

---

# B I P R O S P E C T

---

Sedmnáctý ročník  
Číslo 4/2007

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**

RNDr. Tomislav Barth, DrSc.  
ÚOCHB AVČR, Flemingovo n. 2, 166 10 Praha 6  
(Editor)

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

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

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  
(Editor in Chief)

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

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

---

# B I P R O S P E C T

17<sup>th</sup> Volume  
No. 4/2007

---

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:

Ladislav Fukal, Ph.D. (editor in chief)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 445 137

e-mail: fukall@vscht.cz

# ÚVODEM

Vážení přátelé,

blíží se konec roku 2007 a tak mi dovoluji, abych připomenul některé otázky, které zajímají nejen biotechnology, ale i širokou veřejnost. V oblasti genového inženýrství jsou trvale na pořadu dne transgenní plodiny, podle naší a evropské legislativy zahrnované do GMO (geneticky modifikovaných organismů) a podle Cartaginského protokolu řazené mezi „živé modifikované organismy“ (LMO – living modified organisms). Na jedné straně dochází v některých zemích k jejich širokému uplatnění a na druhé straně jsou rozvoji jejich pěstování kladeny často neodůvodněné překážky. Osevní plochy transgenních plodin přesáhly koncem r. 2006 100 milionů ha, přičemž plná polovina z této plochy připadá na zemědělství USA a značný podíl lze připsat i dalším státům amerického kontinentu (zejména pak Argentině, Brazílii a Kanadě). Podíl evropských států na osevní ploše transgenních plodin je stále minimální. Situace v Evropě se v posledních letech trochu zlepšila. I u nás bylo povoleno komerční pěstování transgenní kukuřice MON 810, která se pěstovala poprvé v r. 2005 na 270 ha a v letošním roce již asi na 5000 ha. O rok později se tato kukuřice začala pěstovat i na Slovensku. Tato odrůda „Bt-kukuřice“ je odolná proti napadení nebezpečným škůdcem obalečem kukuřičným, který se v poslední době velmi rozšířil. Rezistence proti tomuto škůdci je vyvolána tím, že vnesený gen z mikroorganismu *Bacillus thuringiensis* umožňuje v rostlině syntézu proteinu, který se pro zmíněného škůdce stává v jeho zažívacím traktu toxickým (proto se často hovoří o „Bt-toxinu“ i když protein sám o sobě toxický není) a tím jej ničí. Tento protein je používán v zemědělství ve formě „insekticidního postřiku“ již od r. 1938, kdy byl komerční Bt-preparát uveden na trh Francie. Preparáty Bt-proteinu jsou běžně používány v ekologickém zemědělství a jejich spotřeba se neustále zvyšuje vzhledem k expansi ekologického zemědělství v Evropě i k rozšiřující se hrozbě napadení kukuřičných polí obalečem kukuřičným. Při postřiku pěstebních ploch roztokem Bt-preparátu se aplikuje mnohem více této látky než je syntetizováno v geneticky modifikované rostlině. Je tedy těžko pochopitelné, že proti transgenní Bt-plodině jsou vznášeny výhrady. Evropský komisař pro životní prostředí Stavros Dimas připravuje pozastavit povolení dalších dvou odrůd Bt-kukuřice s odůvodněním, že uvolněný Bt-protein může mít nežádoucí vliv na některé ve vodě žijící organismy. Proti tomuto návrhu se ostře postavila Evropská federace biotechnologií dopisem jejího prezidenta Profesora Marca Van Montagu. V dopise se uvádí řada pádných argumentů, např. že 63 recenzovaných publikací prokázalo, že Bt-protein se nehromadí v půdě a neovlivňuje necílové organismy. To však nelze tvrdit při použití pesticidů. V r. 2006 byla celosvětově Bt-kukuřice pěstována na 25,2 milionech hektarů, v Evropě pak na 62 187 ha. Ve Španělsku je Bt-kukuřice pěstována již 9 let a přednosti tohoto pěstování byly jasně doloženy. Jedná se o zvýšené výnosy minimálně o 10 % (tomu odpovídá zvýšení příjmu španělských farmářů o 15 milionů EUR) a zvýšení jakosti představované snížením výskytu plísňových mykotoxinů, které jsou velmi rizikové pro zdraví lidí a zvířat. Polní pokusy v Itálii ukázaly ještě lepší výsledky. Zkušenosti našich farmářů lze nalézt na webu Ministerstva zemědělství ČR ([www.mze.cz](http://www.mze.cz)). Česká repub-

lika podporuje evropský koncept koexistence tří zemědělských systémů, t.j. konvenčního, ekologického a biotechnologického (t.j. pěstujícího transgenní plodiny). Tato koexistence je možná a nutná. Touto problematikou se zabývala nedávná konference ve Španělsku.

Problém ochrany rostlin může být řešen nejen vkládáním vhodných cizích genů, ale také pomocí techniky „uspávání genů“ (gene silencing) známé též pod termínem RNA interference (RNAi). Za tento objev byla v minulém roce udělena Nobelova cena. Chceme-li tedy plodinu chránit proti škůdci modifikujeme ji tak, že v ní vyvoláme produkci dvouvláknové RNA (dsRNA), která má sekvenci komplementární cílenému genu ve škodlivém hmyzu (zárok je tedy vysoce specifický). Když hmyz sežere rostlinu s dsRNA vyvolá to u hmyzu RNA interferenci. Pracovníci firmy Monsanto již připravili takovou transgenní kukuřici, která produkuje dsRNA, která vyvolává RNAi u obaleče kukuřičného.

Dalším horkým biotechnologickým tématem je otázka biopaliv („bio-lihu“ a bio-nafty). Hledají se nové zdroje pro jejich výrobu, které by neodčerpávaly (alespoň v takové míře) zemědělské a potravinářské suroviny. Tak např. kukuřice produkovaná v USA se spotřebovává z 50 % na krmení, z 20 % na export, z 10 % pro lidskou výživu a průmyslové zpracování a z 20 % na výrobu (bio)ethanolu. Kdyby se měla v r. 2017 produkce ethanolu zvýšit na 35 miliard galonů (cíl vytyčený prezidentem Bushem) byla by na to potřeba veškerá současná produkce kukuřice v USA. Proto se usilovně připravují technologie využívající k produkci ethanolu dřeva a trávy. V plánu je šest takových vládou podporovaných podniků z nichž první, s kapacitou 40 milionů galonů ethanolu byl právě otevřen v Sopertonu, Georgie. Další perspektivní surovinou pro výrobu biopaliv mají být řasy. Výroba paliv z nich není stále ekonomická, ale výzkum pokračuje v tom směru, aby se zvýšil obsah oleje v řasách a podpořila se rychlost jejich růstu zvýšením intenzity světla a koncentrace CO<sub>2</sub> v okolním prostředí. Výzkum je nadále podporován společností Chevron.

O některých dalších aktuálních biotechnologických otázkách se zmíníme zase příště. Teď mi zbývá uvést, že v tomto letošním čtvrtém čísle Vám poskytneme informaci p. Ing. Roudné z Ministerstva životního prostředí o tom, jak Česká republika v souladu s mezinárodními normami vybudovala systém biologické bezpečnosti a stále jej upevňuje. V odborných článkách se opět zabýváme tématy z různých oblastí biotechnologie. Rostlinná biotechnologie je zastoupena článkem o genetické modulační etylénu v rostlinách. V medicínské oblasti věnujeme pozornost metabolickému syndromu, v oblasti životního prostředí biologické degradaci skládkového plynu a biodegradaci nitrotoluenů.

**Závěrem bych rád poděkoval všem čtenářům našeho bulletinu za přízeň a popřál jim příjemné prožití vánočních svátků a mnoho úspěchů v soukromém i profesním životě po celý příští rok 2008. Těšíme se na další spolupráci.**

Váš  
Jan Káš

# PROJEKTY ZAMĚŘENÉ NA BIOLOGICKOU BEZPEČNOST

V období let 2002 – 2004 probíhal v České republice projekt *Opatření k zajištění biologické bezpečnosti (Development of the National Biosafety Framework for the Czech Republic)*. Financován byl z Globálního fondu životního prostředí (GEF) a realizován ve spolupráci s Programem OSN pro životní prostředí (UNEP). Cílem bylo zajistit vnitrostátní rámec opatření pro plnění mezinárodní smlouvy o zacházení a přeshraničním přenosu živých modifikovaných organismů – Cartagenského protokolu o biologické bezpečnosti (CPB), přijatého v lednu r. 2000. Na uvedený projekt navázala implementační fáze s názvem *Podpora opatření k zajištění biologické bezpečnosti v České republice (Support for the Implementation of the Draft National Biosafety Framework for the Czech Republic)*, plánovaná pro období let 2006 – 2010. Tento probíhající projekt je zaměřen na konkrétní akce a opatření v rámci pěti oblastí: politiky biologické bezpečnosti, legislativy, administrativy a vyřizování žádostí o povolení užívání geneticky modifikovaných organismů, monitorování a inspekce/kontroly přijatých opatření k zajištění biologické bezpečnosti, informování i zajištění účasti veřejnosti. Návrh projektu zahrnuje konkrétní akce pro období čtyř let, včetně zahrnutí zásad biologické bezpečnosti do hlavních strategických dokumentů ČR, účasti na odpovídajících jednáních mezinárodních a regionálních, změny regulačního režimu, podpory činnosti České komise pro využívání geneticky modifikovaných organismů a jejich produktů (ustavena při Ministerstvu životního prostředí jako poradní orgán), zlepšení technického vybavení zodpovědných pracovišť, včetně laboratoří pro detekci a kontrolu, organizování seminářů, rozšiřování informací (webová stránka Ministerstva životního prostředí, publikace, media) a další související aktivity. Navrhovaná opatření zahrnují všechny resorty, jichž se otázky biologické bezpečnosti dotýkají. Implementační agenturou projektu je Ministerstvo životního prostředí. Pro řízení projektu a kontakt s příslušnými dotčenými subjekty je vytvořen Koordinační výbor (National Coordinating Committee – NCC), složený ze zástupců zodpovědných orgánů v oblasti biologické bezpečnosti (z resortů Ministerstva životního prostředí, Ministerstva zemědělství, Ministerstva zdravotnictví, Ministerstva financí prostřednictvím Generálního ředitelství cel), universit, resortních odborných pracovišť a zástupce nevládních organizací – Greenpeace.

Doplňujícím projektem je projekt *Budování kapacit pro efektivní účast v informačním systému pro biologickou bezpečnost (Building Capacity for Effective Participation in the Biosafety Clearing-House)*. Jeho cílem je pomoci ČR v napojení na informační systém (Biosafety Clearing House – BCH) Cartagenského protokolu o biologické bezpečnosti. Tento projekt je plánován na období 2006 – 2008. Ustave-

na byla Řídící skupina (BCH Task Force) složená ze zástupců zainteresovaných orgánů a institucí (Ministerstvo životního prostředí, CENIA – Česká informační agentura životního prostředí, Ministerstvo zemědělství, Ministerstvo zdravotnictví). Administrativně projekt zajišťuje skupina pověřená řízením hlavního projektu *Podpora plnění opatření k zajištění biologické bezpečnosti v České republice*.

V rámci uvedených projektů jsou organizovány semináře – jednak pro odborníky, ale též pro širší veřejnost, pracovníky státní správy a pedagogy. Vydáno bylo několik publikací vztahujících se k dané tématice a sborníky ze seminářů. Informace o některých z nich lze nalézt na webové stránce Ministerstva životního prostředí, v tištěné podobě je možno je získat na Ministerstvu životního prostředí – odboru rozvojové a projektové spolupráce.

Publikace vydané v rámci projektů a vztahující se k biologické bezpečnosti:

Demnerová K., Pazlarová J. (2003): **Geneticky modifikované mikroorganismy**. Ministerstvo životního prostředí, Praha, 18 pp.

Doubková Z. (Ed.) (2003): **Geneticky modifikované organismy. Otázky spojené s jejich vznikem a využíváním**. Ministerstvo životního prostředí, Praha, ISBN 80-7212-259-2, 38 pp.

Káš J., Roudná M. (Ed.) (2004): **National Biosafety Framework for the Czech Republic**. Ministry of the Environment, Prague, ISBN 80-7212-281-9, 36 pp. (Závěrečná zpráva projektu – anglicky)

Káš J. (Ed.) (2004): **Geneticky modifikované organismy – současnost a perspektivy**. Vysoká škola chemicko-technologická ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí, Praha, ISBN 80-86313-13-1, 67 pp.

Roudná M. (2003): **Biologická rozmanitost a otázky biologické bezpečnosti**. Ministerstvo životního prostředí, Praha, ISBN 80-7212-275-4, 66 pp.

Roudná M. et al. (2004): **Genetické zdroje rostlin a živočichů**. Ministerstvo životního prostředí, Praha, ISBN 80-7212-312-2, 60 pp.

