nepřírodných podmínek – za extrémního pH, vysoké teploty a v rámci komplexní matrice povrchově aktivních látek, oxidačních činidel a dalších komponent. Nedostatečnost enzymů čelit těmto podmínkám skýtala potenciál pro vylepšování. Metodami rekombinantních DNA technologií a proteinového inženýrství byly vytvořeny a vyprodukované enzymy, které pracují za daných podmínek a jsou efektivnější.² Proteinové inženýrství k tomu využívá dva koncepčně rozdílné přístupy – racionální design a řízenou evoluci. Racionální design na základě znalosti struktury proteinu vnáší mutace jednotlivě metodou místně cílené mutagenese. Naproti tomu řízená evoluce náhodně generuje rozsáhlé knihovny mutovaných genů, ve kterých jsou následně screenem nebo selekcí hledány geny s nejlepšími vlastnostmi. Nástroji pro tvorbu těchto knihoven jsou molekulárně-biologické metody jako je náhodně-chybující PCR, použití mutátorových kmenů, cirkulární permutace³ nebo mísení genů (angl. DNA shuffling)⁴. Řízená evoluce tak napodobuje ve zkumavce Darwinovskou evoluci, ale tyto procesy významně urychluje.³

Dalším přístupem při hledání enzymů s lepšími vlastnostmi je využití přirozené biodiversity organismů, ať už se jedná o skenování rozličných metagenomů, izolaci

enzymů z nových organismů⁴ nebo využití enzymů extremofilů⁵.

Následující odstavce budou věnovány vývoji enzymů používaných v pracích prášcích. Zde musí být enzymy funkční za alkalického pH 8-10, musí být stabilní a funkční v relativně širokém rozpětí teplot (30 – 60 °C), musí odolávat účinkům oxidačních činidel, musí být odolné vůči chelátům a koneckonců být rezistentní i proti svým spolubojovníkům proti nečistotám – proteasám.

Proteasy

Historie použití proteolytických enzymů v pracím prostředku se datuje zpět do roku 1914, kdy dva němečtí vědci Rohm a Haas použili pankreatický extrakt obsahující trypsin, chymotrypsin a další proteasy pankreatu. V současnosti je 89% proteas prodaných na trhu aplikováno do detergentních prostředků. Hlavní podíl na tom mají subtilisin a/nebo alkalické proteasy z různých druhů rodu *Bacillus*.³ Úspěch subtilisinu tkví v jeho stabilitě a nízké substrátové specifitě. Přesto došlo od roku 1984, kdy byl prvně modifikován, k jeho neustálému vylepšování až do té míry, že v roce 1996 byla již každá z 275 aminokyselin BPN subtilisinu modifikována místně cílenou mutagenézou v rámci racionálního designu nebo později různými metodami náhodné mutagenese.^{2,6} Ukázkovým příkladem racionálního designu byla substituce Met222 aminokyselinou, která je stabilní vůči oxidaci peroxidem vodíku. Ten je společně s peroxokyselinami častým bělicím činidlem v pracích prášcích. Vlastnost methioninu oxidovat na sulfoxid byla známa již dlouho předtím, než byla prvně použita místně cílená mutagenese.⁶ Protože takto modifikované subtilisiny nepřinesly očekávané výsledky, co se týče účinnosti odstraňování nečistot, je stabilita vůči oxidaci vzhledem k účinnosti enzymu předmětem studia ještě v současnosti.

Yang a kol.⁷ použili mutantní gen pro subtilisin E M222A, kde je právě v pozici 222 methionin substituívaný alaninem, který je rezistentní k oxidaci, pro zvýšení termostability tohoto enzymu. Využili k tomu náhodnou mutagenézi pomocí PCR. Sekvenací genu nalezeného termostabilního mutantu byla odhalena bodová mutace v záměně adeninu A za guanin G v kódující oblasti (triplet AAT se změnil na AGT a tedy došlo k substituci aminokyseliny asparaginu N v pozici 118 za serin S) a současně v nekódující oblasti, která změnila sekvenci místa štěpení pro *Pst* I. Mutaci navodili v PCR podmínkách změnou poměru dATP/dGTP na 1/10, čímž bylo možné zvýšit pravděpodobnost substituce A-G nebo T-C. Poločas inaktivace mutantu

M222A/N118S při 65 °C byl 80 min ve srovnání s 13 minutami u výchozího mutantu M222A a 15 minutami u nemutovaného subtilisinu E. Získaný termostabilní mutant subtilisinu si zároveň zachoval schopnost nebýt inaktivován oxidací a je tedy vhodným kandidátem pro použití v pracích prášcích.⁷ Stabilita vůči oxidaci je žádoucí především v granulovaných pracích prášcích, kde jsou enzymy v přímém kontaktu s bělicími činidly. Naopak v tekutých pracích prostředcích je největší problém při použití proteas autoproteolýza.⁶

Přidávání proteolytických enzymů přispělo v 70. letech v Evropě ke snížení teploty praní z 95 °C na 60 °C.¹ I tato teplota však působila denaturaci používaných enzymů. Při honbě za zvyšováním výkonnosti pracích prášků byla právě termostabilita proteas prvním cílem pro zlepšení. Příkladem využití biodiverzity organismů je použití alkalické proteasy izolované z *Bacillus cereus*. Tato alkalická proteasa vykazovala ve srovnání s proteasami z komerčních pracích prášků vyšší proteolytickou aktivitu při širším rozpětí teplot. Zatímco proteasy v komerčních pracích prášcích si zachovaly po hodinové inkubaci při teplotě 40 °C ještě 70% proteolytické aktivity, při 50 °C už jen 30 %. Alkalická proteasa z *B. cereus* si v prostředí těchto pracích prášků zachovala 80% proteolytické aktivity jak při 40 °C tak při 50 °C.⁸ Tato alkalická proteasa je tedy příkladem, že použití dalších nových enzymů v detergentních prostředcích je cestou, jak zvýšit jejich účinnost.

V současnosti se však objevuje i poptávka po enzymech, které jsou účinné i za relativně nízkých teplot. Důvodem je nejen snížení spotřeby energie při praní, ale obliba luxusních oděvních materiálů, které vyžadují nízké teploty při praní (20 – 30 °C). Zde se otevírá pole působnosti pro enzymy izolované z extremofilů, resp. alkalofilních psychrofilních organismů.

Charakteristickým znakem mnoha enzymů z psychrofilních organismů je vysoká katalytická aktivita za nízkých teplot, ale nízká termostabilita za středních a vysokých teplot.^{5,9} Miazaki a kol.⁹ se zaměřili na zvýšení termostability a aktivity u psychrofilního subtilisinu S41. Použili přístup řízené evoluce. Kombinací metod náhodné mutagenese, saturační mutagenese a rekombinace *in vitro*, tzv. mísení genů (angl. DNA shuffling) vytvořili knihovnu mutantů, ve které byl hledán mutant, který by měl vyšší termostabilitu, aniž by u něj byla kompromitována aktivita za nízkých teplot. Nalezený mutant 3-2G7 vykazoval 3x vyšší specifickou aktivitu v rozmezí teplot od 10 °C do 60 °C oproti původnímu subtilisinu S41. Řízenou evolucí tak byl nalezen mutant, který potvrzuje, že je možné současně zvýšit aktivitu za nízkých teplot a stabilitu za vysokých teplot. Pokud bychom porovnali přístup řízené evoluce s racionálním designem u podobného experimentu s psychrofilním subtilisinem S39, který se velmi podobá subtilisinu S41 (sdílí 88,3 % identity), byla řízená evoluce úspěšnější. Místně cílenou mutagenézou bylo vytvořeno pět variant substitucí u subtilisinu S39, z nichž pouze jediná byla efektivní. Tato mutace byla navíc u subtilisinu S39 již známá ve zvýšení stability k vysokým teplotám.⁹

I přes neustálé vylepšování proteas se očekává, že lze dosáhnout ještě lepších výsledků kombinováním metod řízené evoluce s racionálním designem nebo se skenováním metagenomu. V obou případech je však stěžejním krokem metodika hledání pozitivních mutantů, kde jsou ještě výrazné skryté rezervy.⁶

Amylasy

Ačkoliv amylasy jsou tradičně používány při zpracování škrobu, našly uplatnění i v detergentních prostředcích. V současnosti je obsahuje 90 % tekutých detergentů.¹⁰ Stejně jako proteasy musí i amylasy působit v silně alkalickém pH za relativně vysokých teplot. Přitom většina α -amylas pocházejících z rodů *Bacillus* jako jsou enzymy izolované z *B. licheniformis* (BLA), *B. amyloliquefaciens* (BAA) a *B. stearothermophilus* (BSA) degradují škrob za kyselého pH, tudíž byly v pracích prášcích nepoužitelné. Objev první alkalické α -amylasy byl publikován v roce 1971¹¹ a od roku 1975 se α -amylasy běžně používají v pracích prášcích¹⁰.

Amylasy však kromě pH a teploty musí odolávat působení proteas a oxidačním a chelatačním činidlům. Právě poslední dvě jmenovaná činidla dělají vědcům při aplikaci amylas v pracích prostředcích největší vrásky. Ukázalo se, že amylasy nevydrží v prostředí s nízkým obsahem vápenatých iontů a jsou velmi senzitivní k oxidacím. V současnosti byly publikovány výsledky o nalezení a následném vylepšení nové alkalické α -amylasy AmyK izolované z roku *Bacillus* izolátu KSM 137. Její termostabilita byla zvýšena místně cílenou mutagenézou, když na základě homologie s BLA (nejvíce termostabilní α -amylasa) odstranili aminokyseliny Arg181-Gly182 a Arg124 vyměnili za prolin. Tento mutant získal také rezistenci k chelatačním činidlům, ale stále byla tato odolnost nižší než u BLA. Později tato skupina vědců izolovala další alkalickou α -amylasu z rodu *Bacillus* izolátu KSM-K38, pravděpodobně nového druhu rodu *Bacillus*. Objevená amylasa AmyK38 převyšuje svou aktivitou a stabilitou vůči chelatačním a oxidačním činidlům enzym BLA. Dokonce pro použití v pracích prášcích má lepší optimální teplotu s nejvyšší aktivitou enzymu při 55 °C. Jediným potenciálem pro vylepšení metodami proteinového inženýrství je její termostabilita. Přístup racionálního designu byl v tomto případě překonán nalezením jiné nové amylasy.

Lipasy

Zatímco proteasy byly prvně v komerčním pracím prášku použity v 60. letech, amylasy v letech 70., první lipasa pro použití v pracích prášcích byla představena až v roce 1988 firmou Novo Nordisk (nyní Novozymes) v Japonsku.¹ Většina lipas má přitom vhodné vlastnosti pro aplikaci do pracích prášků. Působí většinou v neutrálním až alkalickém pH a nejvyšších aktivit dosahují v rozmezí teplot 30–60 °C.¹¹ Navíc jsou většinou velmi dobře odolné k oxidačním činidlům a některé nejsou vůbec závislé na obsahu vápenatých iontů. Pro aplikaci do detergentních prostředků se využívá

v současnosti především lipasy Lipolase™ izolované původně z houby *Humicola lanuginosus* (nyní *Thermomyces lanuginosa*) exprimované rekombinantně v *Aspergillus oryzae* a lipolas Lumafast™ a Lipomax™ z rodů bakterie *Pseudomonas*.^{12,13} Objevují se však nové lipasy izolované z nových druhů. Lipasa izolovaná z *Ralstonia pickettii* byla v kompozici s komerčními pracími prášky o 24 – 27 % účinnější v odstranění olivového oleje než samotný prací prášek. Podobné výsledky byly získány také u lipas z *Candida cylindracea* a *Aspergillus niger*.¹⁴ Velký potenciál použití mají samozřejmě opět i enzymy izolované z extremofilů. Sharma a kol. izolovali alkalickou termostabilní lipasu z nového termofilního druhu rodu *Bacillus* RSJ-1. Tato alkalická lipasa vykazovala nejvyšší aktivitu při pH 8 – 9 za teploty 50 °C a ještě po 120 minutách při 50 °C si zachovala 90 % své původní aktivity. EDTA jakožto chelatační činidlo neovlivnilo její aktivitu, naopak přítomnost oxidačních činidel a surfaktantů aktivitu redukovala. V přítomnosti většiny testovaných komerčních detergentů si lipasa zachovala více jak 55 % své původní aktivity, v některých dokonce více jak 90 %. Svými vlastnostmi je předurčena pro možnou aplikaci do pracích prostředků.¹⁵

Skenování knihovny konstruované z metagenomu mořského sedimentu na lipolytickou aktivitu byl nalezen gen lipasy aktivní za nízkých teplot EML1. Exprese tohoto genu v *E. coli* dala vznik lipase rEML1, která vykazovala nejvyšší aktivitu při pH 8 a 25 °C, přičemž ještě při 5 °C si zachovávala 50 % aktivity. Byla testována na štěpení několika v přírodě se vyskytujících olejů a nejlépe hydrolyzovala triacylglyceroly s mastnými kyselinami, které mají v řetězci více jak 8 uhlíků. Navíc byla odolná k detergentním činidlům.¹⁶ Přestože její optimální pH je o něco nižší, než by bylo vhodné pro použití v pracích prášcích, je možná její aplikace do dalších detergentních prostředků aplikovaných za nízkých teplot. Případné zvýšení jejího optimálního pH metodami proteinového inženýrství by ji učinilo výborným kandidátem pro použití do pracích prášků, které mají být účinné za nízkých teplot.

V současnosti je takovým enzymem Lipolase Ultra™ vyvinutá firmou Novozymes, která má vylepšenou účinnost za teplot pod 20 °C. Nahrazením záporně nabitého aspartátu v pozici 96 za neutrální hydrofobní leucin došlo k redukci odpudivých sil v místě kontaktu enzymu s lipidem.¹⁷

Pomalý vývoj komerční lipasy použitelné v detergentních prostředcích byl dán především nízkými výtěžky fermentace a teprve za použití rekombinantních DNA technik byly vytvořeny lipasy s dobrým poměrem výkon/cena. Proteinové inženýrství se pak zaměřilo především na vylepšení dvou nedostatků – stability vůči proteasám a účinnosti lipas při prvním praní.

Stabilita vůči degradaci proteasami byla u lipasy izolované z *P. glumae* vylepšena místně cílenou mutagenézí. Racionálním podnětem byl obecně známý fakt, že většina proteas z rodiny subtilisinu a chymotrypsinu nejsou schopné štěpit neobvyklou vazbu na C-termi-

nálním konci v místě štěpení. Mezi takové neobvyklé vazby patří i vazba na prolin. Zavedením mutace H154P a následně S151R byl vytvořen enzym s vysokou proteolytickou stabilitou.¹⁸

Po zavedení Lipolasy do formulace pracích prostředků vývoj směřoval k vytvoření lipasy, která bude účinná již při prvním praní. Efekt lipasy byl totiž viditelný až po několika cyklech praní, přičemž bylo zjištěno, že má největší efekt při obsahu vody v tkanině okolo 20 – 40 %, čili až během sušení prádla. Firma Novozymes dále vylepšila za pomoci proteinového inženýrství v tomto ohledu Lipolasu a od roku 1995 ji distribuuje pod názvem LipoPrime™, ale další výzkum této oblasti pokračuje.^{1,17}

Celulasy a oxidoreduktasy

Celulasy se přidávají do pracích prášků za účelem změkčování a uchování „stále nového“ vzhledu. Působí přímo na bavlněná vlákna a odstraňují žmolky vznikající běžným nošením a praním a zachovávají barvu prádla. Tímto působením jsou celulasy unikátní.^{1,17} Byla to právě alkalická celulasa z bakterie izolované z afrického Soda Lake, která byla jako první extremozym použita v pracích prostředcích.¹⁹

V současnosti se zkoumá i možnost nahradit bělicí činidla v pracích prášcích peroxidasami a oxidasami. Doposud byla použita peroxidasa z *Coprinus cireneus* pro zamezení zapírání prádla. Enzym byl vyvinut firmou Novozymes a je distribuován pod názvem Guardzyme™.¹

Závěr

Ve vývoji moderních pracích prostředků hrají hlavní roli enzymy a jejich vylepšování metodami proteinového inženýrství a rekombinantních DNA technologií. Se zvýšením účinnosti pracích prášků se snížila jejich spotřeba a zároveň zatížení životního prostředí jak jejich vylučováním do odpadních vod, tak nižší spotřebou obalových materiálů. Díky enzymům se staly v přírodě lépe degradovatelné. Velká množství fosfátů přidávaných ke změkčení vody bylo nahrazeno zeolity, které již nevážou ionty ve vodě napevno, ale fungují jako iontoměniče a jsou přírodě vlastní.