Roudná M., Dotlačil L. et al. (2007): **Genetické zdroje – význam, využívání a ochrana**. Ministerstvo životního prostředí, Praha, ISBN 978-80-7212-469-5, 28 pp. + Annex 98 pp.

Tošovská E. (2006): **Ochrana biologické rozmanitosti, patentní ochrana a odpovědnost za škody**. Ministerstvo životního prostředí, Praha, 66 pp.

**Přehled termínů z oblasti genetických zdrojů a biologické bezpečnosti** (česko-anglický, definice, rejstřík anglicko-český). **Sborníky ze seminářů**.

Milena Roudná, Ministerstvo životního prostředí

## Pro všechny zájemce o imunochemické techniky

Vydavatelství VŠCHT v Praze vydalo pozoruhodnou publikaci **J. Daussant a F.X. Desvaux: Introduction to Immunochemical Techniques for Medical Diagnosis, Food Quality Control and Environmental Testing** (Praha 2007, ISBN 978-80-7080-641-8).

Publikace je primárně určena pro výuku domácích i zahraničních studentů, ale je samozřejmě vhodná pro všechny zájemce o imunochemické techniky, zejména z oblastí medicíny, potravinářství, chemie, zemědělství a životního prostředí. Obsah publikace je rozdělen do tří částí: Základy imunochemie, Principy imunochemických technik a Aplikace imunochemických metod v lékařské diagnostice, kontrole kvality potravin a kontrole životního prostředí. První část se zabývá historií imunochemie, popisem struktury, vlastností a interakcí antigenů a protilátek, buněčnými a molekulárními aspekty tvorby protilátek, jakož i technikami přípravy polyklonálních, monoklonálních i rekombinantních protilátek a samozřejmě i způsoby použití jednotlivých typů protilátek v imunochemických technikách. V druhé části publikace jsou imunochemické techniky členěny na tři velké skupiny, a to na techniky založené na primární interakci antigenů a protilátek (včetně RIA a EIA), techniky založené na reverzibilitě tvorby komplexu antigen-protilátka (immunoafinitní chromatografie) a konečně na techniky využívající sekundární efektů při tvorbě komplexu antigen-protilátka (imunoprecipitace, immunoaglutinace a tvorba komplementu). Třetí část se zabývá výčtem nejvýznamějších aplikací imunochemických technik ve vyznačených oblastech. Text vyniká přesností formulací, brilantním vysvětlením všech základních imunochemických termínů a excelentními barevnými obrázky. Je to plod mnohaleté pedagogické činnosti profesora Daussanta a celoživotních osobních zkušeností z imunochemických laboratoří, které se

začaly formovat v Pasteurově ústavu v oddělení objevitele imuno-elektroforezy profesora Grabara. Prof. Daussant vedl řadu let kursy nejen ve Francii, ale také v Čechách, na Slovensku a v Polsku. Přednášení imunochemie je jeho hobby a stálá láska. Jeho kolega F. X. Desvaux ověřil tuto vynikající učebnici nádhernými barevnými obrázky, které umožní snadno pochopit vysvětlovanou problematiku. Publikace je doplněna slovníčkem nejdůležitějších imunochemických termínů, doporučenou literaturou a především CD, které obsahuje nejen celou publikaci, ale také vyhledávač umožňující snadno najít v textu kterýkoliv termín, ale také co se o něm na určité straně píše. Najdeme zde i odkazy na webové stránky VŠCHT v Praze.

Závěrem mohu všem zájemcům o imunochemii tuto publikaci vřele doporučit. Bude se jistě hodit všem našim vysokoškolským učitelům kteří přicházejí do styku se zahraničními studenty, např. v rámci úspěšně se rozvíjející evropské spolupráce (programy Erasmus aj.). S potěšením si ji jistě pročtou i ti, kdo imunochemii znají nebo ji dříve studovali a potřebují si některé vědomosti oprášit a utřídit.

**Publikaci lze si objednat na adrese: Markéta Podušková, Vydavatelství VŠCHT Praha, Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, případně e-mailem: Marketa.Poduskova@vsct.cz.**

**Lze si ji také přímo koupit v prodejní skript v budově B, VŠCHT v Praze, v přízemí vpravo, č. dveří B 8**

**Cena publikace, včetně CD je 405 Kč + DPH. Řádní studenti si mohou koupit publikaci za sníženou cenu 249 Kč + DPH.**

Jan Káš

# GENETICKÁ MODULACE BIOSYNTÉZY ETYLÉNU V ROSTLINÁCH

Hana Laštůvková

*Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha*

Etylén je jediný plynný rostlinný hormon, který působí jako signální molekula v mnoha fyziologických procesech doprovázející rostlinnou odpověď na různé podněty po celý její životní cyklus. Rostliny zbavené etylénu nemohou normálně růst a vyvíjet se. Etylén se podílí na procesech jako například růst kořenů a prýtlů, zrání plodů a stárnutí různých rostlinných orgánů (listů, květů, plodů). Je zapojen do odpovědi rostliny na stres: napadení patogeny, na poranění a další environmentální stres. Bylo zjištěno, že etylén reguluje transkripci velkého množství genů, které řídí stavbu a fungování buněčné stěny a genů ovlivňujících metabolismus lipidů, degradaci proteinů v proteasomech, ukládání peptidů, signalizaci a mnoho dalších buněčných procesů. Etylén produkují vyšší rostliny ve všech svých částech<sup>2</sup>.

Fyziologické účinky etylénu jsou velmi rozmanité a někdy i poněkud protichůdné. Je pozorováno zpomalení dlouhivého růstu stonků i kořenů a současně jejich tloušťnutí pod vlivem etylénu. Podstatou těchto změn je změna orientace mikrofibril celulózy v buněčných stěnách. Popsané je také zrychlení dlouhivého růstu některých vodních rostlin a tvorba adventivních kořenů. Etylén také může stimulovat klíčení semen. K nejvýznamnějším účinkům etylénu patří stimulace některých procesů souvisejících se zráním plodů. Je známo, že etylén může působit již ve velmi nepatrné koncentraci a jeho tvorba může být někdy až překvapivě velká (např. ve zralém jablku dosahuje koncentrace etylénu často více než 2000 cm<sup>3</sup>.m<sup>-3</sup>).

Vlastností etylénu v rostlinách se využívá pro ovlivnění procesů souvisejících v první řadě s regulací rychlosti dozrávání plodů. Pokud v průběhu vývoje plodů etylén v příslušnou dobu není přítomen, plody nečervenají, nedozrávají a zůstávají na rostlině plně vyvinuté aniž by opadly. Je možné je hromadně sklídit, bez poškození je transportovat a po transportu ještě delší dobu skladovat. Pokud chceme urychlit zrání ovoce, koncentraci etylénu ve skladových komorách zvyšujeme (bývá využíváno zejména u banánů, které se musejí sklízet a transportovat v nezralém stavu). Naopak, máme-li zájem o zpomalení zrání (například při skladování jablek), pak etylén vytvářený ovocem musíme ze vzduchu odstraňovat (nejsnadněji větráním).

Podle rozdílného mechanismu zrání můžeme plody dělit do dvou skupin: klimakterické a neklimakterické. Klimakterické plody, kam patří jablka, avokádo, banány, mango, melouny, papája, broskve nebo hrušky, se liší

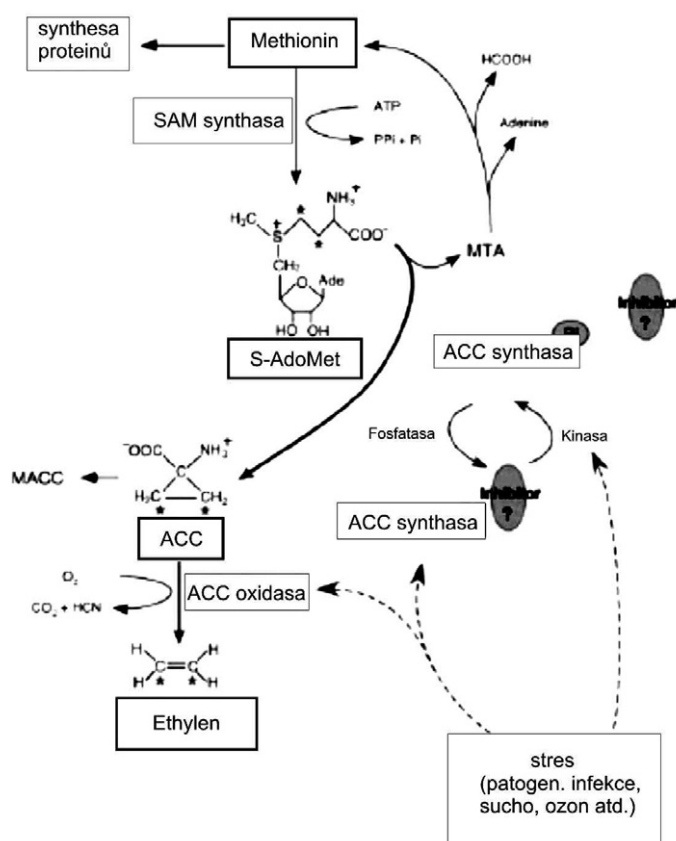
od neklimakterických svou schopností dozrávat až po sklizni<sup>1</sup>. Dozrávání klimakterických plodů je doprovázeno maximální respirací a autokatalytickou syntésou etylénu. Zvýšená produkce etylénu má za následek změny v obsahu chlorofylu, koncentraci karotenoidů a flavonoidů, vedoucí k barevné změně plodů. Také se mění turgor buňky, což vede ke změně struktury plodů. Jsou modifikovány cukry, organické kyseliny a těkavé sloučeniny ovlivňující chuť a aroma. Jako dobrý modelový systém klimakterických plodů pro studium role etylénu v rostlinách jsou nejčastěji využívána rajčata, protože mají relativně malý genom, krátký životní cyklus, snadnou genetickou manipulaci a mají velký ekonomický význam<sup>3</sup>.

## Biosyntéza etylénu

První reakcí biosyntézy etylénu je přeměna methioninu na S-adenosylmethionin (SAM), která je katalyzována SAM-syntetázou za spotřeby jedné molekuly ATP na molekulu syntetizovaného SAM. Téměř 80 % buněčného methioninu je přeměněno na SAM. Molekula SAM je donor methylové skupiny pro mnoho buněčných molekul jako jsou nukleové kyseliny, proteiny a lipidy. SAM je také prekursor syntézy polyaminů (Spermidin/ biosyntéza Sperminu). Další reakcí biosyntézy etylénu je přeměna SAM na 1-aminocyklopropan-1-karboxylovou kyselinu (ACC) za účasti enzymu ACC-syntázy. Vedlejším produktem vytvořeným v této reakci je 5 $\epsilon$ -methylthioadenosine (MTA), který je převeden zpět na methionin. Tím MTA chrání methylthio skupinu a může udržovat konstantní koncentraci methioninu, dokonce i když je etylén intenzivně syntetizován. Hladina ACC může být snižována malonylací ACC za tvorby malonyl-ACC (MACC), tímto způsobem může být produkce etylénu redukována. Posledním krokem biosyntézy etylénu je oxidace ACC za účasti enzymu ACC-oxidázy a spotřeby jedné molekuly kyslíku, kdy produktem této reakce je etylén, oxid uhličitý a kyanid, který je dále detoxikován na  $\beta$ -kyanoalanin. Tak je zabráněno toxickému hromadění kyanidu během produkce etylénu. Za limitní krok syntézy etylénu jsou považovány reakce katalyzované ACC-syntázou a ACC-oxidázou. Oba tyto enzymy jsou přítomny v mnoha rostlinných tkáních v malém množství.

Kromě výše popsané biosyntézy etylénu, který se touto cestou tvoří za normálních podmínek, existuje také tzv. stresová biosyntéza etylénu. K té dochází za stresových podmínek, jakými jsou například

nedostatek vody, teplotní výkyvy, poranění nebo napadení patogeny atd. Uvedené stresory mají za následek indukci *de novo* tvorby enzymu ACC-syntázy, díky čemuž dochází ke zvýšení hladiny etylénu v rostlině<sup>8</sup>. Vratná fosforylace ACC-syntázy je indukována neznámou fosfatázou a kinázou, která je pravděpodobně aktivována stresem. Je známo, že obě formy, přirozená i fosforylovaná, jsou funkční formou ACC-syntázy, ale nemetylovaná ACC-syntáza může být v podmínkách *in vivo* méně stabilní nebo méně aktivní<sup>5</sup>. Přesný význam a funkce stresového etylénu nejsou zatím zcela objasněny. Soudí se, že zvýšená biosyntéza etylénu za těchto podmínek má za následek zvýšenou aktivitu některých enzymů, které se účastní obranných reakcí rostlin vůči nepříznivým podmínkám.



Obr.1 Biosyntéza etylénu.

Transport etylénu v rostlině probíhá nejčastěji prostou difuzí v intercelulárách. Cévními svazky po celé rostlině je rozváděna pouze ACC, která se také může hromadit ve vakuolách. Rychlost tvorby ACC je hlavní reakcí, na které závisí konečné množství uvolněného etylénu. Velmi často bývá pozorován autokatalytický efekt, kdy vyšší koncentrace etylénu dále zvyšuje rychlost jeho tvorby.

### Významné enzymy biosyntézy etylénu

Oba důležité enzymy syntézy etylénu, ACC-syntáza i ACC-oxidáza, jsou kódovány multi-genovými rodinami a jejich exprese je rozdílně regulována různými vývojovými, environmentálními a hormonálními signály. Struktura multigenové rodiny ACC-syntázy je podobná podskupině 1 rodiny pyridoxal 5'-fosfát (PLP)-depen-

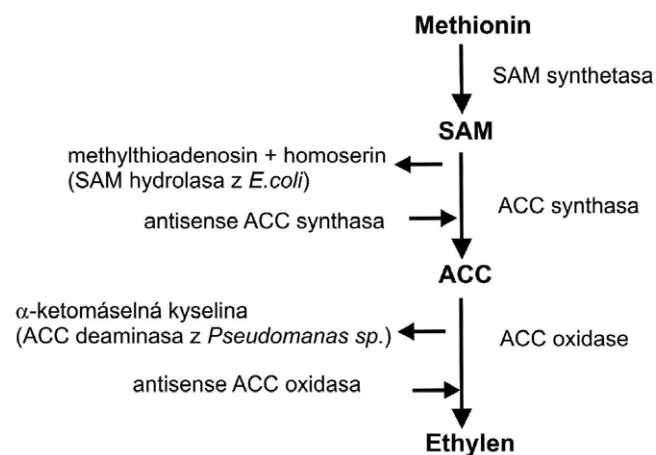
dentních aminotransferáz. PLP je esenciální kofaktor ACC-syntázové aktivity vázaný v aktivním místě enzymu. Krystalová struktura jablečné ACC-syntázy ukazuje, že tento enzym tvoří homodimer. Každý monomer ACC-syntázy je tvořen dvěma odlišnými doménami, velkou a malou doménou, které jsou definovány terciální strukturou. Velká doména obsahuje hlavní oblast enzymu a má striktně konzervovanou sekundární strukturu nalezenou mezi rodinami PLP-dependentních enzymů. Naproti tomu struktura malé domény je více variabilní. Některé aminokyselinové zbytky v aktivním místě, které interagují s PLP (Y85 v jablečné ACC-syntáze) jsou ze sousední podjednotky. Toto zjištění přispívá k hypotéze, že aktivní ACC-syntáza funguje jako dimer. Je známo, že enzym ACC-syntáza se objevuje v několika rozličných izoformách, které jsou různě regulovány. Například u *Arabidopsis* je popsáno sedm genů pro enzym ACC-syntázu. Jednotlivé geny pro různé izoformy jsou označovány čísly (např. ACS2, ACS4, ACS5, ACS10, ACS6, ACS1, ACS3)<sup>10</sup>.

### Snižování hladiny etylénu

Hladinu etylénu pro potřeby oddálení doby zralosti plodů užitkových rostlin lze snížit přinejmenším dvěma způsoby. Buď chemickými inhibitory, nebo pomocí bakterií žijících v půdě. Mezi chemické inhibitory etylénu patří například CO<sub>2</sub>, který soupeří s etylénem o jeho vlastní receptor, L-aminoethoxyvinylglycin (AVG), který inhibuje enzym ACC-syntázu, dále AgNO<sub>3</sub>, který inhibuje samotné působení etylénu v rostlinách a kyselina aminoxyoctová (AOA), která blokuje konverzi SAM na ACC<sup>9</sup>. Činnost bakterií volně žijících v půdě v procesu inhibice etylénu probíhá pomocí enzymu ACC deaminázy (například u rodu *Pseudomonas*). Tento enzym rozkládá prekurzor etylénu ACC a tím brání jeho produkci. Dalším příkladem enzymu rozkládajícího meziproducty syntézy etylénu je SAM-hydroláza z bakteriofága T3, která rozkládá molekulu SAM na 5'-methylthioadenosin a homoserin<sup>4</sup>. Jiným enzymem, který snižuje hladinu SAM, je SAM-dekarboxyláza, která přemění SAM na jeho dekarboxylovanou formu.

Pro cílené snížení koncentrace etylénu v rostlinách se jako vhodná možnost ukazuje využití genového inženýrství. V některých studiích bylo ukázáno, že použití genu pro enzym ACC-syntázu v antisense orientaci vedlo k významnému snížení produkce etylénu. Naproti tomu některé studie poukazují pouze na omezený úspěch při použití tohoto genu. To může být způsobeno přítomností mnoha různých izoform ACC-syntázy<sup>6</sup>. Další z možností je použití genu pro enzym ACC-oxidázu (ACCO) v antisense orientaci. Použití tohoto genu bylo více úspěšné nejspíše z důvodů vyšší konzervace mezi geny pro ACC-oxidázu. Byl izolován gen pro tento enzym a jeho následnou expresí v antisense podobě se dospělo ke zjištění, že došlo ke snížení množství sense mRNA ve srovnání s kontrolními vzorky rostlinných pletiv. Tento výsledek vedl k závěru, že antisense mRNA se

páruje s normální sense transkriptem a výsledný dvouřetězcový produkt je poté velmi rychle v buňce degradován<sup>8</sup>.



Obr.2 Modifikace syntézy etylénu v transgenních rostlinách.

Mezi další způsoby snižování hladiny etylénu patří i využití dioxygenasového genu z rajčat, E8, který je podobný genům enzymové rodiny ACC-oxidáz.

#### Literatura:

1. Abeles F.B., et al.: Ethylene in plant biology. New York: Academic Press, 1992.
2. De Paepe A., Vuylsteke M., et al.: Plant J. 39, 537 (2004).
3. Giovannoni J.J.: Plant Cell 16, S170 (2004).
4. Good X., Kellogg J.A., et al.: Plant Mol. Biol. 26, 781 (1994).
5. Kende H.: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 283 (1993).

Výzkumy ukazují, že může zvýšit hladinu etylénu, když je exprimován v antisense orientaci v rajčatech a snižuje hladiny etylénu, když je over-exprimován. E8 nepřemění ACC na etylén, ale může mít vedlejší efekt na biosyntézu etylénu<sup>7</sup>.

#### Závěr

Přestože působení etylénu na růst rostlin bylo pozorováno již na začátku dvacátého století, některé účinky etylénu dodnes nedovedeme uspokojivě vysvětlit, i když jsou prakticky využívány. Objasnění mechanismu spojeného se zráním klimakterických plodů a role, kterou hraje etylén v tomto procesu jsou klíčem k porozumění tvorby a kvality plodů. Dozrávání ovoce je komplex geneticky programovaných procesů, které kulminují v dramatické změny barvy, struktury, chutě a vůně dužniny plodu. Společnost má komerční zájem na vyvíjení plodů, u kterých bude dozrávání iniciováno specifickým vnějším podnětem, nebo na produkci květů s prodlouženou trvanlivostí, nebo vypěstování pěstování rostliny, které budou schopné odolávat řadě environmentálních stresů.

6. Knoester M., Linthorst H.J.M., et al.: Plant Sci. 126, 173 (1997).
7. Penarrubia L., Aguilar M., et al.: Plant Cell 4, 681 (1992).
8. Stearns J.C., Glick B.R.: Biotech. Advances 21, 193 (2003).
9. Taiz L., Zeiger E.: Plant physiology. The Benjamin/Cummings Publish. Comp., 1991.
10. Tarun A.S., Theologis A.: J. Biol. Chem. 273, 12509 (1998).

## BIOLOGICKÁ DEGRADACE SKLÁDKOVÉHO PLYNU

Vratislav Novák

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Skládkování zatím stále zůstává nejpoužívanější metodou odstraňování odpadu ve světě<sup>1,2</sup>. Důvodem je zřejmě jednoduchost řešení a nízký dopad stavby na životní prostředí. Ovšem toto tvrzení platí pouze při důsledném dodržování konstrukčního návrhu, protože uvnitř skládky probíhají nejen abiotické, ale hlavně biologické procesy. Přítomné mikroorganismy degradují organické složky odpadu, čímž nejenom navyšují svojí hmotu, ale také vytvářejí vedlejší produkty, např. bioplyn. Nejvýznamnější složku bioplynu představuje uhlovodík methan, přičemž může tvořit až 85 % obj. z celkového množství vzniklého plynu<sup>3</sup>. Bioplyn také obsahuje mnoho relativně toxických látek, které představují potenciální nebezpečí pro lidské zdraví<sup>1</sup>.

Určujícím faktorem intenzity biologické tvorby plynů v tělese skládky je podíl organického materiálu. Ve středu zájmu se ocitají právě skládky komunálního

odpadu, protože obsahují průměrně až 15 % organického podílu. V závislosti na množství uloženého materiálu může být produkce bioplynu velmi vysoká, a to až 600 m<sup>3</sup>/h při průměrném 55 % obsahu methanu. V takovém případě se plyn se značnou ekonomickou výhodou používá jako obnovitelný zdroj. Pokud se surový plyn zbaví minoritních složek, je možné dosáhnout kvalitativní úrovně ekvivalentní zemnímu plynu, a takto zpracovaný plyn (SNG) je vhodný pro transport dálkovým potrubím. Další možností je spalování surového plynu v kogeneračních jednotkách, čímž se získává elektrická energie, kterou lze dodávat do elektrické sítě za velmi výhodných dodavatelských podmínek<sup>4</sup>. Pokud klesne obsah methanu pod hranici 45 % obj., nelze už plyn využít pro produkci elektřiny, protože kogenerační jednotky nejsou schopny za takových podmínek pracovat<sup>5,6</sup>. Nicméně plyn s nižším obsahem methanu je možné využít pro přímé spalování

v průmyslu nebo v místním hospodářství<sup>3</sup>. Spalování je ekonomicky výhodné, pokud koncentrace methanu neklesne pod 20 % obj.. V opačném případě se musí pro správnou funkci hořáku použít doplňkové palivo, např. zemní plyn nebo směs nižších uhlovodíků<sup>7</sup>.

Únik methanu ze skládek představuje ekologickou hrozbu. Příspěvek methanu ke zvyšování globálního oteplování je odhadován asi na 12 %<sup>8</sup>. Celkový efekt oteplování atmosféry je charakterizovaný globálním potenciálem (GWP), v časovém horizontu sta let je relativní potenciál methanu (vztažený na hmotnost emisí) 21krát vyšší než potenciál oxidu uhličitého<sup>3,9-11</sup>. Podíl GWP připadající na oxid uhličitý je odhadován na 66 % podle US EPA<sup>3</sup>.

Skládky jsou významným zdrojem methanu<sup>8</sup>. S přihlédnutím k výše uvedeným informacím vyvstává otázka, co se skládkovým plynem, jehož průtok a obsah methanu je tak malý, aby se dal energeticky využít nebo spalovat ve flérách<sup>12</sup>. Řešením může být relativně jednoduchá technologie: biofiltrace. V posledních letech se biofiltrace těší velké pozornosti, protože je to technologie s nízkými celkovými náklady. V případě instalace biofiltrů na skládkách je kladen velký důraz na nízké náklady provozu zařízení, protože emise plynu může trvat až po dobu padesáti let<sup>4</sup>.

Funkční princip biofiltrace je celkem jednoduchý. Zpracováváný plyn se pod tlakem vhání do zařízení, jehož lože je vyplněno nosičovým médiem. Nosič slouží jako podpora pro růst methanotrofních mikroorganismů, které využívají methan jako výhradní zdroj uhlíku a energie a jsou schopné ho přeměnit na CO<sub>2</sub> a vodu<sup>13</sup>. První pokusy filtrovat skládkový plyn skrze biologicky aktivní vrstvy byly provedeny již v roce 1979 a byly úspěšné. Sice byly vykonány za účelem snížení šířícího se zápachu ze skládek, ale souběžně s tím se potvrdila i skutečnost, že methan může být v takovýchto podmínkách významnou měrou biologicky odbouráván<sup>3</sup>.

Skládkový plyn je termín, který se někdy používá pro veškeré plyny, které lze odsát či navzorkovat z tělesa skládky odpadů bez ohledu na to, zda obsahuje třeba jen 1 % obj. methanu a nebo i 10 % obj. kyslíku. Anglosaská literatura v oborech plynárenství, ochrany ovzduší, skládek a odpadového hospodářství vytvořila pro skládkový plyn dnes již široce používanou zkratku LFG = Landfill Gas<sup>3,4</sup>.