Využitím enzymů z psychrofilních organismů či genetickými modifikacemi používaných i nových enzymů se dále snižuje teplota nutná pro účinné odstranění nečistot během praní, čímž se snižuje spotřeba energie. Tím vším se prací prostředky staly mnohem přívětivější životnímu prostředí naší planety a je nezpochybnitelné, že právě přístup moderních biotechnologií na tom má nenahraditelné zásluhy. Očekává se, že kombinací přístupů řízené evoluce s racionálním designem či se skenování metagenomů bude možné nalézt ještě účinnější enzymy. Stěžejním krokem přitom zůstává identifikace vhodných mutantů z obrovských knihoven. Ke tvorbě menších knihoven s užším spektrem mutantů by mohlo přispět kombinování různých přístupů s údaji z výpočetního modelování, bioinformatiky a ze strukturních analýz proteinů.

Literatura

1. Olsen HS, Falholt P: *J. Surfactants Deterg.* 1, 555 (1998).
2. Cherry JR, Fidantsef A: *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 438 (2003).
3. Damborský J: Sborník z 2. multioborového semináře pořádaného Akademií věd v Praze (2006).
4. Gupta R, Beg QK a Lorenz P: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 15 (2002).
5. Burg B: *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 213 (2003).
6. Maurer KH: *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 330 (2004).
7. Yang Y, Jiang L, Zhu, L, et al.: *J. Biotechnol.* 81, 113 (2000).
8. Banik RM, Praksh M: *Microbiol. Res.* 159, 135 (2004).
9. Miazaki K, Wintrode PL, Grayling RA, et al: *J. Mol. Biol.* 297, 1015 (2000).
10. Gupta R, Gigras P, Mohapatra H: *Process Biochem.* 38, 1599 (2003).
11. Gupta R, Gupta N, Rathi P: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 763 (2004).
12. Hasan F, Shah AA, Hameed A: *Enzyme Microb. Technol.* 39, 235 (2006).
13. Svendsen A: *Biochim. Biophys. Acta* 1543, 223 (2000).
14. Hemachander C, Puvanakrishnan R: *Process Biochem.* 35, 809 (2000).
15. Sharma R, Soni SK, Vohra RM: *Process Biochem.* 37, 1075 (2002).
16. Jeon JH, Kim JT, Kim YJ, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 865 (2009).
17. Aehle W: *Enzymes in industry: production and applications.* Wiley, Weinheim 2007.
18. Malcata FX: *Engineering of/with lipases.* Springer 1995.
19. Hasan F, Shah AA, Sundus J, et al: *Afr. J. Biotechnol.* 9, 4836 (2010).

Souhrn

Špácová M.: Současné trendy aplikace enzymů do pracích prášků a čisticích prostředků

Současným trendem v aplikaci enzymů do pracích prášků a čisticích prostředků je vylepšování vlastností používaných enzymů metodami proteinového inženýrství a rekombinantních DNA technologií za účelem získat účinnější prací nebo čisticí prostředek s co nejlepším poměrem výkon-cena za současného snížení spotřeby energie při praní. Pro vylepšení vlastností enzymů, jako je vysoká aktivita enzymu v širokém rozpětí teplot za extrémního pH a stabilita vůči oxidačním a chelatačním činidlům, se používají dva koncepčně rozdílné přístupy – racionální design a řízená evoluce. V současnosti je snaha o kombinaci těchto přístupů pro vytvoření enzymů s ještě lepšími vlastnostmi. Stejným krokem je však vytvoření efektivních metod pro selekci vhodných mutantů. Rešerše se na příkladech vylepšení a objevení nových enzymů snaží sledovat současný trend při aplikaci enzymů do pracích prášků.

Klíčová slova: proteasy, amylasy, lipasy, celulasy, prací prášky, řízená evoluce, racionální design

Summary

Špácová M.: Current trends in the application of enzymes in detergent

In the last decades enzymes applied to detergents are continuously improved for their properties. In order to get more effective detergents with the best ratio performance-cost enzymes are changed by methods of protein engineering and recombinant DNA technology and novel enzymes are isolated from various organisms. Ideal enzymes characteristics for application in detergents like activity in broad range of temperature, in extreme pH and stability against oxidative and chelating agents are acquired by two different approaches – rational design and directed evolution. Recently, there are expectations that significantly improved enzymes can be still made by combining both approaches or in combination with screening of metagenome. However, the development of methods for selection of useful mutants from libraries is the crucial step. This review brings an insight into a few examples of recently improved and/or novel enzymes for application in laundry detergent.

Keywords: proteases, lipases, amylases, cellulases, laundry detergent, directed evolution, rational design

MIKROBIÁLNÍ PRODUKCE CHONDROITINU

Zuzana Boháčková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, zuzana.bohackova@vscht.cz

Úvod

O produkci mikrobiálních polysacharidů poslední dobou velmi roste zájem, a to zejména kvůli jejich potenciálnímu využití v biotechnologických aplikacích. Je známo několik patogenních bakterií produkujících kapsulární polysacharidy, které využívají jako ochrannou bariéru vůči nepříznivému vnějšímu prostředí a případným infekčním částicím. Tyto kapsule se většinou skládají z polymerů podobných glykosaminoglykanům. Glykosaminoglykany jsou také nezbytné strukturní komponenty extracelulární hmoty savců a využívají se pro své jedinečné vlastnosti v medicíně, farmacii a kosmetickém průmyslu. Většina komerčně dostupných glykosaminoglykanů je získávána ze živočišných zdrojů, bakterie by tedy byly ideálním doplňkovým zdrojem glykosaminoglykanových derivátů. Dnes se pomocí bakterií vyrábí např. hyalurononová kyselina (*Streptococci*), která se dříve extrahovala z hřebínků slepic. Doposud ale biotechnologická produkce heparinu a chondroitin sulfátu nebyla ve větší škále zavedena. Vysoká poptávka po těchto polymerech a vědecké úsilí však úspěšně vede k vyvíjení fermentačních procesů, které jsou předmětem tohoto článku.

Extracelulární hmota a glykosaminoglykany

Extracelulární hmota je gelovitý materiál, který vyplňuje prostor mezi jednotlivými buňkami v tkáních zvířat a drží je pohromadě. Zároveň je to prostředí, skrze které může mezi buňkami difundovat kyslík a živiny. Strukturně je složena z vláknitých proteinů, jako jsou kolagen, elastin, fibronectin a laminin, a z heteropolysacharidů, zejména glykosaminoglykanů (GAG). Tyto heteropolysacharidy jsou nevětvené polysacharidové řetězce, složené z opakujících se disacharidových jednotek. Aspoň jeden sacharid v jednotce obsahuje aminoskupinu, nejčastěji se tedy jedná o N-acetylglukosamin nebo N-acetylgalaktosamin. Druhý sacharid většinou bývá uronová kyselina. Díky přítomnosti karboxy- nebo sulfo- skupiny na sacharidech nesou glykosaminoglykany velký záporný náboj.

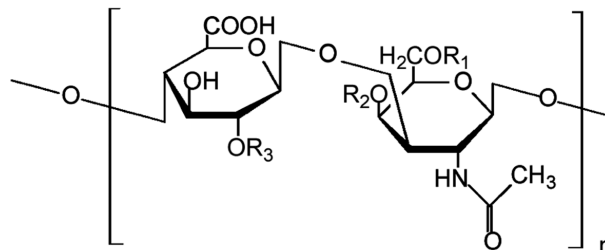
Na základě složení disacharidu, typu vazby a přítomnosti sulfátových skupin se glykosaminoglykany dělí do čtyř základních skupin: 1) hyaluronany, 2) chondroitin sulfát (CS) a dermatan sulfát (DS), 3) heparan sulfát a heparin, 4) keratan sulfát¹.

Chondroitin sulfát

Chondroitin sulfát je všudypřítomný homopolymerní glykosaminoglykan obsahující pouze jeden typ disacharidové jednotky (4GlcA β 1 \rightarrow 3 GalNAc, viz Obr. 1).

In vivo, během polymerace, se na něj pomocí sulfo-transferas naváží sulfo-skupiny a vzniká tak polymer

s O-sulfoskupinami v různých pozicích. Chondroitin sulfáty jsou klasifikovány jako CS-A, B, C, D, E, F, K a O, podle toho, jak jsou sulfatovány. Chondroitin sulfáty extrahované ze zvířecích zdrojů jsou pak většinou směsí těchto různých typů. Tyto rozdíly v sulfataci mohou způsobovat různé účinky a bylo také zkoumáno různé farmaceutické využití CS^{2,3,4}.



Obr. 1: Disacharidová jednotka chondroitin sulfátu.

Hojné zastoupení CS v lidském organismu, u savců a bezobratlých odráží jejich centrální roli v mnoha biologických procesech. Mohou fungovat jako regulátory růstových faktorů, cytokinů, chemokinů, adhesních molekul a lipoproteinů, a to díky interakcím mezi chondroitinovými sacharidovými doménami a ligandy těchto proteinů⁴. K izolaci a analýze bylo použito mnoho různých zdrojů, nicméně komerčně dostupné chondroitin sulfáty pochází většinou z hovězí trachei, nosního septa vepře, kuřecí hrudní chrupavky, žraločí ploutve a z rybí chrupavky.

Hlavní využití chondroitin sulfátu je zejména léčba artritidy, nicméně výzkumy ukázaly, že chondroitin sulfát má potenciální využití coby antivirální a antiinfekční látka, dále ho lze uplatnit v tkáňové regeneraci a tkáňovém inženýrství nebo jako biomarker pro sledování nádorů¹.

Pro vznik kvalitního farmaceutického produktu je velmi důležitá identita a kvalita chondroitin sulfátu. Potenciální kontaminanty zahrnují proteiny ze zdrojového organismu, organická rozpouštědla použítá v „downstream“ procesech a malé organické molekuly nebo adjuvans použítá při purifikaci. Dalším problémem při použití živočišných zdrojů je také risk přenosu virů a prionů, proto by biotechnologická produkce této molekuly byla výhodná.

Kapsulární polysacharidy – biotechnologický zdroj glykosaminoglykanů

Povrchové polysacharidy produkované některými bakteriálními druhy mohou být rozděleny do tří skupin podle toho, jakým způsobem jsou připojeny k buněčnému povrchu a jaké vykazují vlastnosti. Tyto tři skupiny jsou tvořeny: 1) O-antigeny, které jsou sou-

částí lipopolysacharidů (LPS), 2) kapsulárními polysacharidy (CPS) a 3) exopolysacharidy (EPS), které nejsou kovalentně na buňku vázány.

Kapsulární polysacharidy jsou kovalentně vázány k fosfolipidům či lipidům A v buněčných membránách. Typická kapsule je složena z anionických polysacharidů, z různě substituovaných nenabitých polymerů a také občas z proteinů. Kapsulární polysacharidy jsou důležité pro adhezenci k povrchům, pro patogenesi a zejména pro svou schopnost odolávat nepříznivým vnějším vlivům^{5,6}. Dále se také předpokládá, že kapsule chrání před baktericidními účinky bakteriofágů a komplementem⁷.

Někdy je kapsule složena z polymerů podobných glykosaminoglykanům a v těchto případech je obrana imunitního systému pomocí protilátek omezená, jelikož glykosaminoglykany bakterií mají velmi podobnou strukturu jako glykosaminoglykany těla vlastní. Podobnost mezi mikrobiálními kapsulárními polysacharidy a vysoce specialisovanými složkami eukaryotické extracelulární matrix je zajímavá v rámci využití pro biotechnologické aplikace.

Bakterie produkující kapsulární polysacharidy, jejichž hlavní složkou je opakující se disacharidová jednotka chondroitinu, již byly izolovány, ale přesto doposud není zavedena biotechnologická produkce na industriální úrovni. Problémem je např. nízká výtěžnost anebo bezpečnostní otázka při kultivaci velkého množství patogenních mikroorganismů.

Jako příklad může sloužit uropatogenní bakterie *Escherichia coli* O5:K4:H4, která je schopna syntetizovat kapsulární polysacharid, jehož opakující se disacharidová jednotka je složena z GlcA a GalNAc a terminálního furanosového residua fruktosy vázaného přes β vazbu. Tato kostra je podobná nesulfatovanému chondroitinu až na přítomnost residuí fruktosy⁸. Podobně kmeny *Pasteurella multocida* typu F vykazují schopnost produkce nesulfatovaného chondroitinu⁹.

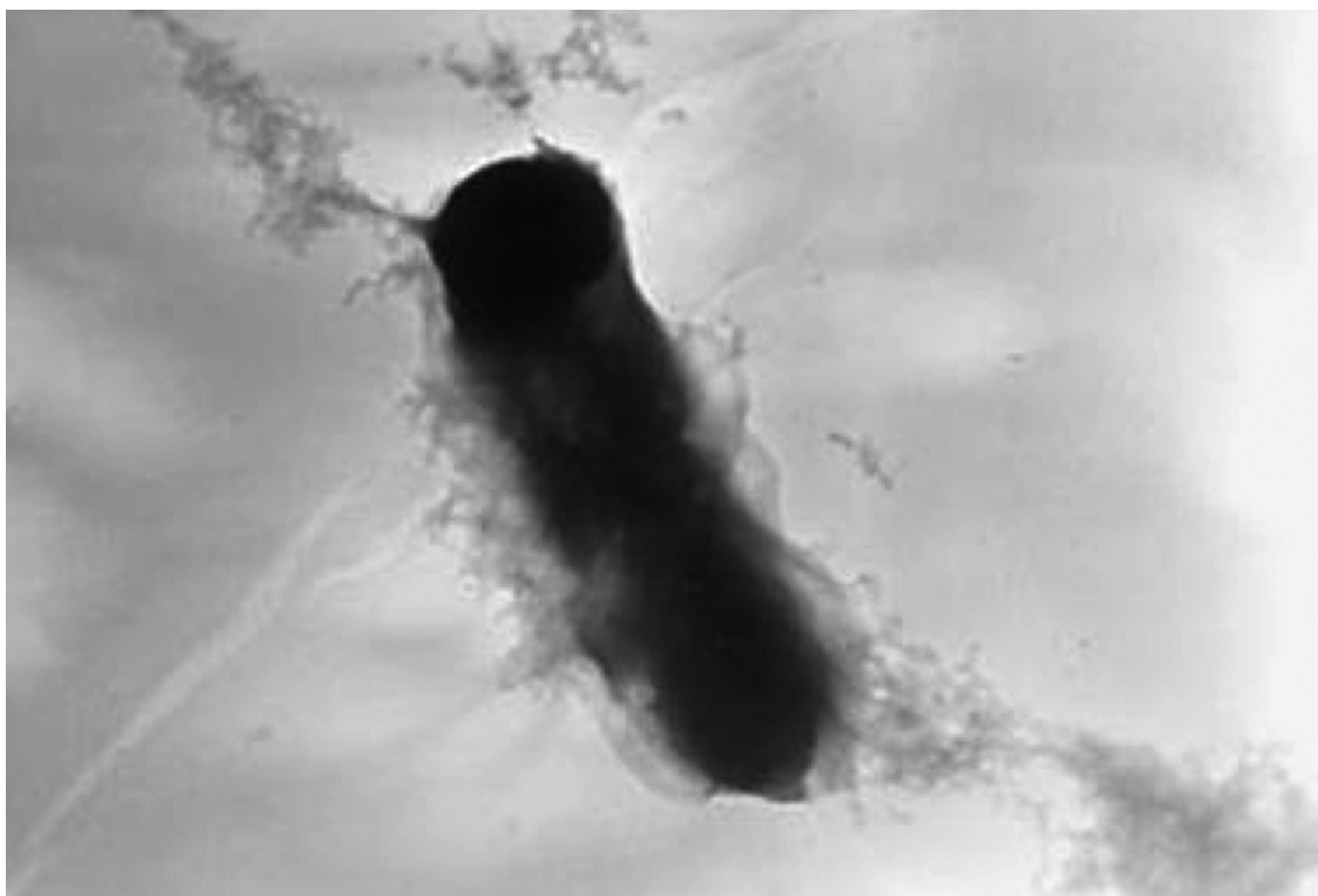
Glykosyltransferasy a enzymatická produkce chondroitinu