### Metabolismus methanu

Pokud methanogenní mikroorganismy uzavírají koloběh uhlíku v přírodě, pak methanotrofy představují jeho začátek. Jedná se o nevelkou skupinu bakterií, které jsou schopny využívat jako zdroj energie jednouhlíkaté, ale i víceuhlíkaté substráty a oxidovat je až na CO<sub>2</sub> a vodu. Avšak přítomnost vazeb C–C jim působí potíže a nejsou schopné je rozštěpit. Příkladem substrátu s nepřímo spojenými atomy uhlíku je dimethyl ether (CH<sub>3</sub>–O–CH<sub>3</sub>).

Bakterie oxidující methylovou skupinu se označují jako methylofilie. Výše uvedený fakt o neschopnosti štěpit uhlíkaté vazby v organických substrátech platí jenom pro obligatorní methylofilie. Některé bakterie jsou fakultativní methylofilie a mohou proto růst i na jiných uhlíkatých sloučeninách, např. sacharidech. Většina z nich využívá methanol a methylamin, ale nikoliv methan<sup>14</sup>.

První popsaná bakterie schopná oxidovat methan, *Methylomonas methanica*, byla popsána již na začátku století, a to v roce 1906 Söhngenem<sup>3</sup>. Dlouhou dobu byla považována za jediný známý druh schopný aerobní oxidace methanu. Dnes v podstatě rozlišujeme pět rodů. Charakteristickým znakem obligatorních methylofilů je řada četných membránových invaginací do cytoplazmy. Souvisí to pravděpodobně s lokalizací aparátu aerobní respirace methanu, který je ukotven právě na cytoplazmatické membráně. Hlavní součástí enzymatického komplexu je unikátní monooxygenasový systém. Nejlepším a také prakticky jediným substrátem je methan. Druhým energeticky výhodným substrátem je methanol, ale ten je toxický a může být přítomen jen ve velmi nízkých koncentracích. Také mohou oxidovat formiát na CO<sub>2</sub>, ethylen a ethanol na acetaldehyd, ale získaná energie nemůže být využita na růst a množení<sup>15</sup>. Mezi obligatorní methylofilie patří také rod *Methylococcus*<sup>14</sup>.

Produkce, ale také současné oxidace methanu, jsou schopny i samotné methanogenní bakterie. V porovnání s množstvím vzniklého methanu je současně reoxidováno asi 0,3 % v závislosti na vlastnostech určitého kmenu. Tento děj probíhá např. u *Methanosarcina barkeri* nebo také *Methanospirillum hungatii*. Výzkumy naznačují, že metabolické cesty vzniku a oxidace methanu jsou odlišné<sup>16</sup>.

V anaerobním prostředí, např. v mořských sedimentech, žijí mikroorganismy schopné oxidace methanu i bez přítomnosti kyslíku. Umožňuje jim to syntrofní spolupráce se sulfátredukujícími (SRB) bakteriemi. Jedná se v podstatě o „reverzní“ methanogenezi. Při nízkém parciálním tlaku vodíku methanogeny využívají vodu jako akceptor elektronů, přičemž vzniká vodík. Ten je dále využit SRB pro redukcí síranových iontů<sup>17</sup>.

Methanotrofní bakterie mohou také významně ovlivnit hladinu znečištění podzemní vody chlorovanými uhlovodíky. Například trichlorethylen (TCE) je dosti běžný kontaminant a je také vysoce odolný aerobnímu rozkladu. Ovšem byly provedeny pokusy s čistou aerobně rostoucí mikrobiální kulturou, která využívala methan jako zdroj energie a současně degradovala i trichlorethylen na CO<sub>2</sub> a ve vodě rozpustné produkty. Biodegradace TCE byla identifikována jako kometabolický proces. Výsledkem je zřejmě TCE epoxid, který se ve vodném prostředí spontánně rozkládá. Monooxygenasový komplex má nízkou substrátovou specifitu, která umožňuje bakteriím oxidovat nebo dechlorinovat širokou škálu ekonomicky a ekologicky významných sloučenin<sup>18</sup>.



Pro obligatorní methylotrofy je methan i výhradním zdrojem uhlíku. Výchozím intermediátem v asimilaci uhlíku je formaldehyd, přičemž existují dva metabolické cykly, které jsou vstupní bránou anabolismu. První dráhou je ribulosamonofosfátový cyklus. Je to dráha velmi podobná Calvinově cyklu autotrofní asimilace  $\text{CO}_2$ . Druhou asimilační dráhou formaldehydu je serinový cyklus, kombinace části citrátového a glyoxylátového cyklu. Zajímavým jevem je, že fakultativní anaerobové disponují pouze serinovou dráhou, zatímco obligatorní bakterie mají dráhy obě<sup>14,15</sup>.

### Biooxidace skládkového plynu

Přítomnost methanu ve skládkách a možnost jeho úniku do atmosféry, kde silně působí na skleníkový efekt, si vynutilo bližší pozornost zřizovatelů skládek tuhých komunálních odpadů (TKO) a dohlížejících orgánů. Nicméně emise plynů nemusí být tak vysoké, jak ukazují měřicí metody povrchového úniku (flux-box). V nižších vrstvách skládky vzniká působením methanogenů methan. Ten migruje vzhůru a prochází svrchní vrstvou skládky obývanou methanotrofy, které ho jsou schopny velmi účinně spotřebovávat. Degradční aktivita methanu je asi stokrát větší než jeho produkce. Takto může být odbouráváno více než 80 % vzniklého methanu, někdy je účinnost skoro 100 %<sup>3,19</sup>.

Rozvoj methanotrofů v půdním ekosystému je závislý na mnoha environmentálních faktorech. Uplatňuje se zde vliv teploty, ale až při vyšších poměrech směsi methan-vzduch. Důležitými regulátory methanotrofie jsou kyslík a dusík. Přídavkem  $\text{NH}_4^+$  iontů lze zvýšit účinnost degradace pouze krátkodobě, protože s rostoucí dobou expozice se mění kompozice mikrobiální komunity. Zprvu převládají rychle rostoucí bakterie, ale po vyčerpání minerálního dusíku přežijí pouze mikroby schopné fixace vzdušného dusíku<sup>20,21</sup>. Při nižších koncentracích methanu se amonné ionty projevují jako silný inhibitor. Zvýšením dodávky methanu se úroveň aktivity methanotrofů zvyšuje. To by nasvědčovalo faktu, že molekula methanu a amonný iont soutěží o navázání na aktivní místa cílových enzymů. Zřejmě tedy dochází ke kompetitivní inhibici<sup>8</sup>.

Citlivost bakterií vůči nízké koncentraci kyslíku se neprojevuje nad 3 obj. % v plynu<sup>22</sup>. Ale v krycí vrstvě

se vytváří koncentrační profil jako výsledek difúze, reakcí a toku plynu. Oxidace proto probíhá hlavně ve svrchních 30 cm vrstvy<sup>8</sup>. Biooxidace také závisí na vlastnostech krycí vrstvy. Mikroorganismy se pomnoží pouze v příznivých podmínkách. Jako perspektivní materiál tzv. denního překryvu se zdá být průmyslový kompost. K dosažení relativně účinného odbourávání methanu stačí použít tenkou vrstvu tohoto materiálu. Nicméně pokud je těleso skládky dobře kompaktně, nemusí být potom jeho povrch překryt vrstvou kompostu. Kompaktní vrstva působí nejen jako filtr unikajícího methanu, ale zachycuje i pachové složky plynu<sup>3</sup>.

### Biooxidační filtry

Plynotěsné uzavírání skládek, ať už z důvodů energetických nebo environmentálních, neumožňuje využití svrchní vrstvy jako biologického filtru. Prostředí, kde probíhá masivní oxidace methanu, lze velmi dobře simulovat. Použitím přirozeného překryvného materiálu jako náplně vznikne biooxidační filtr, přes který prochází všechen vznikající skládkový plyn. Nutnou vlastností, kterou náplň biofiltru musí splňovat, je nízká pořizovací cena a dostatečná mikrobiální aktivita. Tomuto požadavku dokonale vyhovuje kompostní hmota. Konstrukce filtru bývá většinou velmi jednoduchá, ovšem jsou možné různé variace. Obvykle se jedná o těleso ve tvaru kvádrů či krychle, většinou částečně nebo úplně zapuštěné do terénu. Zařízení také obvykle obsahuje perforovanou přepážku mezi náplní a porézni vrstvou, která plní funkci tlumiče výkyvů atmosférického tlaku. Velikost biofiltru je přímo úměrná koncentraci methanu a objemovému toku plynu<sup>3,13</sup>. Nicméně objem náplně zřídka překročí 20 m<sup>3</sup>. Většinou se staví čtvercové „pilot scale“ biofiltry. Výška náplně bývá okolo jednoho metru<sup>13,23</sup>. Účinnost eliminace je závislá na koncentraci methanu a na době průchodu biofiltrem. Dosažení maximální destrukce methanu je nepřímo úměrné jeho koncentraci. Pravděpodobně to souvisí s jeho nízkou rozpustností ve vodě, což zpomaluje přestup přes fázová rozhraní.

Velmi důležitou vlastností biofiltru je schopnost účinně odstraňovat široké spektrum těkavých organických látek (VOC), které tvoří stopovou kontaminaci skládkového plynu<sup>12</sup>. Byly také provedeny biofiltrační pokusy v laboratorním měřítku<sup>13,23,24</sup>.

### Literatura:

1. SHIN H.-C., et al.: *Environ. Pollution*, 2002, 119, p. 226-236.
2. TREOLAR J.: [online]. 1998, <http://www.ssn.flinders.edu.au/geog/geos/treolar.htm>
3. STRAKA F.E.: *Bioplyn*. 1. vydání. Říčany: GAS s.r.o., 2003. 517 s.
4. POPOV V.: *Renewable Energy*, 2005, 30, p. 1021-1029.
5. *Landfill Off Gas Collection and Treatment Systems* [online]. 1995, <http://www.fbelfiore.net/usacegas1.zip>
6. MARGALIT A.: *From Pollutant to Electricity - The Use of Landfill Gas for Energy* [online]. 2003, <http://www.kentlaw.edu/classes/fbosselm/Spring2003/>
7. *Landfill Gas Primer* [online]. 2001, <http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/landfill/html/ch5.html>
8. DE VISSCHER E.A.: *Environmental Science and Technology*, 1999, 33, p. 1854-1859.
9. COX W.J.: *Elimination of methane from landfill gas* [online]. 2005, <http://www.alchemltd.com/>
10. CHEN C., et al.: [online]. 2003, <http://www.nrdc.org/air/energy/lfg/lfg.pdf>

## Literatura (pokračování):

11. *Methane Gas Energy* [online]. 2005, [http://www.tva.gov/greenpowerswitch/landfill\\_faq.htm](http://www.tva.gov/greenpowerswitch/landfill_faq.htm)
12. GERBERT J.E.A.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, 240, p. 61-68.
13. DEVER S., et al.: [online]. 2004, <http://biofilter.civeng.unsw.edu.au>
14. VODRÁŽKA Z.: *Biochemie*. 2. vydání. Praha: Akademie, 1999 s.
15. KAPRÁLEK F.E.: *Fyziologie bakterií*. 1. vydání. Praha: SPN, 1986 s.
16. ZEHNDER A.J.B., BROCK T.D.: *J. Bacter.* 1978, 137, p. 420-432.
17. VALENTINE D.L.: *Environ. Microb.* 2000, 2, p. 477-484.
18. LITTLE C.D.: *Appl. Environ. Microb.*, 1998, 54, p. 951-956.
19. BERGER J., et al.: *Waste Management*, 2005, 25, 369-373.
20. DE VISSCHER A., et al.: *Biol. Fertil. Soils*, 2001, 33, 231-237.
21. DE VISSCHER A., et al.: *Soil Biol. Biochem.*, 2003, 35, p. 907-913.
22. WILSHUSEN J.H., et al.: *Environ. Pollution*, 2003, 129, p. 305-314.
23. VENUGOPAL S., et al.: [online]. 2003, [cit. 2004-06-14].
24. PLESSIS C.A.E.A.: *Fuel*, 2003, 82, p. 1359-1365.

## METABOLICKÝ SYNDROM

Petr Mlejnek<sup>a</sup>, Jarmila Zídková<sup>b</sup>, Jiří Sajdok<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Fyziologický ústav AV ČR, <sup>b</sup>Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Jednou z nejčastějších příčin nemocnosti a úmrtnosti na světě, a to zejména v rozvinutých a rychle se rozvíjejících společnostech, je diabetes mellitus typu 2 a s ním spojené komplikace. Epidemie diabetu nabývá hrozivých rozměrů. V roce 1985 trpělo na světě cukrovkou zhruba 30 milionů lidí, v roce 1995 to bylo už téměř 135 milionů lidí a v roce 2000 to bylo podle odhadů Světové zdravotnické organizace celých 177 milionů lidí. Bude-li tento trend pokračovat, přesáhne v roce 2025 počet diabetiků na světě 300 milionů. Většina tohoto nárůstu se očekává v rozvojových zemích. Diabetes typu 2 a s ním spojené komplikace jsou příčinou zhruba 4 milionů úmrtí za rok, což je 9 % z celkového počtu mrtvých za rok.<sup>[1]</sup>

Zhoršené využívání glukózy, jímž tato nemoc trápí pacienta je však pouze jednou, byť nejvíce nápadnou a obvykle nejdříve diagnostikovanou, součástí celého spektra metabolických poruch. Pro souhrn těchto poruch byl postupně zaveden pojem metabolický syndrom.