De Angelis pracoval na *P. multocida* kmenech produkujících glykosaminoglykany, isoloval a charakterizoval glykosyltransferasy z *P. multocida* typu F a vydal patent na gen pro chondroitinsynthasu a metody s ní spojené¹⁰. Vynález se zabývá *in vitro* použitím purifikované glykosyltransferasy k získání řetězců chondroitinu o specifickém množství residuí¹¹.

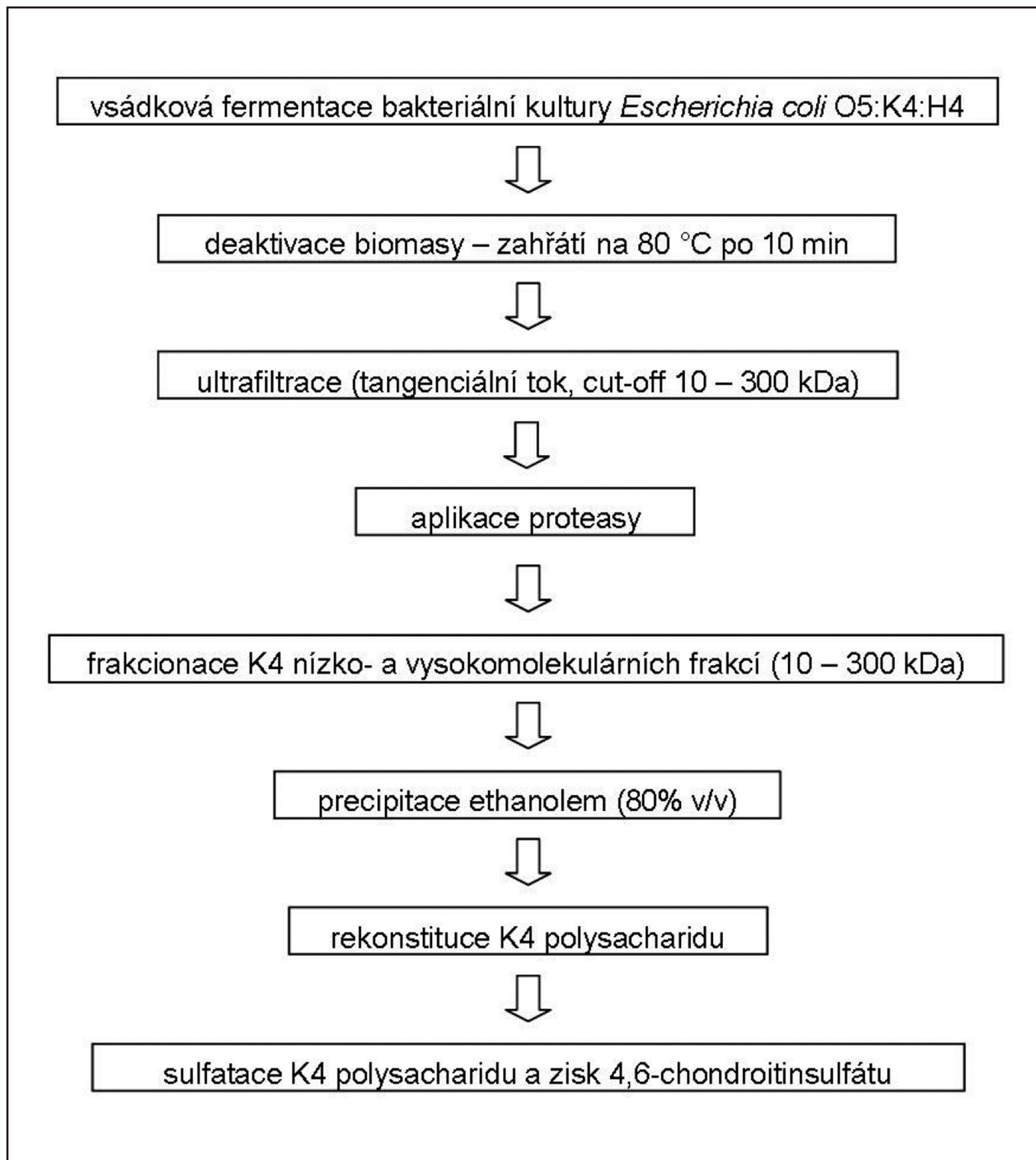
Tento autor také nedávno publikoval metodu k výrobě rekombinantního chondroitinového polymeru pomocí exprese genu pro glykosyltransferasu v rodu *Bacillus*¹².

Fermentační produkce chondroitinu

První práci na téma biotechnologická produkce K4 polysacharidu za využití fermentace byl článek od Manzoniho¹³. Tato práce spočívala ve vsádkové fermentaci mikroorganismu *E. coli* O5:K4:H4 ve 14-ti



Obr. 2: *Escherichia coli* K4 pod transmisním elektronovým mikroskopem, zvětšeno 28000x (lit. 1).



Obr. 3: Produkce chondroitin sulfátu začínající od purifikace kapsulárních polysacharidů získaných fermentací *E. coli* K4 (lit. ¹).

litrovém fermentoru. K růstu bylo použito médium již dříve zmíněné Rodriguezem⁸. Celý proces trval přibližně 24 hod a maximální dosažená koncentrace biomasy byla $2,5 \text{ g}_{\text{cdw}} \text{ L}^{-1}$ při 8 hod experimentálního času. K4 kapsulární polysacharidy se vyskytovaly převážně v supernatantu v koncentraci 300 mg/L, zbytek polysacharidů o koncentraci 32 mg/L byl stále spojen s buněčnou stěnou. K purifikaci kapsulárních polysacharidů ze supernatantu byla použita centrifugace, ultrafiltrace a precipitace. Autoři ověřili, že 70 % extra-

celulárních K4 polysacharidů mělo vysokou molekulovou hmotnost a bylo zadrženo na 300 kDa ultrafiltrační membráně. Zbývající nízkomolekulární produkty byly zachyceny ultrafiltrací na 10kDa membráně.

Podobný proces byl patentován Zoppettim¹⁴. Po fermentaci následovala purifikace, která zahrnovala také chromatografii a materiál, který byl precipitován přebytkem ethanolu, byl použit k chemické sulfataci buďto v pozici 4 nebo 6 GalNAc, který doposud nebyl pozorován v přírodním chondroitin sulfátu¹⁵.

V posledních letech je snaha o vývoj biotechnologické metody, která by umožňovala produkci a purifikaci chondroitinu ve velkém měřítku. Pro tyto účely byl vyzkoušen přirozený producent fruktosilovaného chondroitinu, *E. coli* O5:K4:H4. Hlavní studie se zaměřila nejdříve na charakteristiku fyziologie *E. coli* K4 v experimentu na třepačce, aby stanovila optimální kultivační podmínky pro růst mikroorganismu a korelovala je s produkcí polymeru¹⁶. Bylo navrženo jednoduché a ekonomické médium obsahující glycerol jako hlavní zdroj uhlíku a sojový pepton jako komplexní zdroj dusíku a toto médium se projevilo jako úspěšné v malovládkových a kontinuálních experimentech. Fermentační strategie v kontinuálním módu byly vyvinuty na základě jednoduchého exponenciálního profilu plnění, aby byla zvýšena produkce biomasy a K4

polysacharidu. Byla dosažena maximální hustota buněk $56 \text{ g}_{\text{CWW}} \text{ L}^{-1}$ a titr kapsulárních polysacharidů roven $1,4 \text{ g L}^{-1}$, což 7krát zvýšilo předchozí uváděné výsledky (200 mg L^{-1} , lit.¹³).

V patentové publikaci WO2008/133350 A1 (lit.¹⁷) Suzuki popsal metodu pro produkci chondroitinu, ve které transformoval kmen *E. coli* K5 produkující UDP-GlcA IPTG indukovaným plastidem (pTrcHis) obsahujícím *kfoA* a *kfoC* geny. *KfoA* gen kóduje UDP-glukosa-4-epimerasu a *kfoC* gen chondroitin polymerasu¹⁸. Plasmid s *kfoC* genem byl kultivován v CYG médiu a vykazoval finální výtěžek chondroitinu 52 mg L^{-1} .

Další příklady biotechnologických výrobních procesů k získání chondroitinu nebo CS, buďto založených na enzymatické biotransformaci, nebo na fermentačním procesu, jsou uvedeny v tabulce níže.

Tab. 1: Příklady biotechnologických výrobních procesů k získání chondroitinu nebo chondroitinsulfátu.

mikroorganismus /enzym	produkt	proces	výtěžek	reference
<i>Escherichia coli</i> O5:K4:H4	K4 kapsulární polysacharidy (CPS)	vsádková fermentace (14 l) purifikace: precipitace – Cetavlon opakovaná precipitace 80% EtOH	$80\text{-}90 \text{ mg L}^{-1}$	lit. 8
		vsádková fermentace (14 l) purifikace: ultrafiltrace na 10kDa membráně opakovaná precipitace 80% EtOH	200 mg L^{-1}	lit. 13
		vsádková fermentace	420 mg L^{-1} K4	lit. 19
	chondroitin-4-sulfát, chondroitin-6-sulfát a chondroitin-4,6-disulfát	defruktosilace a selektivní sulfatace	-	lit. 15
	K4 CPS	kontinuální fermentace (2 l)	$1,4 \text{ g L}^{-1}$	lit. 16
<i>Escherichia coli</i> O10:K5:H4	chondroitin	transformace pTrcHis-kfoCA na třepačce	52 mg L^{-1}	lit. 17
<i>Pasteurella multocida</i> chondroitinsynthasa pmCS	desulfátovaný chondroitin	chemoenzymatická synthesa	nezmíněno	lit. 9
	chondroitin	klonování pmCS a <i>in vitro</i> enzymatický test na aktivitu	nezmíněno	lit. 10
		exprese pmCS v <i>Bacillus</i> spp. růst na třepačce (150 ml) purifikace: precipitace - Cetylpyridinium opakovaná precipitace EtOH	nezmíněno	lit. 12
<i>Bacillus natto</i>	chondroitin sulfát	růst na třepačce	$237,7 \text{ mg L}^{-1}$	lit. 20
Chondroitinpolymerasa z <i>E. coli</i> K4	frakce chondroitinu	<i>in vitro</i> elongace exosacharidů chondroitinu pomocí K4 CP	-	lit. 21
lidská chondroitinsynthasa	chondroitin	<i>in vitro</i> elongace CS řetězců	-	lit. 22

Závěr

Chondroitin a jeho deriváty jsou důležitými glykosaminoglykany využívanými v medicíně, farmacii i kosmetickém průmyslu. Zejména pro farmaceutické využití je požadována vysoká kvalita tohoto produktu. Potenciální kontaminanty při výrobě ze živočišných zdrojů zahrnují proteiny ze zdrojového organismu, organická rozpouštědla použitá v přečišťujících procesech a malé organické molekuly

nebo adjuvans použitá při purifikaci. Dalším problémem při použití živočišných zdrojů je také risk přenosu virů a prionů, proto by mikrobiální produkce chondroitinu ve velkém měřítku byla velmi výhodná. Doposud se podařila produkce chondroitinu a jeho derivátů za využití bakteriálních kmenů *E. coli* O5:K4:H4 a *Pasteurella multocida* v laboratorním měřítku, převod technologie do průmyslového měřítku je ve vývoji.

Literatura:

1. Schiraldi C, Cimini D, De Rosa M: *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 1209 (2010).
2. Hiraoka N, Misra A, Belot F, Hindsgaul O, Fukuda M: *Glycobiology* 11, 495 (2001).
3. Lauder RM: *Compl Ther Med* 17, 56 (2009).
4. Malavaki C, Mizumoto S, Karamanos N, Sugahara K: *Connect Tissue Res* 49, 133 (2008).
5. Roberts IS: *Annu Rev Microbiol* 50, 285 (1996).
6. Whitfield C, Roberts IS: *Mol Microbiol* 31, 1307 (1999).
7. De Angelis PL, Padgett-McCue AJ: *J Biol Chem* 275, 24124 (2000).
8. Rodriguez ML, Jann B, Jann K: *Eur J Biochem* 177, 117 (1988).
9. De Angelis PL, Gunay NS, Toida T, Mao W, Linhardt RJ: *Car Res* 337, 1547 (2002).
10. De Angelis PL: United States Patent Application 20030104601 (2003).
11. De Angelis PL: United States Patent 7569386 (2009).
12. De Angelis PL: United States Patent 7642071 B2 (2010).
13. Manzoni M, Bergomi S, Molinari F, Cavazzoni V: *Biotechnol Lett* 18, 383 (1996).
14. Zoppetti G, Pasqua O, Cipolletti G: United States Patent 6288044 (2001).
15. Zoppetti G, Oreste P: United States Patent 6777398 (2004).
16. Cimini D, Restaino OF, Catapano A, De Rosa M, Schiraldi C: *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1779 (2010).
17. Suzuki K: PCT WO 2008/13350 A1 (2008).
18. Ninomiya T, Sugiura N, Tawada A, Sugimoto K, Watanabe H, Kimata K: *J Biol Chem* 277, 21567 (2002).
19. Petrucci F, Zoppetti G, Oreste P, Cipolletti G: WO0102597 A1 (2001).
20. Amano Enzyme USA, Ltd.: PCT WO2009/149155 A1 (2009).
21. Sugiugura N, Koji K (2009) Novel process for preparation of chondroitin fraction. United States Patent 2009/0155851.
22. Narimatsu H, Kimata K, Yada T, Sato T, Goto M (2007) Chondroitin synthase and nucleic acid encoding the enzyme. United States Patent 7273729.

Souhrn

Boháčková Z.: Mikrobiální produkce chondroitinu

Chondroitin sulfát je všudypřítomný homopolymerní glykosaminoglykan obsahující pouze jeden typ disacharidové jednotky 4GlcA β 1 \rightarrow 3 GalNAc. Glykosaminoglykany jako takové jsou nezbytné strukturální komponenty extracelulární hmoty savců a využívají se pro své jedinečné vlastnosti v medicíně, farmacii a kosmetickém průmyslu. Většina komerčně dostupných glykosaminoglykanů je doposud získávána ze živočišných zdrojů, bakterie by tedy byly ideálním doplňkovým zdrojem glykosaminoglykanových derivátů. Biotechnologická produkce heparinu a chondroitin sulfátu ale doposud nebyla ve větší škále zavedena. Vysoká poptávka po těchto polymerech a vědecké úsilí však úspěšně vede k vyvíjení těchto fermentačních procesů.