### Metabolický syndrom (MS)

Už od 30. let 20. století se objevují pokusy shrnout společně se vyskytující metabolické poruchy jako hypertenzi, obezitu, inzulínovou rezistenci, nízkou hladinu HDL cholesterolu, vysokou hladinu triacylglycerolů a další pod jednotný pojem. Díky neexistenci jednotné definice metabolického syndromu docházelo k nesrovnalostem, zejména v prevalenci, mezi různými studii.<sup>[2]</sup> V roce 1998 proto WHO navrhla sjednocující název „Metabolický syndrom“ a jeho definici.<sup>[3]</sup>

### Definice MS:

a) Osoba s diabetem typu 2 nebo sníženou glukózovou tolerancí má metabolický syndrom, jestliže jsou u ní splněna alespoň dvě ze čtyř kritérií z následujícího výčtu. (Obr. 1)

b) Osoba s normální glukózovou tolerancí má metabolický syndrom, jestliže je inzulín-rezistentní a splňuje alespoň dvě ze čtyř kritérií z následujícího výčtu. (Obr. 1)



Obr. 1. Složky metabolického syndromu

- 1) Hypertenze (definovaná buď jako krevní tlak vyšší než 160/90 mm Hg, nebo jsou-li podávána antihipertenziva).
- 2) Dyslipidémie (definována buď jako zvýšená hladina plazmových triacylglycerolů nad 1,7 mmol/l, anebo jako snížená hladina HDL cholesterolu pod 0,9 mmol/l u mužů a pod 1,0 mmol/l u žen).<sup>[4]</sup>
- 3) Obezita (definovaná jako BMI  $\geq 30,0$  kg/m<sup>2</sup>, anebo jako poměr obvodu pasu a boků  $\geq 0,9$  u mužů a  $\geq 0,85$  u žen) BMI = hmotnost v kg/(výška v m)<sup>2</sup>.
- 4) Mikroalbuminurie (definovaná jako noční exkrece albuminu močí  $\geq 20$  g/min).

### Výskyt a dědičnost metabolického syndromu

Metabolický syndrom v našich podmínkách postihuje během života zhruba velkou část populace. Při sledování jeho výskytu je třeba vzít v potaz jeho velice výraznou závislost na věku. S přibývajícím věkem rapidně vzrůstá

pravděpodobnost, že se některá nebo více složek metabolického syndromu u daného jedince objeví. V nejvyšší věkové kategorii trpí hypertenzí přes 60 % populace, diabetes 2. typu dostane více než 20 % a aterogenních hodnot triacylglycerolů (více než 1,7 mmol/l) dosáhne během života až 50 % osob.<sup>[5]</sup>

Výskyt DM2 v nejstarší populaci přesahuje 20 % a riziko diabetu u potomka pozdějších 2 diabetiků je prakticky 100 % a u potomka 1 diabetika a 1 nediabetika se blíží 50 %. Z toho vyplývá, že geneticky založených diabetiků je v naší populaci nepochybně kolem 20 %, tedy pětina populace.<sup>[6]</sup>

Inzulínová rezistence se často vyskytuje v rodinách, 45 % přímých příbuzných pacienta s diabetem 2. typu je inzulín resistantní v porovnání s 20 % jedinců z rodin bez výskytu diabetu.<sup>[2]</sup>

Genetický předpoklad rozvoje metabolického syndromu se odhaduje zhruba u 40 % populace. U dalších patrně převládají spíše vnější vlivy, jako je nadměrná výživa, nedostatečná fyzická aktivita, kouření, stres atd. Genetická podmíněnost inzulínorezistence se odhaduje na cca 60 % a inzulínemie jen na cca 40 %.<sup>[7]</sup> Nicméně řada autorů se domnívá, že metabolický syndrom může být indukovan zejména zevním prostředím. A ve skutečnosti lze v našich podmínkách takřka u každého nemocného metabolickým syndromem vystopovat některou jeho složku vyvolanou vnějšími vlivy. Zdá se tedy, že inzulínová rezistence je primárně determinována geneticky a její zhoršení lze vyvolat vnějšími vlivy. Zajímavé je, že metabolický syndrom se často rozvine u pacientů, kteří ve vlastním intrauterinním vývoji prodělali malnutrici. Tito jedinci mívají nižší porodní hmotnost. Navíc se podařilo prokázat, že nemocní s metabolickým syndromem mají poněkud odlišnou strukturu osobnosti a je prokazatelná i centrální mozková inzulínorezistence.<sup>[5]</sup>

## **Diabetes mellitus (DM)**

Diabetes mellitus je skupinou chronických, etiopatogeneticky heterogenních onemocnění, jejichž základním rysem je hyperglykémie. Vzniká v důsledku nedostatečného účinku inzulínu, a to buď při jeho absolutním, nebo relativním nedostatku a je provázen komplexní poruchou metabolismu cukrů, tuků a bílkovin. Klasifikace diabetu: Řada nových poznatků v etiopatogenezi diabetu vedla Světovou zdravotnickou organizaci v roce 1999 k přijetí nové klasifikace a diagnostiky cukrovky.

### **Diabetes mellitus typu 1**

Jen pro úplnost: Onemocnění je důsledkem selektivní destrukce  $\beta$ -buněk vedoucí k absolutnímu nedostatku inzulínu a pacient se stává životně závislým na jeho exogenním podávání. Toto onemocnění nepatří do okruhu metabolického syndromu.

### **Diabetes mellitus typu 2**

Nejčastěji se manifestuje v dospělosti, a to většinou až po čtyřicátém roce věku. Nemocní nejsou životně

závislí na exogenním podávání inzulínu a nemají sklon ke ketoacidóze. Začátek bývá pozvolný, bez typických příznaků cukrovky, a proto bývá záchyt v počátečních stádiích náhodný. Typický je familiární výskyt a v 60 – 90 % je spojen s nadváhou.<sup>[6]</sup> Tyto charakteristiky ale nemusí být vždy splněny. Diagnostickým kritériem je pouze hyperglykémie bez životní závislosti na exogenním inzulínu. V patogenezi choroby se uplatňuje zejména inzulínová rezistence spolu s poruchou sekrece inzulínu, k níž dochází jiným, než autoimunitním procesem. Patrně zde nedochází k úplné ztrátě  $\beta$ -buněk. U části nemocných dochází po létech trvání choroby k selhání léčby perorálními antidiabetiky a ke korekci hyperglykémie je nutno zahájit léčbu inzulínem. Pak se používá termín DM typ 2 kompenzovaný inzulínem.<sup>[8]</sup>

### **Ostatní specifické typy diabetu**

Pro úplnost je třeba alespoň zmínit existenci vzácných typů diabetu. Jejich původcem mohou být např. otravy, některé infekce, monogenní poruchy, záněty, traumata, pankreatektomie, atd.<sup>[8]</sup> Tato onemocnění rovněž nesouvisí s metabolickým syndromem.

### **Inzulínová rezistence tukové tkáně a její patofyziologické následky**

Metabolické důsledky inzulínové rezistence se týkají zejména kosterního svalu, jater a tukové tkáně a v poslední době se pozornost zaměřuje i na CNS. Sval trpí nedostatečným transportem glukózy do buněk, v tukové tkáni zřejmě mimo jiné nedochází k dostatečné inhibici lipolýzy (hormon sensitive lipáza inhibovaná inzulínem). Tak je z tuku uvolňováno do oběhu zvýšené množství neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK), které dále zhoršují inzulínovou rezistenci. V játrech dochází vlivem inzulínorezistence ke zvýšené glukoneogenezi, která se může v pozdějších stádiích podílet na rozvoji hyperglykémie u DM2.

Lidská populace jako celek se enormě liší ve schopnosti inzulínu stimulovat využití glukózy svalovou tkání a inhibovat lipolýzu v tukové tkáni. Defekty v inzulínem zprostředkovaném využití glukózy ve svalech korelují s odchylkami v regulaci uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin z tukové tkáně. Dokud jsou  $\beta$ -buňky pankreatu schopny produkovat dostatek inzulínu pro udržení normálních nebo jen lehce zvýšených hladin NEMK v plazmě, je bráněno závažnému porušení glukózové homeostázy a jediným přímým následkem inzulínové rezistence tukové tkáně je zvýšená sekrece TAG játry a hypertriglyceridemie. Jak ztrácí pankreas schopnost udržovat potřebný stupeň hyperinzulinémie, plazmové hladiny NEMK a glycerolu prudce vzrůstají, jaterní produkce glukózy přestává být normálně inhibována vzestupem koncentrace glukózy v plazmě a dochází k rozvoji hyperglykémie na lačno. Navíc vyšší koncentrace NEMK a glycerolu v plazmě stimuluje sekreci VLDL-TAG játry a tak ohrožuje tyto jedince rozvojem hypertriglyceridemie a řadou následných změn v koncentraci a složení lipoproteinů. Zdá se tedy,

že resistance tukové tkáně k účinku inzulínu hraje zásadní roli v patogenezi jak hyperglykémie, tak hypertriglyceridemie.

Tuková tkáň není jen nečinná masa buněk sloužících pro pouhé skladování a uvolňování tuku v závislosti na potřebě či přebytku energie, ale velice rozvinutý soubor buněk s vysoce specializovanými a provázanými funkcemi. Kromě své nejdůležitější funkce, hospodaření s energií pro celý organismus, sekretuje celou řadu proteinů zvaných adipokiny, které mají pozitivní, nebo za některých podmínek i poškozující účinek na homeostázu v těle. Expresí adipokinů je integrovanou odpovědí na signály z celé řady orgánů, která velice závisí na integritě a fyziologickém stavu tukové tkáně. U savců je tuková tkáň složena z několika dep, která se liší jak z anatomického tak z fyziologického a histologického hlediska. Zralé adipocyty, jejichž diferenciaci je zajišťována kaskádou specifických transkripčních faktorů tvoří hlavní složku bílé tukové tkáně. Během diferenciačního procesu vznikají dvě morfologicky a funkčně částečně odlišná depa bílé tukové tkáně. A to podkožní (sc, subkutani) a viscerální (vis) a každá z nich má poněkud jinou metabolickou aktivitu a jinou senzitivitu k inzulínu.<sup>[9,10]</sup> Rozdílné profily exprese některých genů, účastnících se embryonálního vývoje ve viscerální a podkožní tukové tkáni naznačují odlišné ontogenetické programy preadipocytů, jež dávají vznik podkožnímu nebo viscerálnímu depu tukové tkáně.<sup>[11]</sup> Kromě těchto dvou, se bílá tuková tkáň ještě kumuluje v menších množstvích kolem srdce, ledvin a v oblasti genitálií.

U lidí lze v podkožním tukovém depu pozorovat dvě vrstvy, povrchovou a hlubokou. V jejich rozdělení existují pohlavní rozdíly. Zatímco u žen je 51 % bílé tukové tkáně uloženo v hluboké vrstvě podkožního depa, u mužů je to 66 %. A navíc se zdá, že obezita je spojena více s nárůstem hluboké podkožní vrstvy než povrchové a rovněž redukce nadváhy zasahuje více tuto hlubokou vrstvu. Lze tedy předpokládat, že hlubší vrstva podkožního tuku je metabolicky aktivnější než povrchová.<sup>[12]</sup> Viscerální tukové těleso je uloženo v intraperitoneálním i retroperitoneálním prostoru. Intraperitoneální tuk se ještě dále skládá z omentální a mesenterické tukové tkáně a u hlodavců ještě zahrnuje perigonadální (epididymální) tukové těleso. To je obecně používáno jako experimentální model viscerálního tuku. Viscerální tukové těleso se od dalších liší tím, že je z něj krev odváděna do portální žíly a má tedy velice přímé spojení s játry. Redukce viscerálních tukových zásob má za následek zlepšení inzulínové senzitivity a glukózové tolerance. Velikost viscerálního tukového tělesa pozitivně koreluje s glukózovou intolerancí, plazmovými hladinami triacylglycerolů a cholesterolu, dále s hypertenzí a dyslipidemií.<sup>[13]</sup> Dále bylo zjištěno, že ve viscerální tukové tkáni dochází k vyšší expresi genů inzulínové signální kaskády a rovněž odpověď na účinek inzulínu je zde větší a rychlejší než v podkožní tukové tkáni.<sup>[14]</sup> V zásadě lze říci, že viscerální tuková tkáň je více zasažena případnou redukcí

nadváhy, je více metabolicky aktivní, má vyšší lipolýzu a vyšší produkci adipokinů, a má větší vliv na inzulínovou resistenci než tuková tkáň podkožní.

Savčí tuková tkáň je vysoce inervovaná a bohatá na krevní kapiláry. Neskládá se jenom ze zralých adipocytů naplněných tukem, a jejich prekurzorů zvaných preadipocyty, ale rovněž je její součástí tzv. stromální vaskulární frakce. Ta zahrnuje krevní buňky, endoteliální buňky a makrofágy. S objevem leptinu, prvního adipokinu, se adipocytům dostalo pozornosti i jako buňkám s endokrinní a parakrinní funkcí. Nicméně v posledních několika letech přibývají důkazy, že kromě adipocytů se i stromální vaskulární frakce aktivně účastní pochodů v tukové tkáni a že nejde jen o strukturní prvky, či pouze infiltrované makrofágy. A navíc studie sympatické a parasympatické inervace tukové tkáně postupně přinášejí poznání, že se autonomní nervový systém účastní regulace počtu tukových buněk, úrovně exprese adipokinů, příjmu NEMK a glukózy tukovými buňkami a úrovně lipolýzy/lipogeneze.<sup>[15]</sup>

Tuková tkáň se tedy účastní nejen koordinace energetického metabolismu, ale účastní se i endokrinních a imunitních regulací. Jak nedostatečnost tukové tkáně (lipodystrofie, lipoatrofie), tak její přebytek (obezita) mají negativní vliv na zdravotní stav jedince. Obezita je kromě již zmíněného metabolického syndromu spojena se zánětlivými stavy a některými degenerativními chorobami a některými typy zhoubných nádorů.

### **Tuková tkáň a její endokrinní / parakrinní funkce – adipokiny**

#### **Adipokiny**

Pomocí adipokinů komunikuje tuková tkáň se svalovou tkání, kůrou naledvinek, mozkem a sympatickým nervovým systémem, játry, endoteliálními buňkami, trávicím systémem a řadou dalších. Pro tento koncept hovoří rovněž fakt, že nejen hypertrofie a hyperplazie tukové tkáně (tj. obezita), ale i lipodystrofie, kdy tuková tkáň chybí působí destruktivně na homeostázu lipidů a glukózy v organismu inzulínovou rezistencí počínaje.

#### **Tuková tkáň, záněť a inzulínová rezistence a ateroskleróza**

Při pozitivní energetické bilanci organismu se tuková tkáň stává hypertrofickou a následně hyperplastickou. Jakmile už totiž adipocyty nemohou nadále zvětšovat svůj objem nad „kritickou velikost“, která je u jednotlivých tukových dep pravděpodobně geneticky určena, začne vzrůstat jejich počet. Celý tento proces vede k expanzi tukové tkáně jako celku i s doprovodnými buněčnými frakcemi, zejména makrofágy. Kapacita tukové tkáně zvětšovat svůj objem je téměř nekonečná. Obezita je provázána zánětlivými procesy v tukové tkáni. Autokrinní, parakrinní a endokrinní signály z adipocytů společně se vzrůstajícím množstvím tukové tkáně spouštějí infiltraci tukové tkáně makrofágy.<sup>[22]</sup> Řadou studií byla prokázána pozitivní korelace mezi

Tabulka 1: Přehled několika adipokinů působících v energetickém metabolismu.

Název	Exprimován:	Metabolický účinek
Leptin	adipocyty	Signál pocitu sytosti s přímým účinkem na hypotalamus, stimuluje lipolýzu, inhibuje lipogenezi, zvyšuje sensitivitu k inzulinu, zvyšuje metabolismus glukózy, stimuluje oxidaci mastných kyselin
Adiponectin	adipocyty	Zvyšuje oxidaci mastných kyselin a zároveň snižuje jejich koncentraci v plazmě, snižuje hladinu glukózy v plazmě, zvyšuje sensitivitu k inzulinu, má protizánětlivý a antiaterosklerotický účinek.
Visfatin	adipocyty	Moduluje účinek inzulinu, má hypoglykemický účinek, zvyšuje sensitivitu k inzulinu, stimuluje lipogenezi [16]
Adipsin	adipocyty	Stimuluje ukládání triacylglycerolů, inhibuje lipolýzu [17]
RBP4	adipocyty	Retinol Binding Protein 4 (RBP4), je spojen s inzulinorezistencí, jeho zvýšené hladiny v plazmě provázejí obezitu [18]
Vaspin	adipocyty	Zvyšuje sensitivitu k inzulinu, inhibuje expresi resistinu, leptinu a TNF- $\alpha$ [19]
Omentin	SVC	Zvyšuje inzulinem stimulovaný příjem glukózy do adipocytů [20]
Pref-1	preadipocyty	Inhibuje adipogenezi, snižuje glukózovou toleranci a sensitivitu k inzulinu, indukují hypertriceridemii [21]
Resistin	Adipocyty	Rekombinantní resistin vyvolává systémovou inzulinovou resistenci u myši, vážnou inzulinovou resistenci v játrech u potkanů, ale u obézních myši je jeho exprese v tukové tkáni snižena. U lidí je jeho funkce značně kontroverzní.

Tabulka 2: Přehled několika základních adipokinů podílejících se na zánětlivém stavu.

Název	Buňky, kde je exprimován:	Metabolický účinek
TNF- $\alpha$	adipocyty/makrofágy	Indikuje inzulinovou resistenci, zvyšuje lipolýzu v adipocytech, inhibuje expresi adiponectinu a naopak zvyšuje expresi IL-6
IL-1	makrofágy	Jeho zvýšená exprese v bílé tukové tkáni provází obezitu [26]
IL-6	adipocyty	Brzdí inzulinovou a leptinovou signalizaci. Jeho zvýšené hladiny provázejí obezitu, jeho plazmatické hladiny korelují s inzulinovou resistencí.
MCP-1	adipocyty/makrofágy	Zvyšuje lipolýzu a sekreci leptinu, snižuje inzulinem stimulovaný příjem glukózy. Jeho zvýšené koncentrace v plazmě korelují se stupněm obezity. [27]
PAI-1	adipocyty	Jeho zvýšené hladiny v plazmě provázejí obezitu. Patrně má vztah k inzulinové resistenci. [28]
Angiotensin/ Angiotensinogen II	adipocyty	Účastní se zánětlivého procesu v cévním endothelu při rozvoji aterosklerózy. Jeho zvýšené plazmatické koncentrace provázejí obezitu. [29]

velikostí adipocytů, BMI a expresí adipokinů podílejících se na zánětlivé reakci (např. IL6 a TNF- $\alpha$ ) [22-24]. Adipocyty produkované cytokiny nejen že povzbuzují infiltraci makrofágů do tukové tkáně, ale navíc bylo pokusy in vitro prokázáno, že je udržují aktivované ve stavu zánětlivé reakce. [25] Důkazů, že makrofágy usazené v tukové tkáni jsou primárním zdrojem zánětlivých cytokinů neustále přibývá. Nicméně mechanismus tohoto jevu je zatím neznámý. Stejně tak všechny jeho konsekvence. Přehled adipokinů účastnících se zánětlivých procesů v tukové tkáni je shrnut v tabulce 2.

Zánětlivé procesy bílé tukové tkáně narušují její schopnost udržovat fyziologické hladiny nenasycených mastných kyselin v plazmě, zvyšují negativně působící část její endokrinní funkce a v konci mohou vést k inzulinové resistenci, zhoršené glukózové toleranci a mohou vyústit až v diabetes 2. typu a kardiovaskulární onemocnění. Nepříznivé změny v expresi adipokinů vázané na obezitu, konkrétně zvýšené hladiny TNF- $\alpha$ , IL-6, resistinu, PAI-1 a leptinu a snížené hladiny adiponectinu mají vliv, kromě zmíněné glukózové homeo-

stázy, i na vaskulární endotheliální funkci a na koagulační systém, čímž urychlují aterosklerózu. Adipokiny a zánětlivý stav tukové tkáně by mohly být rovněž pojítkem mezi obezitou, inzulinovou rezistencí a kardiovaskulárními onemocněními.

### Genetická analýza metabolického syndromu

Metabolický syndrom se všemi jeho dílčími projevy je komplexní onemocnění s typicky multigenním základem. Odhalení odpovědných genů, jejich úloh a vzájemného působení je díky obrovské genetické diverzitě a nekontrolovatelným vlivům vnějšího prostředí v lidské populaci prakticky nemožný úkol. Řešení tohoto problému skýtá použití zvířecích modelů, které umožňují kontrolu genetických faktorů a faktorů prostředí. Genetické analýzy potkaních modelů představují výhodný nástroj identifikace genetických determinant zodpovědných za fenotypové projevy onemocnění, zejména s ohledem na pokrok učiněný v mapování potkaního genomu. Interpolaci takto získaných výsledků na člověka je třeba provádět s jistou opatrností, avšak odhalení zajímavých genů u potkaních modelů

umožní rychlou identifikaci homologních oblastí v lidském genomu, kde se mohou nacházet geny odpovědné za lidské choroby.<sup>[30, 31]</sup>

## Literatura

1. WHO, *Zpráva světové zdravotnické organizace, The Diabetes Programme*, <http://www.who.int/diabetes/en/>. 2004.
2. Groop L., et al.: *J. Inter. Med.*, 2001. **250**: p. 105-120.
3. Alberti K.G. et al.: *Diabet Med.*, 1998. **15**: p. 539-53.
4. Musil J.: *Molekulové základy klinické biochemie*, ed. Grada. 1994, Praha.
5. Hainer V. et al.: *Základy klinické obezitologie*. 1 ed. Avicem. Vol. 1. 2004, Praha: Grada Publishing a.s. 356.
6. Svačina, *Obezita a diabetes*. 2000: Maxdorf.
7. Reaven G.M. et al., eds.: *Insulin Resistance The Metabolic Syndrome X*. Contemporary Endocrinology. 1999, Humana Press: New Jersey.
8. Bartoš V. et al.: *Praktická diabetologie*. 3rd ed. Vol. 1. 2003, Praha: Maxdorf. 479.
9. Wajchenberg B.L.: *Endocrine Rev.*, 2000. **21**: p. 697-738.
10. Rosen E.D. et al.: *Nat. Rev. Mol. Cel. Biol.*, 2006. **7**: p. 855-896.
11. Gesta S., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006. **103**: p. 6676-6681.
12. He Q., et al.: *J. Nutr.*, 2005. **135**: p. 2549-2557.
13. Klein S., et al.: *N. Engl. J. Med.*, 2004. **350**: p. 2549-2557.
14. Laviola L., et al.: *Diabetes*, 2006. **55**: p. 952-961.
15. Romijn J.A. et al.: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2005. **8**: p. 440-444.
16. Fukuhara A., et al.: *Science*, 2005. **307**: p. 426-430.
17. Van Harmelen V., et al.: *J. Biol. Chem.*, 1999. **274**: p. 18243-18251.
18. Yang Q., et al.: *Nature*, 2005. **436**: p. 356-362.
19. Hida K., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005. **102**: p. 10610-10615.
20. Yang R.Z., et al.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2006. **290**: p. E1253-E1261.
21. Lee K., et al.: *J. Clin. Invest.*, 2003. **111**: p. 453-461.
22. Weiseberg S.P., et al.: *J. Clin. Invest.*, 2003. **112**: p. 1796-1808.
23. Xu H., et al.: *J. Clin. Invest.*, 2003. **112**: p. 1821-1830.
24. Neels J.G., et al.: *J. Clin. Invest.*, 2006. **116**: p. 33-35.
25. Berg A.H., et al.: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2004. **287**: p. E1178-E1188.
26. Fain., H.N., et al.: *Endocrinology*, 2004. **145**: p. 2273-2282.
27. Sell H., et al.: *Endocrinology*, 2006. **147**: p. 2458-2467.
28. Alessi M.C., et al.: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2006. **26**: p. 2200-2207.
29. Karlsson C., et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998. **83**: p. 3925-3929.
30. St. Lezin E.M., et al.: *Trends Cardiovasc. Med.*, 1993. **3**: p. 119-123.
31. Kurtz T. et al.: *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1992. **3**: p. 28-34.