Klíčová slova: chondroitin sulfát, glykosaminoglykan

Summary

Boháčková Z.: Microbial production of chondroitin

Chondroitin sulphate is a ubiquitous homopolymeric glycosaminoglycan containing only one type of disaccharide unit 4GlcA β 1 \rightarrow 3 GalNAc. Glycosaminoglycans as such are inevitable structural components of mammalian extracellular matrix and for their exceptional properties they are being used in medicine, pharmacy and cosmetic industry. Majority of commercially available glycosaminoglycans is still recovered from animal sources; therefore bacteria would be an ideal additional source of glycosaminoglycan derivatives. Despite this, biotechnological production of heparin and chondroitin sulphate has not been implemented on bigger scale yet. However, high demand after these polymers and scientific effort are successfully leading to development of these fermentation processes.

Keywords: chondroitin sulphate, glycosaminoglycan

PŘEHLED PŘÍSTUPŮ K OVLIVNĚNÍ VLASTNOSTÍ ENZYMŮ

Iva Hlaváčková

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, iva.hlavackova@vscht.cz

Úvod

Enzymy jsou jako biokatalyzátory využívány v mnoha průmyslových odvětvích a své místo mají i v medicínských aplikacích. V průmyslových procesech zvyšují konversi a kontrolovatelnost reakcí a omezují množství vedlejších produktů, snižují spotřebu energie a dovolují využití obnovitelných zdrojů. Použití enzymových technologií má však svá omezení, a to nejen proto, že reakce úspěšně probíhající ve zkumavce vypadá zcela jinak v průmyslovém měřítku. Na enzymy jsou kladeny vysoké nároky z hlediska jejich stability (teplotní, v rozpouštědlech a při skladování), katalytické aktivity a specifity. Pro nové aplikace jsou mnohdy žádoucí enzymy s novými vlastnostmi, jako je jiná substrátová specifita, schopnost katalyzovat jiné reakce nebo odlišné pH optimum. Nejdéle používaným způsobem zvýšení stability enzymů je imobilizace. Dále lze použít stabilizační činidla nebo kovalentní modifikace. Vlastnosti enzymů lze také částečně ovlivnit změnou podmínek, v nichž probíhá reakce, může to být např. změna rozpouštědla či tlaku. Novějšími metodami jsou rekombinantní techniky využívající postupy racionální nebo kombinatorické.

Stabilizace enzymů pomocí stabilizačních činidel

Stabilitu rozpustných enzymů lze zvýšit přidáním sacharidů či polymerů, které svou přítomností znevýhodňují rozbalování proteinu a tím stabilizují jeho terciární (i kvartérní) strukturu. Dále je možné použít přídatky sloučenin interagujících s vodou (glycerol) nebo dalších sloučenin (ionty a iontové sloučeniny).¹

Stabilizace enzymů pomocí kovalentních modifikací

Často používanými modifikačními činidly jsou sloučeniny na bázi sacharidů. Vnesený sacharidový řetězec umožňuje tvorbu nových vazeb, intermolekulárních i intramolekulárních a tímto způsobem zřejmě cukerné zbytky v glykoproteinech zvyšují stabilitu molekuly vůči teplotě, proteolýze, a chemickým denaturačním činidlům.^{2,3} Modifikace enzymu může být prováděna monosacharidy (glukosa, fruktosa), redukujícími disacharidy (maltosa, laktosa), ale i polysacharidy (škrob, celulóza). Polysacharidy mají na stabilizaci enzymu větší účinek než monosacharidy nebo disacharidy. V případě, že se jako modifikační činidlo použije bifunkční sloučenina (glutaraldehyd, bisdiazobenzidín, hexamethylen diisokyanát), dojde k prokřížení molekul enzymu a tím k jeho zesílení. Prokřížení enzymu vede k vyšší termostabilitě a zvýšení aktivity v nepolárních organických rozpouštědlech. Tímto způsobem lze zvýšit i stabilitu vícejednotkových enzymů.¹

Imobilizace a stabilizace enzymů

Při imobilizaci je enzym uzavřen do omezené oblasti při současném zachování jeho aktivity. Ve většině případů jsou imobilizací příznivě ovlivněny vlastnosti enzymu jako je termostabilita, stabilita v širším spektru hodnot pH a stabilita při skladování. V případě vícejednotkových enzymů se snižuje riziko disociace podjednotek. Enzym může být v imobilizované formě použit opakovaně a kontinuálně. Dalším přínosem imobilizace je snadná izolace a purifikace produktu enzymové reakce. Přestože s sebou imobilizace přináší řadu výhod, je nutné zvážit i některá negativa spojená s touto technikou. Při imobilizaci obvykle dochází k částečné ztrátě katalytické aktivity a snížení afinity enzymu k substrátu.⁴

Velmi často se imobilizace provádí pomocí vazby na pevné nosiče, které mohou být porézní i neporézní. Nejstarší a nejjednodušší metodou imobilizace je fyzikální adsorpce, při níž ale často dochází k uvolňování enzymů. Lepší výsledky jsou při vazbě enzymu na ionexy, kde je však nutná volba optimálního pH pro navázání. Výhodou nekovalentního způsobu imobilizace je zachování vysoké aktivity enzymu a možnost opětovného použití nosiče. Nejpevněji je enzym na nosič navázán v případě kovalentní imobilizace, která je založena na chemické reakci funkčních skupin příslušného nosiče a proteinu. V případě glykoproteinů mohou být k ukotvení využity také sacharidové řetězce. Nevýhodou kovalentní imobilizace je riziko snížení katalytické aktivity, jako důsledek reakce aminokyselinového zbytku, který se nachází v aktivním místě. Toto riziko lze však odstranit imobilizováním enzymu pomocí protilátky proti němu nebo pomocí místně cílené mutagenese.^{5,6}

Enzym také může být zabudován do gelu (polyakrylamid, agarosa), do polopropustné membrány (dutá vlákna, ultrafiltrační membrány) nebo uchován v podobě kapsule obalené vrstvou polymerního materiálu. Při imobilizaci enzymu do kapsul nedochází k žádným chemickým interakcím mezi enzymem a polymerem, proto je metoda vhodná pro imobilizaci citlivých proteinů. Výhodou této metody je také možnost imobilizace více enzymů nebo celých buněk či jejich částí do jedné kapsule.⁷ Enkapsulací do polymeru nebo do magnetické vrstvy lze vytvořit i nanočástice obsahující právě jednu molekulu enzymu. Vrstva obklopující enzym je velmi tenká a porézní, proto nebrání přístupu substrátu do aktivního místa ani oddisociování produktu.⁸

Enzymy v organických rozpouštědlech

Pro enzymové reakce je přirozené vodné prostředí, ale některé substráty se ve vodě rozpouští jen velmi

špatně nebo vůbec. Tento problém lze vyřešit použitím nevodných prostředí nebo směsných (voda+organické rozpouštědlo). V organických rozpouštědlech však dochází ke ztrátě enzymové aktivity až o několik řádů oproti vodě. Aktivitu enzymů lze v těchto rozpouštědlech zvýšit, pokud při lyofilizaci enzymu přidáme kosmotropní činidlo (např. KCl) nebo jejich kombinaci. Kosmotropní soli interagují s vodou a zvyšují hydrataci proteinu, přídavek těchto solí nejspíše zvyšuje počet kataliticky aktivních míst. Dalším typem médií jsou nevodná polární rozpouštědla. Typicky obsahují 1-alkyl-3-methylimidazolové soli v PF₆ nebo BF₄, jsou tekutá v širokém rozmezí teplot a rozpouští velké množství sloučenin. V těchto rozpouštědlech nedochází k tak velké ztrátě enzymové aktivity jako v nepolárních rozpouštědlech, v některých případech dochází ke stabilizaci enzymu nebo také zvýšení enantioselektivity.⁹