## Poděkování:

Tato práce byla finančně podpořena grantovým výzkumným záměrem MSM 6046137305

# VYUŽITÍ RODU *PSEUDOMONAS* PRO BIODEGRADACI NITROTOLUENŮ

Tereza Hudcová

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

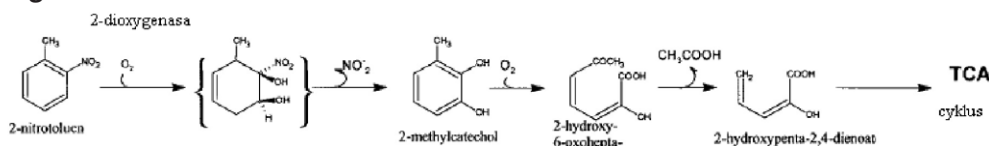
Studium mikrobiální biodegradace nitrotoluenů (NT) je motivováno potřebou odstranit tyto xenobiotické látky ze životního prostředí.<sup>[1]</sup> Ačkoliv NT vznikají i jako sekundární metabolity mikroorganismů, v drtivě většině jsou jejich zdrojem v přírodě antropogenní aktivity. Přítomnost většiny nitroaromatických sloučenin v životním prostředí je důsledkem rozsáhlé kontaminace pocházející z průmyslových odvětví, které se zabývají především výrobou výbušnin, barviv, pesticidů, farmaceutických preparátů a polymerů, kde tyto látky slouží jako základní suroviny.<sup>[2]</sup>

I přes to, že se NT vyskytují v přírodě poměrně krátkou dobu, byly v kontaminovaných oblastech nalezeny mikro-

organismy vykazující adaptaci na tyto látky. Tedy mikroorganismy, které jsou schopny využívat nitroaromáty jako zdroj uhlíku, dusíku a energie, jinými slovy, mají schopnost je mineralizovat. Tyto mikroorganismy lze izolovat z kontaminovaných území a použít pro bioremediace. Vhodnou populací může být i aktivovaný kal z čistíren odpadních vod zpracovávajících vodu z provozů, kde se nitrotolueny používají ve výrobním procesu. Jelikož mikroorganismy obecně disponují bohatým katabolickým potenciálem pro řadu přirozených i syntetických sloučenin a lze je často považovat za spolehlivé, jejich evoluční potenciál a genetická flexibilita umožnily vytvoření nových katabolických drah pro degradaci nitrotoluenů.<sup>[3,4]</sup>

Zástupci rodu *Pseudomonas* patří mezi všudy přítomné mikroorganismy s nenáročnými nutričními požadavky, schopné využívat širokou paletu uhlíkatých substrátů, které mohou využít díky plasticitě svého enzymového vybavení chemoautotrofa, proliferujícího za aerobních, mezofilních podmínek, v pH neutrálním prostředí. Lze tedy říci, že se jedná o mikroorganismus vhodný pro využití v biodegradčních procesech.<sup>[5,6]</sup>

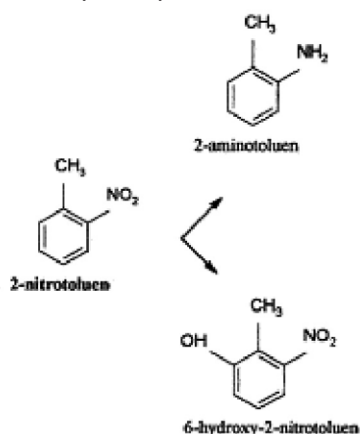
### Degradace 2-nitrotoluenu



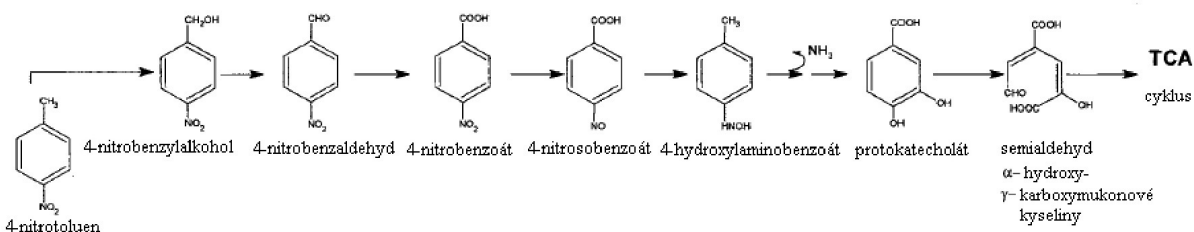
Obr. 1. Aerobní degradační dráha 2-nitrotoluenu<sup>[7]</sup>

Kmen *Pseudomonas* JS42 využívá za aerobních podmínek enzym 2-nitrotoluen-2,3-dioxygenasu ke konverzi 2-nitrotoluenu na nestabilní meziprodukt, který spontánně přechází na 2-methylcatechol. Při této reakci dojde k uvolnění  $\text{NO}_2^-$  (Obr. 1). Enzym 2-methylcatechol-2,3-dioxygenasa následně do molekuly včlení další  $\text{O}_2$ , dochází k rozštěpení aromatického jádra a uvolní se 1 molekula acetátu a 2-hydroxypenta-2,4-dienoát. Ten následně vstupuje do běžných metabolických drah (Obr. 1). Parales a kol. provedli rovněž purifikaci, charakterizaci a krystalizaci komponent 2-NT dioxygenasového aparátu.<sup>[8]</sup>

Walia a kol. sledovali vliv nitroskupiny na biotransformaci nitrotoluenů u *Pseudomonas putida* kmene OU83. Tento kmen byl izolován z půdy kontaminované substituovanými aromatickými sloučeninami. V případě 2-nitrotoluenu byla nitroskupina v pozici 2 redukována na aminoskupinu nebo byl aromatický kruh hydroxylován v pozici 6 (Obr. 2).



Obr. 2. Degradační dráha 2-nitrotoluenu: kmen *Pseudomonas putida*, rod OU83.<sup>[9]</sup>



Obr. 3. Degradační dráha 4-nitrotoluenu rod *Pseudomonas* kmen NT.<sup>[8]</sup>

Nejdůležitějším krokem v celé dráze je oxidace na 2-methylcatechol. Enzym 2-NT-2,3-dioxygenasa, se skládá ze tří podjednotek nezbytných pro katalýzu. Enzym využívá NAD(P)H a ionty železa jako kofaktory. 2-NT-2,3-dioxygenasa kmene OU83 vykazuje širší specifitu k substrátům a katalyzuje dioxygenace a monooxygenace více aromatických sloučenin (mezi tyto substráty patří například 2,4,5-trichloronitrobenzen, 2,4-dinitrotoluen a 1,3-dinitrobenzen).<sup>[10]</sup>

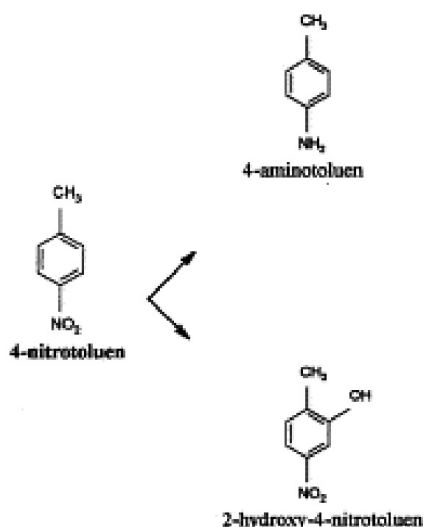
Haigler a kol. izolovali zástupce rodu *Pseudomonas* z půdy kontaminované nitrobenzeny s použitím 2-nitrotoluenu jako zdroje uhlíku, energie i dusíku.<sup>[10]</sup> Autoři provedli podrobnou analýzu fyziologických vlast-

ností izolovaného kmene, která poukázala na schopnost produkovat specifickou dioxygenasu. Ta přeměňuje 2-nitrotoluen na 2-methylcatechol a dusitan, který je uvolněn do prostředí. 2-methylcatechol je aromatickým meziproduktem, který podléhá oxidaci. Jeho rozštěpení může proběhnout dvěma způsoby: *orto*- nebo *meta*-štěpením. *Orto*-štěpením je catechol oxidován tak, že se rozštěpí vazba mezi uhlíky nesoucími hydroxylové skupiny, za vzniku *cis*, *cis* mukonové kyseliny. Při štěpení *meta*-drahou vzniká semialdehyd 2-hydroxymukonové kyseliny. Enzymy *meta*-degradační dráhy mají širší substrátovou specifitu než enzymy *orto*-dráhy a způsob otevírání aromatického kruhu probíhající různě u různých druhů se jeví jako význačný taxonomický rys. Přitom geny kódující enzymy *meta*-dráhy jsou obvykle lokalizovány na plazmidech (to však nemusí být pravidlem). 2-methylcatechol je dále štěpen v *meta* štěpící dráze. I tyto výsledky potvrzují význam dioxygenas při mikrobiální degradaci nitroaromatických sloučenin.<sup>[10]</sup>

### Degradace 4-nitrotoluenu

Degradační dráha 4-nitrotoluenu prokázána u rodu *Pseudomonas*, je tzv. „cesta aerobní oxidace methylové skupiny“. Methylová skupina je postupně oxidována až na karboxylovou a ve vzniklém 4-nitrobenzoátu je pak nitroskupina redukována za vzniku 4-hydroxylaminobenzoátu. Po uvolnění  $\text{NH}_3$ , vzniká protocatecholát a dochází k rozštěpení aromatického kruhu. Tuto dráhu pro degradaci 4-NT využívá např. kmen *Pseudomonas* TW3 (Obr. 3). Williams a kol. izolovali 11 druhů rodu *Pseudomonas* rostoucí na 4-nitrotoluenu. Všechny izolované druhy byly schopny využívat 4-nitrotoluen jako růstový substrát, stejně jako 4-nitrobenzylalkohol nebo 4-nitro-

benzoát.<sup>[11]</sup> Walia a kol. (2003) sledovali vliv nitroskupiny na biotransformaci nitrotoluenů u *Pseudomonas putida* kmene OU83. V případě 4-nitrotolueny byla nitroskupina v pozici 4 redukována na aminoskupinu a nebo byl aromatický kruh hydroxylován v pozici 2 (Obr. 4).



Obr. 4. Degradační dráha 4-nitrotoluen: kmen *Pseudomonas putida* OU83.<sup>[9]</sup>

#### Degradace 2,4-dinitrotolueny

Michán a kol.<sup>[16]</sup> vytvořili transkonjugací hybridní kmen *P. fluorescens* 410PR(pWW0Δpm) obsahující TOL pWW0Δpm plasmid izolovaný z *P. putida* 2240

(pWW0Δpm) a hybridní kmen byl tak oproti parentálnímu schopen přeměny 4-nitrotolueny na 4-nitrobenzen (Obr. 5). Spanggord a kol.<sup>[12]</sup> izolovali *Pseudomonas* sp. kmen DNT z čtyřčlenného konsorcia obohaceného o 2,4-dinitrotoluen (2,4-DNT). Izolovaný kmen byl schopen využívat 2,4-DNT jako zdroj uhlíku a energie a byla zjištěna tvorba stechiometricky odpovídajícího množství dusitanu (2 mol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> na 1 mol DNT), dokládající probíhající mineralizaci.<sup>[13]</sup>

Pro některé kmene *Pseudomonas* sp. tedy může být 2,4-DNT růstovým substrátem. 2,4-DNT dioxygenasa zavádí hydroxylové skupiny na pozici 4 a 5 a nitroskupina je neenzymaticky eliminována ve formě dusitanu. Gen pro 2,4-DNT dioxygenasu je u kmene *Pseudomonas* sp. DNT extrachromosomální.<sup>[13,14]</sup>

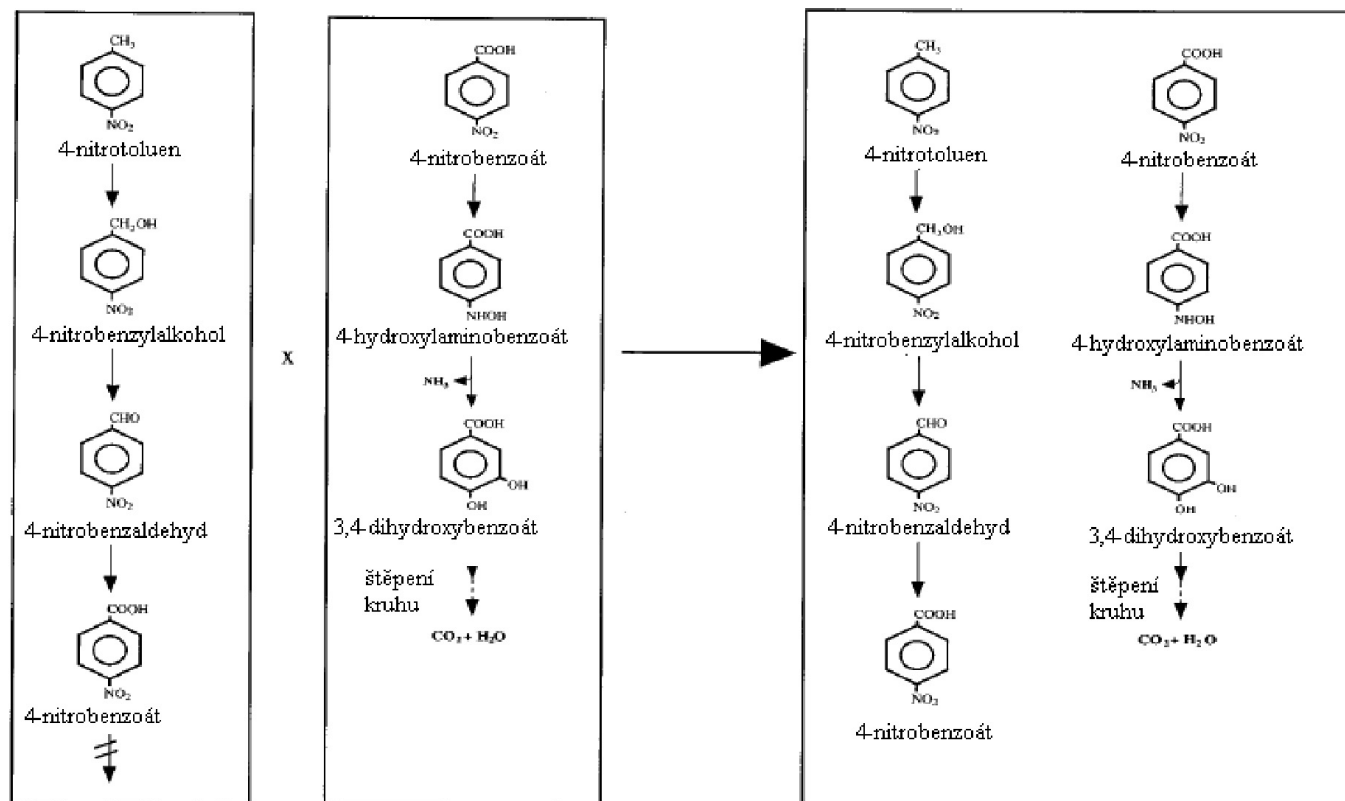
Oxidace aromatického kruhu nitrotolueny může probíhat i bez primárního odstranění nitroskupiny. Např. toluen dioxygenasa z *Pseudomonas putida* kmen FI oxiduje 4-nitrotoluen na 2-methyl-5-nitrofenol a rod *Pseudomonas* JS150 oxiduje 4-nitrotoluen na 2-methyl-6-nitrokatechol. V těchto případech však nedochází k následnému štěpení aromatického jádra (Obr. 7).<sup>[15]</sup>

Wali a kol. identifikovali metabolity produkované kmenem *Pseudomonas putida* OU83 při degradaci 2,4-DNT a zaměřili se rovněž na stanovení mutagenity těchto produktů. Podíl transformovaného substrátu představoval po 48 hodinách 98 % u 2,4-DNT, 75 % u 3,4-DNT a 40 % u 2,6-DNT. Výsledkem biotransformace u klidových buněk OU83, kultivovaných

*P. putida* 2440 (pWW0Δpm)

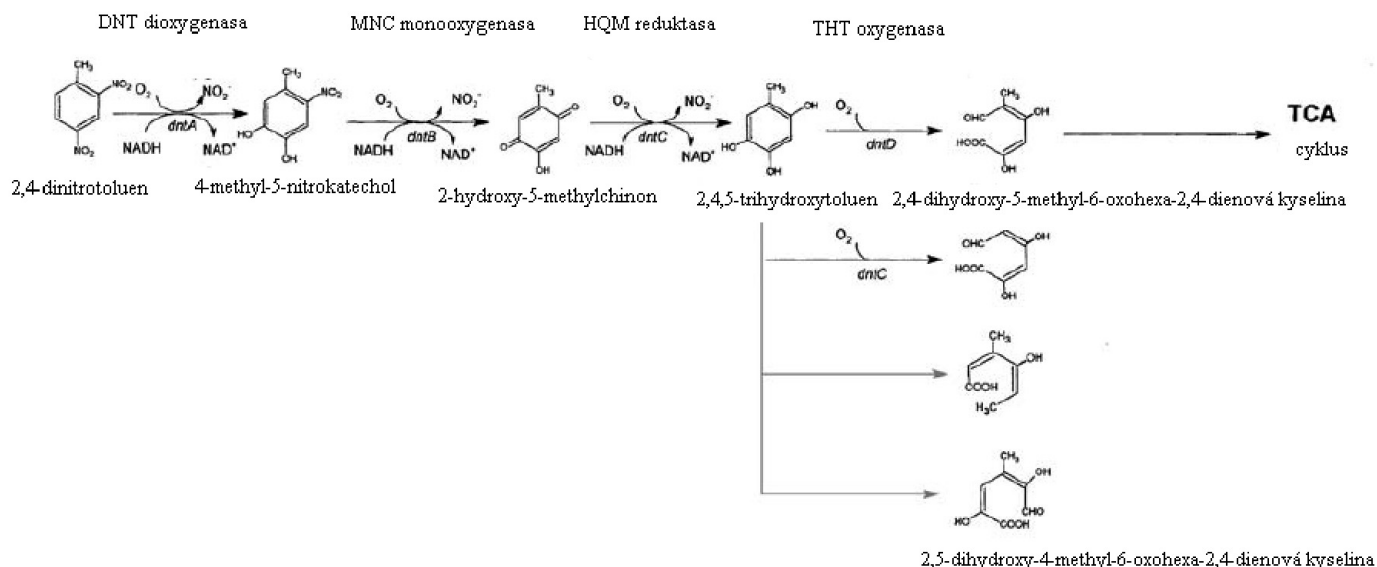
*P. fluorescens* 410P

*P. fluorescens* 410PRif (pWW0Δpm)



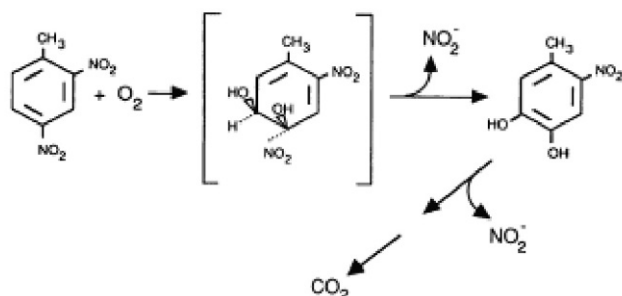
Obr. 5. Degradační dráha 4-nitrotolueny: kmen *P. fluorescens* 410PR(pWW0Δpm).<sup>[12]</sup>





Obr. 6. Aerobní degradační dráha 2,4-DNT.<sup>[17]</sup>

v médiu s dinitrotolueny jako jediným zdrojem uhlíku a energie, byly potenciálně nebezpečné produkty. Na základě GS-MS analýzy byly jako produkty transformace 2,4-DNT, 3,4-DNT a 2,6-DNT zjištěny 4-methyl-3-nitroanilin, 4-methyl-2-nitroanilin a 2-methyl-3-nitroanilin. Mutagenita metabolitů 2,4-dinitrotolueny byla zjišťována pomocí *Salmonella typhimurium* kmen TA98 a tento test ukázal, že metabolity 2,4-dinitrotoluenů jsou promutagenní.<sup>[16]</sup>



Obr. 7. Výchozí krok při degradaci 2,4-DNT.<sup>[13]</sup>

Monti a kol. ve své práci použili nepatogenní psychrotolerantní rhizogenní kmen *Pseudomonas fluorescens* ATCC 1740, který ve své genetické výbavě disponuje úplnou degradační dráhou pro 2,4-DNT. Cílem jejich práce bylo vytvořit mutantní kmen, který bude 2,4-DNT degradovat přednostně, ne tedy pouze jako kosubstrát. Výsledný kmen *P. fluorescens* RE byl vytvořen vložením *dnt* genů z rodu *Burkholderia* sp. kmen DNT do původního kmene *Pseudomonas fluorescens* ATCC 1740. Nově vzniklý kmen byl schopen degradovat 2,4-DNT při nízké teplotě a redukovat tak jeho toxicitu pro rostliny s nimiž žije v symbióze; tato vlastnost navíc byla velmi stabilní.<sup>[17]</sup>

Tato práce vznikla za podpory GAČR (projekt č. 104/05/0194) a Ministerstva školství České republiky (projekt MSM 6046137305).

## Literatura:

1. Philp J.C., Atlas R.M., Cunningham C.J.: Bioremediation. Electronic Encyclopaedia of the Life Sciences, Nature Publishing Group, London, (dostupné na 5.4. 2007).
2. Rieger P. G., Meier H. M., Gerle M.: Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. Journal of Biotechnology 94, s.101–123 (2002).
3. Toze S., Zappia L.: Microbial degradation of munition compounds in production wastewater. Water Research 33, s.3040-3045 (1999).
4. Spain J.C., Hughes J.B., Knackmuss H.J.: Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. ISBN: 1-56670-522-3, Lewis Publisher 2000.
5. <http://textbookofbacteriology.net/Pseudomonas.etc.html>. Citováno 12. 10. 2007
6. Garrity G. M., Boone D.R.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vydavatelství Springer, 2001.
7. Jing Ye, Singh A., Ward O.P.: Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics. World Journal of Microbiology & Biotechnology 20, s.117–135 (2004).
8. Parales J.V., Parales R.E., Resnick S.M., Gibson D.T.: Enzyme specificity of 2-nitrotoluene 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain JS42 is determined by the C-terminal region of the a subunit of the oxygenase component. Journal of bacteriology 180, s.1194-1199 (1998).
9. Walia S. K., Ali-Sadat S., Chaudhry R.: Influence of nitro group on biotransformation of nitrotoluenes in *Pseudomonas putida* strain OU83. Pesticide Biochemistry and Physiology 76, s. 73-81 (2003).

**Literatura (pokračování):**

10. Haigler B., Wallace W., Spain J.C.: Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JS42. Applied and Environmental Mikrobiology 60, s.3466-3469 (1994)
11. Williams W., Taylor S., Williams R.: A novel pathway for the catabolism of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas*. J. Gen. Microbiol.139, s.1967-1972 (1993).
12. Michán C., Delgado A., Haëdour A., Lucchesi G., Ramos J. L.: In Vivo Construction of a Hybrid Pathway for Metabolism of 4-Nitrotoluene in *Pseudomonas fluorescens*. Journal of Bakteriology, s. 3036-3038 (1997).
13. Spanggord R. J., Spain J. C., Nishino S. F., Mortelmans K. E.: Biodegradation of 2,4-Dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp.. Applied and Environmental Mikrobiology 57, s.3200-3205 (1991).
14. Suen W.C.,Spain J.C.: Cloning and characterization of *Pseudomonas* sp. strain DNT genes for 2,4-dinitrotoluene degradation. Journal of Bacteriology 175, s.1831-1837 (1993).
15. Ali-Sadat S., Mohan K.S., Walia S.K.: A novel pathway for biodegradation of 4-nitrotoluene in *Pseudomonas putida*. FEMS Microbiol. Ecology 17, s.169-176 (1995)
16. Walia S. K., Ali-Sadat S., Brar R., Chaudhry G. R.: Identification and Mutagenicity of dinitrotoluene metabolites produced by strain *Pseudomonas putida* strain OU83. Pesticide Biochemistry and Physiology 73, s. 131-139 (2002).
17. Monti M. R., Smania A. M., Alvarez M. E., Argaraña C. E.: Engineering *Pseudomonas fluorescens* for Biodegradatin 2,4-Dinitrotoluene. Applied and Environmental Mikrobiology 71 (12), s. 8864-8872 (2005).

**DO NOVÉHO ROKU**

**PŘEJE**

**VŠE NEJLEPŠÍ**

**BIOTECHNOLOGICKÁ  
SPOLEČNOST**

## O B S A H

Káš J.: <b>Úvodem</b>	49
Roudná M.: <b>Projekty zaměřené na biologickou bezpečnost</b>	50
Káš J.: <b>Pro všechny zájemce o imunochemické techniky</b>	50
Laštůvková H.: <b>Genetická modulace biosyntézy etylénu v rostlinách</b>	51
Novák V.: <b>Biologická degradace skládkového plynu</b>	53
Mlejnek P., Zídková J., Sajdok J.: <b>Metabolický syndrom</b>	56
Hudcová T.: <b>Využití rodu <i>Pseudomonas</i> pro biodegradaci nitrotoluénů</b>	60

## C O N T E N T S

Káš J.: <b>Editorial</b>	49
Roudná M.: <b>Projects oriented on biosafety</b>	50
Káš J.: <b>For all interested in immunochemistry</b>	50
Laštůvková H.: <b>Genetic modulation of ethylene biosynthesis in plants</b>	51
Novák V.: <b>Biological degradation of the landfill biogas</b>	53
Mlejnek P., Zídková J., Sajdok J.: <b>Metabolic syndrom X</b>	56
Hudcová T.: <b>Application of the genus <i>Pseudomonas</i> for biodegradation of nitrotoluenes</b>	60

## POKYNY PRO AUTORY

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

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

Děkuji

L. Fukal

**BIOTECHNOLOGICKÁ  
SPOLEČNOST**  
166 28 Praha 6, Technická 3

**ISSN 1210-1737**

**Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností**

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