Vysoký tlak jako stabilizační činidlo

Ve většině případů vysoký tlak enzymy inaktivuje. Jsou však případy, kdy je tomu naopak a vysoký tlak může enzymy stabilizovat či zvýšit jejich aktivitu. Pravděpodobně se tak děje díky změně reakčního mechanismu, přímé změně ve struktuře enzymu nebo vlivem změny fyzikálních vlastností (viskozita, pH) rozpouštědla nebo substrátu. Vysoký tlak může stabilizovat jednoduché enzymy i enzymy s více podjednotkami.¹⁰

Racionální rekombinantní techniky

V případě, že je známa struktura enzymu, reakční mechanismus katalýzy a případně mechanismus sbalování, lze navrhnout vhodné modifikace, genetické či chemické, které povedou ke zlepšení některých vlastností enzymu. Existuje několik strategií návrhu vhodné modifikace pro stabilizaci enzymu, jednou z nich je rigi-

difikace struktury. Může se jí docílit například vkládáním disulfidových nebo solných můstků a optimalizací helixů. Pomocí cílené mutagenese lze získat i enzymy s vyšší stabilitou vůči teplotě nebo stabilní při jiném pH a stabilizovat vícepodjednotkové enzymy.¹¹ Jiným možným postupem pro získání nového termostabilního enzymu je vytvoření chimerního proteinu z homologních enzymů s různými teplotními optimy.¹²

Kombinatorické rekombinantní techniky

Kombinatorické techniky využívají tzv. řízené evoluce, jejímž myšlenkovým základem je napodobení přírodní evoluce. I když se jedná o napodobení přírodního děje, jsou produkovány molekuly, které by přirozenou evolucí vzniknout nemohly, jsou však vhodnější pro průmyslové aplikace. Nejdříve se vytvoří velká knihovna mutantů za cíleného využití procesů způsobujících náhodné změny genetické informace, může se jednat o působení chemických či fyzikálních mutagenů, error-prone PCR, DNA shuffling nebo použití kmenů s oslabenými opravnými mechanismy. Následně se provede selekce úspěšných variant a jejich namnožení. Většinou celý proces proběhne vícekrát, vždy s mutanty vybranými v předchozím cyklu.

Závěr

Cílem tohoto textu bylo stručné seznámení čtenáře se současnými metodami ovlivnění vlastností enzymů. Kromě starších technik založených na stabilizaci enzymu (imobilizace, stabilizační činidla, kovalentní modifikace) a optimalizace média pro reakce se stále více rozvíjejí nové metody založené na použití rekombinantních technik. Potenciál těchto rekombinantních metod je hlavně v možnosti získání nových enzymových vlastností.

Literatura

1. Fernandez-Lafuente R: *Enzyme Microb Technol* 45, 405 (2009).
2. Schmid R: *Adv Biochem Eng* 12, 41 (1979).
3. Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Rodríguez V, et al.: *Enzyme Microb Technol* 17, 517 (1995).
4. Bryjak J: *Biochem Eng J* 16, 347 (2003).
5. Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, et al.: *Enzyme Microb Technol* 40, 1451 (2007).
6. Hernandez K, Fernandez-Lafuente R: *Enzyme Microb Technol* 48, 107 (2011).
7. Chang TMS, McIntosh FC, Mason FG: *Can J Physiol Pharmacol* 44, 115 (1966).
8. Hegedus I, Nagy E: *Chem Eng Sci* 64, 1053 (2009).
9. Panke S, Wuolts MG: *Curr Opin Biotechnol* 13, 111 (2002).
10. Eisenmenger MJ, Reyes-De-Corcuera JI: *Enzyme Microb Technol* 45, 331 (2009).
11. Eijsink VGH, Bjrk A, Gaseidnes S, et al.: *J Biotechnol* 113, 105 (2004).
12. Kamondi S, Szilágyi A, Barna L, et al.: *Biochem Biophys Res Commun* 374, 725 (2008).

Souhrn

Hlaváčková I.: Přehled přístupů k ovlivnění vlastností enzymů

Enzymy jsou jako biokatalyzátory s prospěchem využívány v mnoha průmyslových odvětvích. Použití enzymových technologií je omezeno nízkou stabilitou enzymů při technologických výrobních procesech. Na enzymy jsou kladeny vysoké nároky z hlediska jejich stability (při skladování, teplotní a v rozpouštědlech), katalytické aktivity a specifity. Často jsou potřeba enzymy s novými vlastnostmi. Nejdéle používaným způsobem zvýšení stability enzymů je imobilizace, dále lze použít stabilizační činidla nebo kovalentní modifikace. Vlastnosti enzymů lze také částečně ovlivnit změnou podmínek, v nichž probíhá reakce, může to být např. změna rozpouštědla či tlaku. Novějšími metodami umožňujícími získat enzymy s novými vlastnostmi jsou rekombinantní techniky využívající postupy racionální nebo kombinatorické.

Klíčová slova: enzymy, enzymové inženýrství, imobilizace, rekombinantní techniky

Summary

Hlaváčková I.: An overview of approaches to influence the properties of enzymes

Enzymes as biocatalysts are used with benefit in many industrial processes. The use of enzyme technology is limited by the low stability of enzymes in technological production processes. The technological processes are demanding in terms of enzyme stability (during storage, temperature stability and stability in organic solvents), catalytic activity and specificity. There are often needs for enzymes with new properties. The longest used way to enhance the stability of the enzyme is immobilization, also the stabilizing agents can be used, or covalent modifications. Properties of enzymes may also be partially affected by changing conditions in which the reaction takes place, a solvent or pressure can be changed for example. Newer methods which allow production of enzymes with new properties are recombinant techniques using rational and combinatorial methods.

Keywords: enzymes, enzyme engineering, immobilization, recombinant technology

O B S A H

Úvodem	73
Pokorná D., Zábbranská J.: 1st World Congress of Environmental Biotechnology-2011 (WCEB-2011) – dojmy a poznatky	74
Glasová E.: Využití β-karotenu v organismu	76
Linhová M.: Mikrobiální produkce 1-butanolu	78
Špácová M.: Současné trendy aplikace enzymů do pracích prášků a čisticích prostředků	85
Boháčková Z.: Mikrobiální produkce chondroitinu	89
Hlaváčková I.: Přehled přístupů k ovlivnění vlastností enzymů	94

C O N T E N T S

Editorial	73
Pokorná D., Zábbranská J.: 1st World Congress of Environmental Biotechnology-2011 (WCEB-2011)	74
Glasová E.: Use of β-carotene in the organism	76
Linhová M.: Microbial production of 1-butanol	78
Špácová M.: Current trends in the application of enzymes in detergent	85
Boháčková Z.: Microbial production of chondroitin	89
Hlaváčková I.: An overview of approaches to influence the properties of enzymes	94

POKYNY PRO AUTORY

Rukopisy je třeba zaslat v elektronické formě e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Rukopis musí být opatřen plným jménem autora, názvem jeho pracoviště a e-mailovou adresou autora.

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, klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova.

Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu práce, a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Seznam citací musí být uveden v závěru článku. Zkratky časopisů se používají podle Chemical Abstract Service Source Index.

Příklad: Guest JD, Rao A, Olson L, et al.: *J.Biochem.* 148, 502 (1997).

Novák Z.: Diplomová práce. VŠCHT, Praha 2008.

Lowestein K A: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 1979.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Lipidomics>, staženo 3. září 1999.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi. Každý obrázek musí být opatřen legendou umístěnou pod obrázkem, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky zasílejte **zvlášť** v některém z běžných formátů např. TIF, JPG, CDR, EPS.

Technické parametry: typ písma Arial velikost 11, řádkování jednoduché.

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

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností