



ZBORNÍK PRÍSPEVKOV

1. KONFERENCIE CENTRA EXCELENTNOSTI PRE BIELO-ZELENÚ BIOTECHNOLÓGIU



Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2

28. november 2012

Recenzent

Ing. Monošík PhD. rasto.monosik@gmail.com

Editor

Ing. Pátoprstý PhD. chempaty@savba.sk

Ing. Vlčková chemvlko@savba.sk

ISBN 978 – 80 – 971156 – 1 - 6



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja



Agentúra
Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu SR
pre štrukturálne fondy EÚ

Projekt:

Centrum excelentnosti pre pre bielo – zelenú biotechnológiu

ITMS: 26220120054

Prijímateľ:

Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava

Partner projektu:

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

**”Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku / Projekt je
spolufinancovaný zo zdrojov ES”**

ZOZNAM PRÍSPEVKOV:

1. Charakterizácia fluorescenčne značených akceptorových substrátov rastlinných transglykozyláz

Pavel Řehulka^a, Mária Matulová^b, Helena Řehulková^a, Vladimír Farkaš^b, Zuzana Zemková^b a Eva Stratilová^{b,*}

2. Potvrdenie heterotransglykozylačných aktivít v extraktoch z klíčiach semien kapucínky stanovených dot-blot metódou kvapalinovou chromatografiou

Soňa Garajová^a, Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Jiří Šalplachta^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

3. Stanovenie nových heterotransglykozylačných aktivít v extraktoch z klíčiach semien kapucínky I - akceptorové substráty

Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Dagmar Benkovská^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová

4. Stanovenie nových heterotransglykozylačných aktivít v extraktoch z klíčiach semien kapucínky II - donorové substráty

Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Dagmar Benkovská^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová

5. Stanovenie heterotransglykozylačných aktivít katalyzovaných proteínovými extraktami získanými z nadzemných častí *Tropaeolum majus*

Soňa Garajová^a, Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Jiří Šalplachta^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

6. Substrátová špecificita xyloglukánendotransglykozylázy z koreňov petržlenu (*Petroselinum crispum*)

Soňa Garajová^a, Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Jiří Šalplachta^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

7. Identifikácia nových akceptorových substrátov pre transglykozylačné reakcie katalyzované proteínovými extraktami z klíčiach semien petržlenu

Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Dagmar Benkovská^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová

8. Stanovenie donorových substrátov pre transglykozylázy z proteínových extraktov klíčiach semien petržlenu

Zuzana Zemková^a, Soňa Garajová^a, Dana Flodrová^b, Dagmar Benkovská^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

9. In vivo lokalizácia zabudovania značených oligosacharidov do štruktúr rastlinnej bunky

Zuzana Zemková, Renáta Vadkertiová, Ivan Zelko, Vladimír Farkaš a Eva Stratilová*

10. In vivo lokalizácia zabudovania značených oligosacharidov do štruktúr rastlinnej bunky II. – celooligosacharidy, manooligosacharidy, arabinogalaktooligosacharidy, arabinoxyloligosacharidy, galaktomanooligosacharidy

Zuzana Zemková, Ivan Zelko, Danica Kučerová, Renáta Vadkertiová, Vladimír Farkaš a Eva Stratilová*

11. Porovnanie foriem xyloglukánendotransglykozylázy v rôznych častiach dvojklíčnolistových rastlín

Soňa Garajová, Fairouz Ait Mohand, Zuzana Zemková, Vladimír Farkaš a Eva Stratilová*

12. Combined Chemical, Biological and Theoretical DFT-QTAIM Study of Potent Glycosidase Inhibitors Based on Quaternary Indolizinium Salts

Peter Šafář,^[a,b] Jozefína Žúžiová,^[b] Štefan Marchalín,^[b] Nadežda Prónayová,^[c] Ľubomír Švorc,^[d] Viktor Vrábel,^[d] Sergej Šesták,^[e] Dubravko Rendić,^[f] Vincent Tognetti,^[g] Laurent Joubert,^[g] and Adam Dařch^[a]

13. The role of phosphorylation of Ire1p for the sensing of endoplasmic reticulum stress

Sergej Šesták^a, Miroslava Droppová^a, Jakub Boška^a, Ahmed A. Ali^b, Martin Schröder^b

14. Evolučné štúdie polyfosfátkináz

Lucia Achbergerová a Jozef Nahálka*

15. Antioxidačná aktivita polysacharidov z listov Fallopie sachalinensis

Zdenka Hromádková*, Zuzana Košťálová

16. Antitusicky aktívne polysacharidy z listov Fallopie sachalinensis

Zdenka Hromádková^{1*}, Zuzana Košťálová¹, Ľubomír Jureček², Gabriela Nosáľová²

17. Využitie tekvicovej biomasy

Zuzana Košťálová*, Zdenka Hromádková,

18. Využitie povrchovej plazmovej rezonancie na štúdium interakcie lektín-glykoproteín

J.Katrlík^a, R.Škrabana^b D.Mislovičová^{a,c}, P.Gemeiner^a

19. Príprava neoglykoproteínov mananu za účelom zvýšenia ich antioxidačnej and antimutagénnej aktivity.

L. Križková^a D. Mislovičová^{b,c}, J. Masárová^b, V.Sasinková^b

20. Príprava manan neoglykoproteínov a ich charakterizácia

D.Mislovičová^{a,b}, J.Masárová^a

21. Interakcia Concanavalinu A s neoglykoproteínmi MBSA a MPGA

D.Mislovičová^{a,b}, J.Masárová^a, J.Švitel^c

22. Glykozylácia penicilin G acylázy Escherichia coli s kvasinkovým mananom za účelom zvýšenia jej stability

J.Masárová^a, D.Mislovičová^{a,b}

23. Spracovanie chitin-glukánu vysoko-energetickým ultrazvukom za účelom prípravy vodorozpustných frakcií a ich charakterizácia s HPLC

Danica Mislovičová^{a,b}, Jana Masárová^a, Katarína Bendžálova^c, Ladislav Šoltés^d

24. Levels of antimicrobial peptide defensin1 vary in larval jellies in honeybee colonies.

Jaroslav Klaudivy^{*a}, Katarína Bachanová^a, Lenka Kohútová^a, Mária Dzúrová^a, Ján Kopernický^b, Juraj Majtán^c

25. Syntéza sialových kyselín pomocou zosieťovaných inklúzných teliesok

Klaudia Talafová a Jozef Nahálka*

26. Enzymová syntéza substrátov pre sialylačné reakcie pomocou polyfosfátkinázy 3 (PPK3)

Klaudia Talafová a Jozef Nahálka*

[27. ¹H-NMR spektroskopia a dedičné poruchy metabolizmu - deficit guanidinoacetát metyltransferázy](#)

Uhliariková I.1, Matulová M.1, Behúlová D.2, Šalingová A.2, Kolníková M.3, Šaligová J.4, Potočnáková L.4

[28. Postgenomická analýza adaptácie ľanu siateho v černobyľskej oblasti využitím gélovej proteomiky](#)

Daša Gábrišová, Martin Hajduch

[29. Možné problémy súvisiace s 2-DE gémi v proteomickom výskume](#)

Michal Berčák, Martin Hajduch

[30. Kvantifikácia pšeničných proteínov rozpustných v alkohole bezgélovou proteomikou s využitím MS^E prístupu](#)

Ľubica Uváčková*, Ľudovít Škultéty, Martin Hajduch

[31. Využitie dvojrozmernej elektroforézy pri porovnávaní proteínových máp pšeničného zrna rôznych odrôd](#)

Soňa Fekecssová, Martin Hajduch

[32. Aureobasidium pullulans – a yeast-like microorganism with diverse biotechnological potential](#)

Peter Biely, Mária Vršanská

[33. Vývin semien ľanu v remediovanej oblasti v blízkosti Černobyľu](#)

Katarína Klubíková, Maksym Danchenko, Ľudovít Škultéty, Namik Rashydov, Martin Hajduch

[34. Diagnostika vírusového fytopatogéna ovocných drevín Prunus necrotic ringspot virus](#)

Július Rozák¹, Zdenka Gálová^{2,3}

[35. Instantná káva z hľadiska polysacharidov](#)

Peter Capek, Mária Matulová, Danica Mislovičová, Vlasta Sasinková, Luciano Navarini, Furio Suggi-Liverani

[36. Porovnanie výskytu PAU v tuhej a plynnej fáze](#)

Marián Schwarz

[37. Vplyv troposférického ozónu na hladinu celkového cholesterolu v krvi](#)

Marián Schwarz, Juraj Miššík

[38. Využitie liehovarníckych kvasiniek rodu Saccharomyces sp. na produkciu mikrobiálnej biomasy](#)

Dana Urminská, Silvia Šillerová, Anežka Poláková, Eva Szabová

[39. Príprava zinkom fortifikovanej kvasničnej biomasy ako možného potravinového doplnku](#)

Silvia Šillerová, Blažena Lavová, Dana Urminská, Anežka Poláková

[40. Bezpečnosť pôdy a poľnohospodárskej produkcie z pohľadu obsahu rizikových kovov v blízkosti priemyselných podnikov stredného povážia](#)

Alena Vollmannová, Dana Urminská, Peter Ježo, Július Árvay, Ľuboš Harangozo

41. Totálny obsah polyfenolov vo vybraných odrodách brusníc vo vzťahu k dobe mrazenia

Alena Vollmannová, Tomáš Tóth, Dana Urminská

42. Metalická záťaž pôdy vo vzťahu k obsahu rizikových kovov a polyfenolov v hľuzách zemiakov

Alena Vollmannová, Tomáš Tóth, Janette Musilová, Judita Bystrická

43. Vzťah celkových obsahov kadmia a zinku v zemiakových hľuzách a ich obsahov v rôznych frakciách sacharidov

Alena Vollmannová, Tomáš Tóth, Janette Musilová, Judita Bystrická

44. Analýza biotechnologicky významnej látky biosenzorom

Tkáč Ján*, Šefčovičová Jana, Gemeiner Peter

45. Využitie zlatých nanočastíc pri konštrukcii lektínového biosenzora

Bertók Tomáš*, Tkáč Ján

46. Využitie entalpického prevodníka pri analýze dihydroxyacetónu počas biotechnologickej transformácie z glycerolu

Tkáč Ján*, Gemeiner Peter

47. Využitie biosenzora na báze CNT nanokompozitu pri monitorovaní biotechnologického procesu etanolovej fermentácie

Tkáč Ján*, Filip Jaroslav, Šefčovičová Jana, Gemeiner Peter

48. Monitorovanie stresu počas rekombinantného biotechnologického procesu analýzou „heat shock“ proteínov

Tkáč Ján*, Nahálka Jozef

49. Sorbitolový biosenzor s využitím polysacharidového nanokompozitu

Tkáč Ján*, Šefčovičová Jana, Filip Jaroslav, Gemeiner Peter

50. Celiakálne aktívne bielkoviny v cereáliách a pseudocereáliách

Peter Socha, Dana Urminská*

51. Rizikové prvky v podmienkach intenzívneho hospodárenia

Tomáš Tóth, Alena Vollmannová, Dana Urminská

52. Príprava lektínového biosenzora s optimalizáciou hustoty lektínu

Bertók Tomáš*, Mislovičová Danica, Gemeiner Peter, Tkáč Ján

53. Polysacharidový nanokompozit ako sensor

Tkáč Ján*

54. Imunochemická analýza prolaminových bielkovín zrna cereálií a pseudocereálií

Peter Socha, Dana Urminská*, Barbara Mickowska¹

55. RIZIKÁ APLIKÁCIE KALOV NA OBSAH KADMIA A OLOVA V PÔDE

Tomáš Tóth, Dana Urminská, Juraj Miššík, Alena Vollmannová, Július Árvay

56. pH závislost jednotlivých aktivních center enzymu bilirubin oxidáza

Jaroslav Filip, Ján Tkáč*

57. On-line monitorovanie glycerolu počas biotechnologického procesu s využitím jednoduchého odberu vzoriek

Tkáč Ján*, Katrlík Jaroslav, Šefčovičová Jana, Gemeiner Peter

58. Biopristupnosť niklu v závislosti od fyzikálno-chemických vlastností pôdy

Tomáš Tóth, Alena Vollmannová, Dana Urminská

59. Zhodnotenie obsahu ťažkých kovov na vybraných pôdnych typoch a pestovaných plodinách v Podtatranskej oblasti

Tomáš Tóth, Dana Urminská, Juraj Miššík

60. On-line dezintegrácia fermentačných vzoriek na analýzu rekombinantného Proteinu

Tkáč Ján*, Jozef Nahálka

61. Elektrochemická charakteristika enzymu bilirubin oxidáza adsorbovaného na nanostukturovaném elektrodeovom rozhraní

Jaroslav Filip, Ján Tkáč*

62. ZDROJE SELÉNU VO VÝŽIVE OBYVATELSTVA

Tomáš Tóth, Dana Urminská, Juraj Miššík, Alena Vollmannová, Július Árvay

63. OBSAH KADMIA, OLOVA A NIKLU V POĽNOHOSPODÁRSKYCH PLODINÁCH V BLÍZKOSTI CHEMICKÉHO ZÁVODU CHEMKO STRÁŽSKE

Tomáš Tóth, Dana Urminská, Juraj Miššík, Alena Vollmannová, Július Árvay

64. Možnosti využitia zwitteriónov pri príprave biosenzora

Bertók Tomáš*, Kasák Peter, Tkáč Ján

65. Možnosti využitia lektínov v glykomike a diagnostike

Tkáč J. *, Bertók T., Katrlík J., Šefčovičová J., Šedivá A., Mislovičová D., Gemeiner P.

66. Galaktózový biosenzor založený na polysacharidovom nanokompozite

Tkáč Ján*

67. Konstrukce fruktóza-kyslíkové biobaterie s využitím uhlíkových nanomateriálů

Jaroslav Filip, Ján Tkáč*

68. Monitorovanie dihydroxyacetónu počas biotechnologickej konverzie z glycerolu

Tkáč Ján*, Nahálka Jozef, Gemeiner Peter

69. Monitorovanie etanolovej fermentácie mikrobiálnym biosenzorom

Tkáč Ján*, Nahálka Jozef, Gemeiner Peter

70. Monitorovanie skvasiteľných sacharidov počas biotechnologického procesu

Tkáč Ján*, Nahálka Jozef, Gemeiner Peter

71. Monitorovanie vzniku 1,3-propándiolu z glycerolu počas biotechnologického procesu mikrobiálnym biosenzorom

Tkáč Ján*, Katrlík Jaroslav, Šefčovičová Jana, Gemeiner Peter

72. Možnosti zhodnotenia banských a priemyselných odpadov na pigmenty

Marián Schwarz^{1,2}, Peter Sudovský¹, Petra Pulišová³

73. Pozitívna a negatívna ESI IT MSⁿ metyl 6-hydroxyhexanoyl α - a β -L-ramnozidov

Vladimír Pätoprstý^a, Vladimír Kováčik^a, Rina Saksena^b, Roberto Adamo^b, Pavol Kováč^b

74. Determination of Sodium Cation Adduct Positions to the Molecule of the Methyl 6-hydroxyhexanoyl Glycoside of Antrose.

Vladimír Pätoprstý^a, Vladimír Kováčik^a, Igor Tvaroška^a, Rina Saksena^b, Roberto Adamo^b, Pavol Kováč^b

75. ESI IT MS Fragmentation of Synthetic Analogs of the Tetrasaccharide Side Chain of the Major Glycoprotein of the *Bacillus anthracis* Exosporium.

Vladimír Pätoprstý^a, Vladimír Kováčik^a, Igor Tvaroška^a, Rina Saksena^b, Roberto Adamo^b, Pavol Kováč^b

76. Structural analysis of some diglycosylamines

Júlia Mičová¹, Vladimír Pätoprstý¹, Silvia Vlčková¹, Ľudovít Škultéty²

77. UNIQUE PATHWAY OF GLUCURONOXYLAN UTILIZATION BY *PICHTA STIPITIS*

Ryabova O., Kolenová K., Vršanská M., *Biely P.

78. Štruktúrna charakterizácia hyaluronanov modifikovaných účinkom tiolov

Eva Hrabárová*, Jozef Rychlý, Vlasta Sasinková, Katarína Valachová, Ivica Janigová, Katarína Csomorová, Ivo Juránek a Ladislav Šoltés

79. Voľnoradikálová degradácia vysokomolekulového hyaluronanu indukovaná askorbátom a iónmi medi. Hodnotenie antioxidačného účinku derivátov l-cysteínu.

Eva Hrabárová*, Katarína Valachová, Ivo Juránek a Ladislav Šoltés

80. Bakteriálne inklúzne telieska ako potenciálne syntetické nástroje na rozpoznávanie patogénu

Klaudia Talafová, Eva Hrabárová, Dušan Chorvát, Jozef Nahálka*

81. Bakteriálne inklúzne telieska ako potenciálne syntetické nástroje na uvoľňovanie proteínového terapeutika

Klaudia Talafová, Eva Hrabárová, Dušan Chorvát, Jozef Nahálka*

Charakterizácia fluorescenčne značených akceptorových substrátov rastlinných transglykozyláz

Pavel Řehulka^a, Mária Matulová^b, Helena Řehulková^a, Vladimír Farkaš^b, Zuzana Zemková^b a Eva Stratilová^{b,*}

^aÚstav molekulární patologie FVZ, Univerzita obrany, Třebešská 1575, CZ-50001 Hradec Králové, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko a Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

*chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

Fluorescenčné značenie, MALDI TOF, molárny absorpčný koeficient, ¹H- a ¹³C-NMR, oligosacharidy, TLC

Úvod

Mechanizmus transglykozylačných reakcií vyžaduje na stanovenie aktivity enzýmov katalyzujúcich takúto reakciu špeciálne substráty, ktoré sú derivatizované ľahko detegovateľnou značkou. Medzi takého patrí aj fluorescenčné značenie oligosacharidov na ich redukujúcom konci, ktoré môžu slúžiť ako akceptory transglykozylačných príp. heterotransglykozylačných reakcií (Farkaš a kol. 2005; Ait Mohand a Farkaš 2006). Metóda rýchlej prípravy (Kosík a Farkaš 2008) bola využitá pri príprave značených oligosacharidov pre stanovenie heterotransglykozylačných aktivít xyloglukán endotransglykozylázy, EC 2.4.1.207. Práve kinetická charakterizácia tohto enzýmu z kotyledonu *Tropaeolum majus* na akceptory s rôznymi fluorescenčnými značkami slúžila pre výber najvhodnejšej z nich (Kosík a kol. 2011).

Prípravené substráty boli charakterizované NMR, hmotnostnou spektrometriou, TLC a stanovením molárneho absorpčného koeficientu. Ako príklad slúži xyloglukán nonasacharid (XGO9) substituovaný AA, ANTS, SR a FITC a zmes pustulooligosacharidov substituovaných SR (PUOS-SR).

Materiál a metódy

Derivatizované produkty boli identifikované MALDI TOF a ¹H- a ¹³C-NMR.

MALDI-TOF hmotnostná spektrometria bola robená na Voyager DE STR (PerSeptive Biosystems, Framingham, USA) alebo 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, USA). 0.5 µl derivatizovaného oligosacharidu (500 ng/µl vody) sa zmiešalo s 0.5 µl α-kyano-4-hydroxyškoricovej kyseliny (10 mg/ml v acetonitril/voda = 3:2, v/v) na nerezovej doštičke a vysušilo. MS údaje boli získané v pozitívnom mode pre XGO9 a v negatívnom pre PUOS-SR a spracované Data Explorer softvérom v. 4.8 (Applied Biosystems).

Molárny absorpčný koeficient bol stanovený meraním absorbancie rôznych koncentrácií produktov derivatizácie pri optimálnej vlnovej dĺžke fluorofóru.

NMR spektrá boli merané na 600MHz VNMRS Varian vybavenom HCN ¹³C sondou v D₂O pri 25 °C. Vzorky oligosacharidov boli rozpustené v 99.98% D₂O a merané v mikrokapilárach. Pre rozlíšenie signálov (gCOSY, gTOCSY, gHSQCAD, gHMBCAD, gH2BC) nonasacharidu a jeho fluorescenčne značených derivátov sa použilo porovnanie získaných NMR dát s dátami pre xyloglukán oligosacharidy publikovanými York a kol. (1993).

Tenkovrstvová chromatografia produktov derivatizácie (TLC) v prípade použitia zmesi oligosacharidov bola robená na Silikagel 60 platniach (Merck, Nemecko) vyvíjaných dvakrát v zmesi in *n*-butanol:etanol:voda (5:3:2, obj.). Ako štandardy sa použili purifikované PUO3-SR, PUO5-SR, PUO6/7-SR a SR. Škvry boli vizualizované pod UV lampou.

Výsledky a diskusia

¹H- a ¹³C-NMR údaje pre XGO9 a jeho fluorescenčné deriváty sú sumarizované v Tab. 1. Získané NMR údaje potvrdili štruktúru xyloglukán nonasacharidu plne substituovanú zodpovedajúcim fluorofórom. Tab. 2 obsahuje údaje získané hmotnostnou spektrometriou a stanovením molárneho absorpčného koeficientu pre získané značené substráty.

Tab. 1. ¹H- a ¹³C-NMR údaje pre XGO9 a jeho fluorescenčné deriváty.

Sacharidová jednotka	H1/C1 chemické posuny (ppm)				
	XGO9	AA	ANTS	FITC	SR
1,2-αXyl	5.166	5.123/99.68	5.063/98.62	5.156/98.61	5.162/98.74
1,2-αXyl	5.158	5.097/99.45 5.032/99.63	4.852/99.08 4.824/98.23	5.118/98.46	5.141/98.54 5.062/98.25
αXyl-terminálna	4.929	4.889/98.23		4.932/98.22	4.908/98.04; 4.883/98.25
βGlc+βGal	4.58-4.49	4.446-4.373/105.59; 4.52-4.43/103.51	4.519/101.77; 4.435/104.87- 102.17; 4.163/104.38	4.562-4.378 /105.3- 102.4	4.517/104.25; 4.473/104.25; 4.493/102.44
βGal terminálna		4.492/105.36			
αGlc-red	5.211				
βGlc-red	4.653				
aromatický kruh		7.723/132.49; 6.703/116.99; 6.838/113.50; 7.336/133.33	8.503/124.52; 8.371/131.51; 7.671/114.81; 7.051/	7.754/124.85; 7.667/125.19; 7.604/126.15 7.320-7.18/131.524; 6.688-6.572/122.74; 6.647-6.65/104.07	8.575/125.87; 8,258/128.85; 7.575/131.60; 6.935/131.13 6.891/113.89; 6.788/95.47;

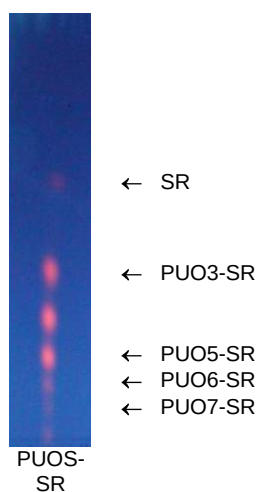
Výsledky hmotnostnej spektrometrie poukazujú na zhodu teoretických a nameraných údajov pre všetky derivatizované XGO9. Molárny absorpčný koeficient pre všetky fluorofóry klesol po naviazaní na XGO9 4,5-5 krát.

TLC zmesi PUOS-SR naznačili, že zmes je zložená najmä z oligosacharidov so stupňom polymerizácie medzi 3 a 6 so stopami PUO7-SR a SR (Obr. 1). PUO3-SR, PUO4-SR a PUO5-SR tvorili majoritný podiel. MS analýza potvrdila výsledok z TLC, ale našla aj PUO2-SR a stopy značeného monoméru (Tab. 3).

Tab. 2. Údaje pre XGO9 a jeho fluorescenčné deriváty získané hmotnostnou spektrometriou a stanovením molárneho absorpčného koeficientu.

Derivát XGO9	Vzorec	Mh kalk. (monoizotopická)	MALDI-TOF MS (m/z monoizotopická exp./teor.)	Molárny absorpčný koeficient vo vode (ε _{vlín.} dĺžka) [M ⁻¹ .cm ⁻¹]
XGO9-AA	C ₅₈ H ₉₃ NO ₄₄	1507.5070	1530.78 / 1530.4963 pre [C ₅₈ H ₉₃ NO ₄₄ + Na] ⁺	1800 (ε ₃₂₀)
XGO9-ANTS	C ₆₁ H ₉₃ NNa ₂ O ₅₁ S ₃	1797.3672	1842.49 / 1842.3384 pre [C ₆₁ H ₉₃ NNa ₂ O ₅₁ S ₃ - H +	2800 (ε ₃₅₆)

			$2\text{Na}]^+$	
XGO9-SR	$\text{C}_{78}\text{H}_{117}\text{N}_3\text{O}_{48}\text{S}_2$	1927.6248	1950.93 / 1950.6140 pre $[\text{C}_{78}\text{H}_{117}\text{N}_3\text{O}_{48}\text{S}_2 + \text{Na}]^+$	18100 (ϵ_{566})
XGO9-FITC	$\text{C}_{72}\text{H}_{100}\text{N}_2\text{O}_{47}\text{S}$	1776.5217	1799.45 / 1799.5109 pre $[\text{C}_{72}\text{H}_{100}\text{N}_2\text{O}_{47}\text{S} + \text{Na}]^+$	11500 (ϵ_{494})



Obr. 1. TLC analýza zmesi fluorescenčne značených pustulooligosacharidov. Ako štandardy boli použité purifikované PUO3-SR, PUO5-SR, PUO6/7-SR a SR.

Tab. 3. Charakterizácia zmesi PUOS-SR MALDI-TOF hmotnostnou spektrometriou.

Compound	Zloženie	Teor. m/z	Exp. m/z	Rel. výskyt [%]
PUO1-SR	$[\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2 - \text{H}]^-$	720.2266	720.218	1.59
PUO2-SR	$[\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{N}_3\text{O}_{16}\text{S}_2 - \text{H}]^-$	882.2794	882.305	2.68
PUO3-SR	$[\text{C}_{45}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_{21}\text{S}_2 - \text{H}]^-$	1044.3323	1044.363	29.90
PUO4-SR	$[\text{C}_{51}\text{H}_{73}\text{N}_3\text{O}_{26}\text{S}_2 - \text{H}]^-$	1206.3851	1206.423	35.09
PUO5-SR	$[\text{C}_{57}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{31}\text{S}_2 - \text{H}]^-$	1368.4379	1368.478	25.40
PUO6-SR	$[\text{C}_{63}\text{H}_{93}\text{N}_3\text{O}_{36}\text{S}_2 - \text{H}]^-$	1530.4907	1530.537	4.01
PUO7-SR	$[\text{C}_{69}\text{H}_{103}\text{N}_3\text{O}_{41}\text{S}_2 - \text{H}]^-$	1692.5436	1692.591	1.32

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a dlhodobého zámeru rozvoja organizácie 1011 Fakulty vojenského zdravotníctva Univerzity obrany Českej republiky.

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res.*, 341, 577-581.
- Farkaš, V., Ait Mohand, F., & Stratilová, E. (2005). *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 431-435.
- Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
- Kosík, O., Garajová, S., Matulová, M., Řehulka, P., Stratilová, E., & Farkaš, V. (2011). *Carbohydr. Res.*
- York, W.S., Harvey, L.K., Guillen, R., Albersheim, P., & Darvill, A.G. (1993). *Carbohydr. Res.* 248, 285-301.

Potvrdenie heterotransglykozylačných aktivít v extraktoch z klíčiach semien kapucínky stanovených dot-blot metódou kvapalinovou chromatografiou

Soňa Garajová^a, Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Jiří Šalplachta^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko a Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

^bÚstav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 967/97, CZ- 602 00 Brno, Česká republika

*chemevi@savba.sk

Klíčové slová

Heterotransglykozylácia, *Tropaeolum majus*, značené oligosacharidy, sulforodamín, HPLC, xyloglukánendotransglykozyláza

Úvod

Ait Mohand a Farkaš publikovali v roku 2006 nový typ transglykozylačnej reakcie, ktorá bola katalyzovaná surovým proteínovým extraktom z klíčiach semien kapucínky, tzv. heterotransglykozyláciou. Heterotransglykozylácia znamená prenos sacharidu s novovytvoreným redukujúcim koncom, ktorý vznikol v dôsledku štiepenia polysacharidu (donorový substrát) na štrukturálne odlišný sacharid (akceptorový substrát). Až v roku 2010 priradili Stratilová a kol. túto aktivitu, resp. aktivity, majoritnej forme xyloglukánendotransglykozylázy (XET, EC 2.4.1.207).

Na stanovenie transglykozylačných aktivít sa zvyknú využívať ako akceptorové substráty značené oligosacharidy (OS). V tejto práci boli použité OS fluorescenčne značené sulforodamínom (SR) podľa metódy vypracovanej Kosíkom a Farkašom (2008). Najbežnejšou metódou stanovenia aktivity je tzv. dot-blot metóda na papieri (Fry 1997), ktorej použitie môže byť limitované v prípade, keď značené OS interagujú s papierom alebo sa sorbujú na polysacharid alebo zložky proteínového precipitátu bez toho, aby prebehla transglykozylačná reakcia. Z tohto dôvodu je potrebné pozitívne výsledky overiť ďalšími metódami, ako napr. gélovou chromatografiou s využitím HPLC s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom, ako sme to urobili v tejto práci.

Materiál a metódy

Proteínový extrakt bol získaný z klíčiach semien kapucínky (kotyledon *Tropaeolum majus*). Ako akceptorové substráty sa použili 27,2 μ M roztoky OS odvodené od celulózy (CEOS), xylánu (XYLOS), laminarínu (LAOS), 1,3;1,4- β -glukánu (MLGOS), pustulánu (PUOS) a pre porovnanie aj xyloglukánu (XGOS). Ako donorový substrát bol použitý 0,3% roztok xyloglukánu (XG). Oligosacharidy boli značené sulforodamínom (SR).

Priebeh reakcie (miera zabudovávania OS-SR do polymérneho substrátu v závislosti od doby reakcie) bol sledovaný pomocou izokraticej gélovej chromatografie na Hewlett Packard 1100 systéme s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom kontrolovaným ChemStation softvérom (Agilent). Fluorescenčný detektor bol programovaný na excitačnú vlnovú dĺžku 530 nm a emisnú vlnovú dĺžku 575 nm. Analýzy boli robené na TSKgel G3000 SWXL kolóne, 7,8 x 300 mm (TosoHaas) pri teplote 24 °C. Kolóna bola kalibrovaná na XG detegovaný refraktometrom a XGOS-SR detegované fluorescenčným detektorom. Ako mobilná fáza bol použitý 100mM octan sodný pH 5.7 s 20% acetonitrilom. Prietoková rýchlosť bola 0.5 ml/min.

Výsledky a diskusia

Heterotransglykozylačné aktivity, ktoré boli stanovené v extraktoch z klíčiach semien kapucínky tzv. dot-blot metódou, sú znázornené v Tab. 1. Ako z tabuľky vyplýva, CEOS-SR, LAOS-SR, MLGOS-SR, XYLOS-SR a PUOS-SR boli schopné sa zabudovať do xyloglukánu (XG) alebo do jeho analógu hydroxyetylcelulózy (HEC) rovnako ako XGOS-SR, ktoré reprezentujú prirodzený substrát XET.

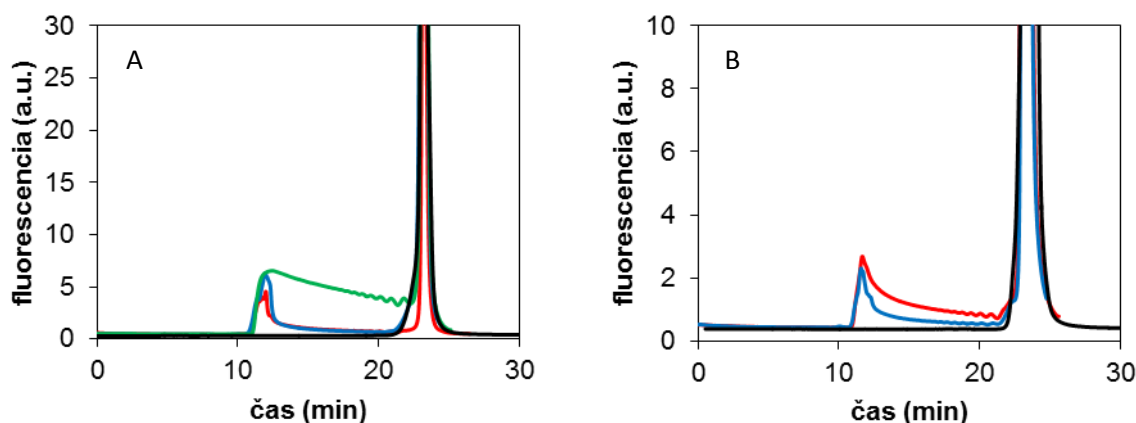
Tabuľka 1: Donor/akceptorové páry, pre ktoré bola v proteínovom extrakte z klíčiach semien kapucínky detegovaná fluorescenčnou metódou transglykozylačná aktivita.

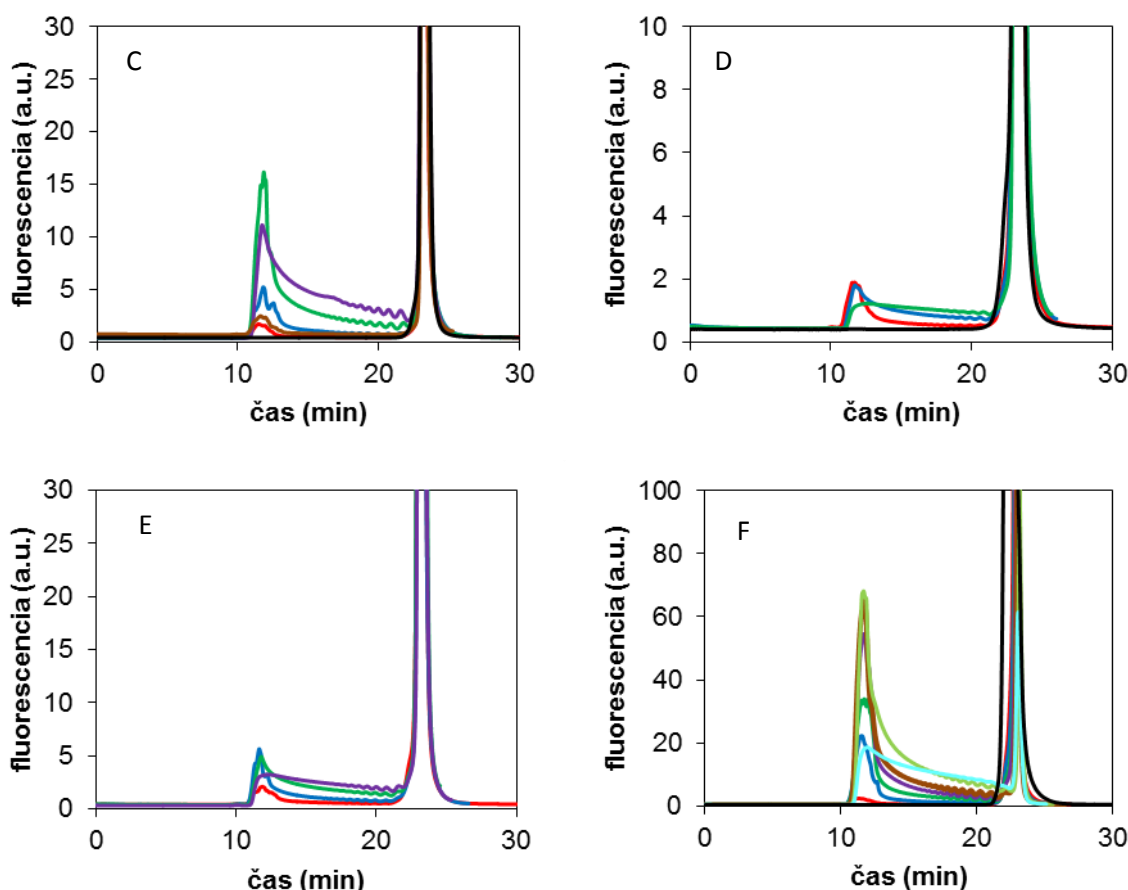
Donor	Akceptor
XG	XGOS-SR
	CEOS-SR
	XYLOS-SR
	LAOS-SR
	PUOS-SR
	MLGOS-SR
HEC	XGOS-SR
	XYLOS-SR
	LAOS-SR
	PUOS-SR
	MLGOS-SR

Na potvrdenie týchto reakcií sa použila metóda gélovej chromatografie s využitím HPLC zariadenia s refraktometrom na stanovenie zádržného objemu donorového substrátu (XG) a fluorescenčným detektorom na stanovenie zádržného objemu sacharidov obsahujúcich SR. Grafy (Obr. 1) zobrazujú zabudovávanie jednotlivých OS-SR do XG v závislosti od doby reakcie. Heterotransglykozylačné reakcie (Obr. 1 A-E) boli porovnané s typickou transglykozylačnou reakciou katalyzovanou XET na substrátový pár XG/XGOS-SR (Obr. 1 F).

Výsledky naznačujú, že efektivita heterotransglykozylačnej reakcie medzi XG ako donorom a jednotlivými akceptormi narastá v rade PUOS-SR (Obr. 1 D) < LAOS-SR (Obr. 1 B) < XYLOS-SR (Obr. 1 E) < CEOS-SR (Obr. 1 A) < MLGOS-SR (Obr. 1 C). Všetky reakcie sú v porovnaní s transglykozylačnou reakciou na substrátový pár XG/XGOS-SR (Obr. 1 F), ktorá je typická pre XET, pomalšie.

Pomocou mikroskopických metód (Vissenberg a kol. 2000; Ibatullin a kol. 2009) sa potvrdilo, že s výnimkou PUOS-SR sú tieto oligosacharidy schopné sa zabudovať aj do štruktúr bunkovej steny. PUOS-SR sa inkorporovali primárne do cytoplazmatickej membrány (Zemková a kol. 2012).





Obr. 1: Elučný profil reakčných zmesí pozostávajúci zo získaného proteínového extraktu z klíčiacych semien kapucínky a rozličných donor/akceptorových párov. A – XG/CEOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 16 hod, ■ - 26,5 hod, ■ - 72 hod), B - XG/LAOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 48 hod, ■ - 72 hod), C - XG/MLGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 3 hod, ■ - 5 hod, ■ - 16 hod, ■ - 48 hod, ■ - 72 hod), D - XG/PUOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 6 hod, ■ - 48 hod, ■ - 72 hod), E - XG/XYLOS-SR (■ - 5,5 hod, ■ - 16 hod, ■ - 48 hod, ■ - 72 hod), F - XG/XGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 1 min, ■ - 10 min, ■ - 0,5 hod, ■ - 1 hod, ■ - 3 hod, ■ - 16 hod, ■ - 72 hod). Koncentrácia použitých oligosacharidov bola 27,2 μM a XG 0,3%.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50 %) a finančnej podpore poskytnutej VEGA 2/0020/12 a ústavnou podporou RVO: 68081715 Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i..

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res*, 341, 577-581.
- Fry S.C. (1997). *Plant J.* 11, 1141–1150.
- Ibatullin, F.M., Banasiak, A., Baumann, M.J., Greffe, L., Takahashi, J., Mellerowicz, E.J., & Brumer, H. (2009). *Plant Physiol.*, 151, 1741-1750. Doi: 10.1104/pp.109.147439
- Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
- Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Řehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulková, H., & Farkaš, V. (2010). *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 207–215. Doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.016.
- Vissenberg, K., Martinez-Vilchez, I.M., Verbelen, J.P., Miller, J.G., & Fry, S.C. (2000). *Plant Cell*, 12, 1229–1237.
- Zemková, Z., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulka, P., Zelko, I., Vadkertiová, R., Farkaš, V., & Stratilová, E. (2012). *Chem. Pap.*, 66, 814-820. Doi: 10.2478/s11696-012-0167-x

Stanovenie nových heterotransglykozylačných aktivít v extraktoch z klíčiach semien kapucínky I - akceptorové substráty

Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Dagmar Benkovská^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko a Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

^bÚstav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 967/97, CZ- 602 00 Brno, Česká republika

*chemevi@savba.sk

Klíčové slová

Bunková stena, *Tropaeolum majus*, značené oligosacharidy, sulforodamín, HPLC, xyloglukánendotransglykozyláza

Úvod

Ait Mohand a Farkaš boli prví, ktorí publikovali (rok 2006) nový typ transglykozylačnej reakcie, ktorá bola katalyzovaná surovým proteínovým extraktom z klíčiach semien kapucínky, tzv. heterotransglykozyláciu. Heterotransglykozylácia znamená prenos odštiepeného sacharidového fragmentu na štrukturálne odlišný sacharid. Až v roku 2010 priradili Stratilová a kol. túto aktivitu, resp. aktivitu, majoritnej forme xyloglukánendotransglykozylázy (XET, EC 2.4.1.207).

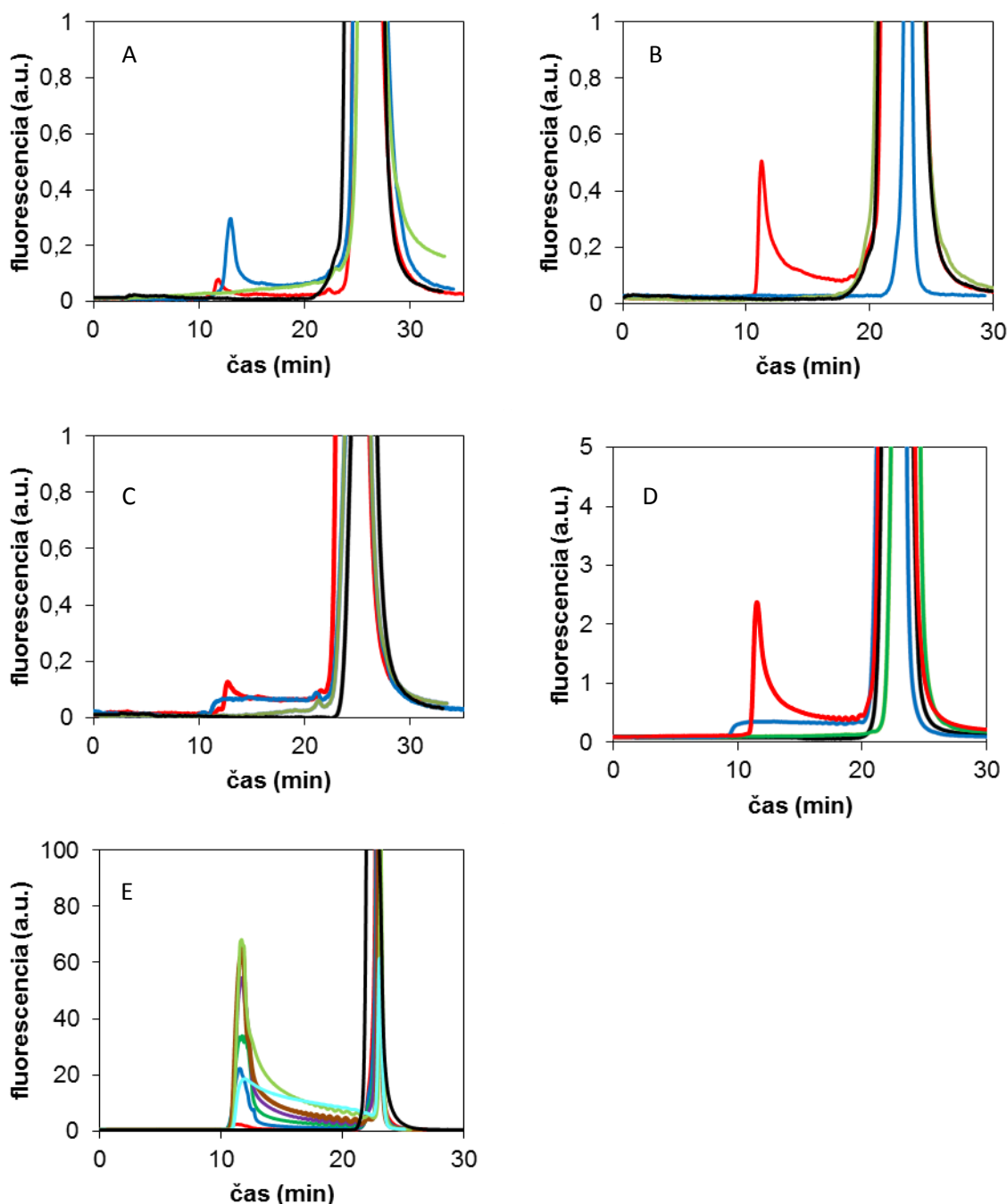
Na stanovenie transglykozylačných aktivít sa zvyknú využívať ako akceptorové substráty značené oligosacharidy. V tejto práci boli použité rôzne oligosacharidy fluorescenčne značené sulforodamínom podľa metódy vypracovanej Kosíkom a Farkašom (2008). Najbežnejšou metódou je tzv. dot-blot metóda na papieri (Fry 1997), ktorej použitie je limitované v prípade, že substráty sa z papiera nedajú vymyť, v dôsledku čoho ich nerozlíšime od produktu. Takýmto prípadom sú oligosacharidy odvodené od manánu (MANOS), galaktomanánu (GMOS), arabinogalaktánu (AGOS) a arabinoxylánu (AXOS), ktoré sa tiež vyskytujú v bunkovej stene rastlín a teda môžu byť potencionálnymi akceptormi transglykozylačných reakcií, ktoré v nej prebiehajú. Na stanovenie zabudovávania značených oligosacharidov do xyloglukánu sa použila metóda gélovej chromatografie s využitím HPLC s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom.

Materiál a metódy

Proteínový extrakt bol získaný z klíčiach semien kapucínky (kotyledon *Tropaeolum majus*). Ako akceptorové substráty sa použili 27,2 μ M roztoky MANOS, GMOS, AGOS a AXOS a pre porovnanie aj XGOS (xyloglukán oligosacharidy) a ako donorový substrát 0,3% roztok xyloglukánu (XG). Oligosacharidy boli značené sulforodamínom (SR).

Priebeh reakcie (miera zabudovávania OS-SR do polymérneho substrátu v závislosti od doby reakcie) bol sledovaný pomocou izokratickej gélovej chromatografie na Hewlett Packard 1100 systéme s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom kontrolovaným ChemStation softvérom (Agilent). Fluorescenčný detektor bol programovaný na excitačnú vlnovú dĺžku 530 nm a emisnú vlnovú dĺžku 575 nm. Analýzy boli robené na TSKgel G3000 SWXL kolóne, 7,8 x 300 mm (TosoHaas) pri teplote 24 °C. Kolóna bola kalibrovaná na XG detegovaný refraktometrom a XGOS-SR detegované fluorescenčným detektorom. Ako mobilná fáza bol použitý 100mM octan sodný pH 5.7 s 20% acetonitrilom. Prietoková rýchlosť bola 0.5 ml/min.

Výsledky a diskusia



Obr. 2: Elučný profil reakčných zmesí pozostávajúcich zo získaného proteínového extraktu z klíčiach semien kapucinky, 0,3% XG a rozličných SR-značených akceptorových substrátov. A – XG/MANOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 1,75 hod, ■ - 3 hod, ■ - 72 hod), B – XG/AXOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 1 hod, ■ - 5 hod, ■ - 72 hod), C – XG/AGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 1 hod, ■ - 4,25 hod, ■ - 72 hod), D – XG/GMOS-SR (■ - 0 hod, ■ - hod, ■ - hod, ■ - hod), E - XG/XGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 1 min, ■ - 10 min, ■ - 0,5 hod, ■ - 1 hod, ■ - 3 hod, ■ - 16 hod, ■ - 72 hod). Koncentrácia použitých oligosacharidov bola 27,2 μ M.

V minulosti boli stanovené tzv. dot-blot metódou laminarioligosacharidy, xylooligosacharidy, pustulooligosacharidy (PUOS) a 1,3-1,4- β -glukooligosacharidy ako ďalšie akceptorové substráty majoritnej formy XET (Stratilová a kol. 2010). Pomocou mikroskopických metód sa potvrdilo, že s výnimkou PUOS-SR sú tieto oligosacharidy schopné sa zabudovať aj do štruktúr bunkovej steny. PUOS-SR sa inkorporovali primárne do cytoplazmatickej membrány (Zemková a kol. 2012).

Heterotransglykozylačná reakcia medzi XG ako donorom reakcie a ďalšími OS-SR ako jej akceptormi je znázornená na Obr. 1(A-D). Obr. 1E znázorňuje typickú transglykozyláciu katalyzovanú XET na substrátový pár XG/XGOS-SR.

Výsledky naznačujú, že efektivita heterotransglykozylačnej reakcie medzi XG ako donorom a jednotlivými akceptormi narastá v rade MANOS-SR < AGOS-SR < AXOS-SR < GMOS-SR. Všetky reakcie sú v porovnaní s transglykozylačnou reakciou na substrátový pár XG/XGOS-SR, ktorá je typická pre XET, rádovo pomalšie. Najvyššia heterotransglykozylačná aktivita surového proteínového extraktu na substrátový pár XG/GMOS-SR bola indikovaná už Kosíkom a kol. (2010), ktorí stanovovali tieto aktivity pomocou glykočipov s imobilizovaným donorovým substrátom.

Na potvrdenie toho, či tieto reakcie môžu prebiehať aj *in vivo* je potrebné zistiť zabudovávanie značených oligosacharidov do štruktúr rastlinných buniek napr. pomocou fluorescenčného mikroskopu (Vissenberg a kol. 2000; Ibatullin a kol. 2009).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50 %) a finančnej podpore poskytnutej VEGA 2/0020/12 a ústavnou podporou RVO: 68081715 Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i..

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res.*, 341, 577-581.
- Fry S.C. (1997). *Plant J.* 11, 1141–1150.
- Ibatullin, F.M., Banasiak, A., Baumann, M.J., Greffe, L., Takahashi, J., Mellerowicz, E.J., & Brumer, H. (2009). *Plant Physiol.*, 151, 1741-1750. Doi: 10.1104/pp.109.147439
- Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
- Kosík, O., Auburn, R.P., Russell, S., Stratilová, E., Garajová, S., Hrmová, M., Farkaš, V. (2010) *Glycoconjugate J.*, 27, 79-87. Doi: 10.1007/s10719-009-9271-8.
- Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Řehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulková, H., & Farkaš, V. (2010). *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 207–215. Doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.016.
- Zemková, Z., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulka, P., Zelko, I., Vadkertiová, R., Farkaš, V., & Stratilová, E. (2012). *Chem. Pap.*, 66, 814-820. Doi: 10.2478/s11696-012-0167-x
- Vissenberg, K., Martinez-Vilchez, I.M., Verbelen, J.P., Miller, J.G., & Fry, S.C. (2000). *Plant Cell*, 12, 1229–1237.

Stanovenie nových heterotransglykozylačných aktivít v extraktoch z klíčiach semien kapucínky II - donorové substráty

Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Dagmar Benkovská^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko a Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

^bÚstav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 967/97, CZ- 602 00 Brno, Česká republika

*chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

Bunková stena, štrukturálne polysacharidy, *Tropaeolum majus*, heterotransglykozylácia, xyloglukánendotransglykozyláza

Úvod

Ait Mohand a Farkaš boli prví, ktorí publikovali (rok 2006) nový typ transglykozylačnej reakcie, ktorá bola katalyzovaná surovým proteínovým extraktom z klíčiach semien kapucínky, tzv. heterotransglykozyláciou. Heterotransglykozylácia znamená prenos odštiepeného sacharidového fragmentu na štrukturálne odlišný sacharid. Až v roku 2010 priradili Stratilová a kol. túto aktivitu, resp. aktivitu, majoritnej forme xyloglukánendotransglykozylázy (XET, EC 2.4.1.207). V porovnaní s ostatnými formami, ktoré sa našli v kotyledone semien kapucínky, vykazoval tento enzým značnú nešpecifitu voči akceptorovým substrátom.

V tejto práci sme sa zamerali na stanovenie polysacharidov, ktoré by mohli slúžiť ako donorové substráty kapucínkovej XET. Keďže sa na stanovenie transglykozylačných aktivít zvyčajne využívajú značené oligosacharidy, použili sme xyloglukánoligosacharidy s naviazaným sulforodamínom (XGOS-SR; Kosík a Farkaš 2008), ktoré reprezentujú prirodzený akceptorový substrát XET. Ako donorové substráty boli použité: hydroxyetylcelulóza (HEC), laminarín (LAM), glukomanán (GM), zmiešaný 1,3; 1,4 – β -glukán (MLG), arabinoxylán (AX), pustulán (PUS) a xylán (XYL). Aktivita na tieto substráty bola porovnaná s aktivitou na xyloglukán (XG), ktorý je prirodzený donorový substrát XET. Na stanovenie zabudovávania značených oligosacharidov do polysacharidov sa použila metóda gélovej chromatografie s využitím HPLC s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom, keďže bežne používaná dot-blot metóda na papieri (Fry 1997) pre niektoré polysacharidy nevyhovovala.

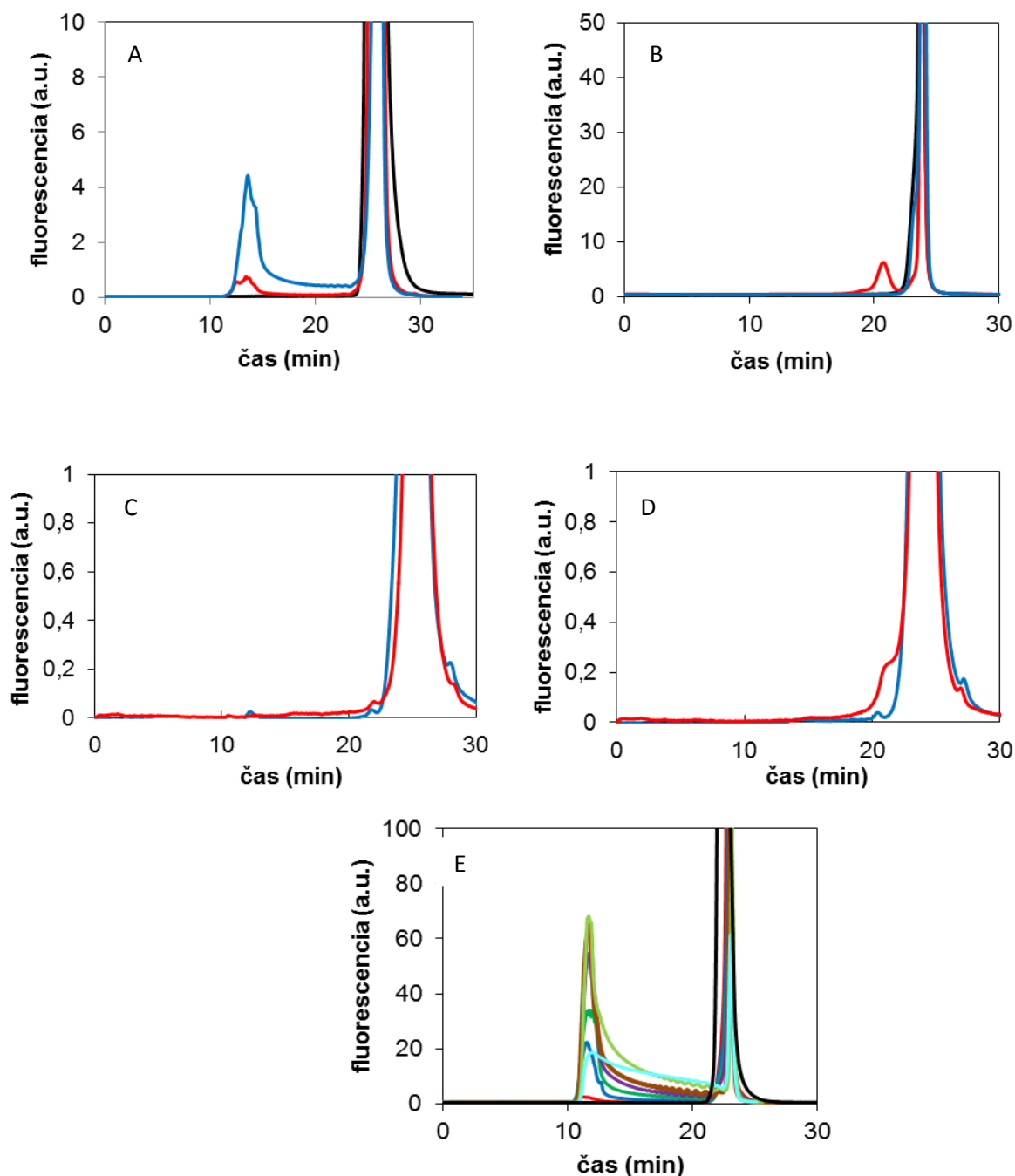
Materiál a metódy

Proteínový extrakt bol získaný z klíčiach semien kapucínky (kotyledon *Tropaeolum majus*). Ako akceptorový substrát sa použil 27,2 μ M roztok XGOS značený SR. Ako donorové substráty boli použité HEC, LAM, GM, MLG, AX, PUS, XYL a pre porovnanie aj XG.

Priebeh reakcie (miera zabudovávania XGOS-SR do polymérneho substrátu v závislosti od doby reakcie) bol sledovaný pomocou izokratickej gélovej chromatografie na Hewlett Packard 1100 systéme s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom kontrolovaným ChemStation softvérom (Agilent). Fluorescenčný detektor bol programovaný na excitačnú vlnovú dĺžku 530 nm a emisnú vlnovú dĺžku 575 nm. Analýzy boli robené na TSKgel G3000 SWXL kolóne, 7,8 x 300 mm (TosoHaas) pri teplote 24 °C. Kolóna bola kalibrovaná na XG detegovaný refraktometrom a XGOS-SR detegované fluorescenčným detektorom. Ako mobilná fáza bol použitý 100mM octan sodný pH 5.7 s 20% acetonitrilom. Prietoková rýchlosť bola 0.5 ml/min.

Výsledky a diskusia

Výsledky naznačujú najvyššiu efektivitu heterotransglykozylačnej reakcie medzi HEC ako donorom a XGOS-SR ako akceptorom (Obr. 1A). Tento jav sa dá zdôvodniť homológiou medzi štruktúrou XG a HEC, keďže tieto polysacharidy majú rovnakú štruktúru hlavného reťazca a bočné reťazce XG čiastočne priestorovo nahrádzajú hydroxyetyly HEC.



Obr. 3: Elučný profil reakčných zmesí pozostávajúcich zo získaného proteínového extraktu z kľúčiacich semien kapucínky, XGOS-SR (akceptorový substrát) a rozličných donorových substrátov. A – HEC/XGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 0,25 hod, ■ - 1,25 hod), B – LAM/XGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 6,25 hod, ■ - 12,5 hod).

- 3 hod), C – GM/XGOS-SR (■ - 9,25 hod, ■ - 2,5 hod), D – MLG/XGOS-SR (■ - 7 hod, ■ - 2 hod), F – XG/XGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 1 min, ■ - 10 min, ■ - 0,5 hod, ■ - 1 hod, ■ - 3 hod, ■ - 16 hod, ■ - 72 hod). Koncentrácia XGOS-SR bola 27,2 μ M a sacharidových polymérov 0,3%.

Ďalším polymérom, ktorý môže slúžiť ako donorový substrát pre nešpecifickú XET je LAM (Obr. 1B). Aktivita na ďalší polysacharid, MLG, (Obr. 1D) sa prejavila v oveľa menšej miere, ako sa dalo očakávať z výsledkov pre oligosacharidy odvodené od tohto polyméru, ktoré slúžili ako akceptorové substráty (Stratilová a kol. 2010) ako aj z výsledkov získaných pre nižšie rastliny (prasličky), v ktorých sa nachádzal enzým preferujúci tento polysacharid ako donor heterotransglykozylácie (Fry a kol. 2008). Tak ako v prípade alternatívnych akceptorových substrátov boli všetky reakcie v porovnaní s transglykozylačnou reakciou na substrátový pár XG/XGOS-SR, ktorá je typická pre XET (Obr. 1E), rádovo pomalšie. Reakcia s GM bola extrémne pomalá (Obr. 1C), ale reakcie s XYL, PUS a AX vôbec neprebiehali.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50 %) a finančnej podpore poskytnutej VEGA 2/0020/12 a ústavnou podporou RVO: 68081715 Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i..

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res.*, 341, 577-581.
- Fry S.C. (1997). *Plant J.* 11, 1141–1150.
- Fry, S.C., Mohler, K.E., Nesselrode, B.H.W.A., Franková, L. (2008). *Plant J.*, 55, 240-252..
- Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
- Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Řehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulková, H., & Farkaš, V. (2010). *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 207–215. Doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.016.

Stanovenie heterotransglykozylačných aktivít katalyzovaných proteínovými extraktami získanými z nadzemných častí *Tropaeolum majus*

Soňa Garajová^a, Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Jiří Šalplachta^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko a Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

^bÚstav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 967/97, CZ- 602 00 Brno, Česká republika

*chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

Heterotransglykozylácia, *Tropaeolum majus*, značené oligosacharidy, sulforodamín, HPLC, xyloglukánendotransglykozyláza

Úvod

Transglykozylázy sú hydrolázy, ktoré fragment s novovzniknutým redukujúcim koncom neprenášajú na vodu (hydrolýza), ale na iný sacharid (transglykozylácia) (Sinnott 1990). Transglykozylácia bola pôvodne sledovaná skoro u všetkých typických glykozylydroláz (najmä glykozidáz) avšak len pri vysokých koncentráciách konečných produktov štiepenia. „Pravé“ transglykozylázy katalyzujú prenos fragmentu na sacharid bez ohľadu na koncentráciu konečných produktov. Tieto enzýmy umožňujú bunkovým stenám, aby sa chovali ako dynamické štruktúry, t. j. podliehali expanzii a neustálej prestavbe v priebehu rastu bez toho, aby bola ich štruktúra čo i len dočasne oslabená (Nishitani 1997). Najznámejším prípadom takéhoto enzýmu je rastlinná xyloglukán endotransglykozyláza (XET, EC 2.4.1.207), na ktorej objave sa podieľal aj náš výskumný kolektív (Farkaš a kol. 1992, Fry a kol. 1992, Nishitani a Tominaga 1992). Ait Mohand a Farkaš publikovali v roku 2006 nový typ transglykozylačnej reakcie, ktorá bola katalyzovaná surovým proteínovým extraktom z kľúčiacich semien kapucínky, tzv. heterotransglykozyláciu. Heterotransglykozylácia znamená prenos sacharidu s novovytvoreným redukujúcim koncom, ktorý vznikol v dôsledku štiepenia polysacharidu (donorový substrát) na štruktúrne odlišný sacharid (akceptorový substrát). Až v roku 2010 priradili Stratilová a kol. túto aktivitu, resp. aktivity, majoritnej forme xyloglukánendotransglykozylázy (XET, EC 2.4.1.207), čím vylúčili aktívnu účasť neznámych transglykozyláz.

Na stanovenie transglykozylačných aktivít sa zvyknú využívať ako akceptorové substráty značené oligosacharidy (OS). V tejto práci boli použité OS fluorescenčne značené sulforodamínom (SR) podľa metódy vypracovanej Kosíkom a Farkašom (2008). Najbežnejšou metódou stanovenia aktivity je tzv. dot-blot metóda na papieri (Fry 1997), ktorej použitie môže byť limitované v prípade, keď značené OS interagujú s papierom alebo sa sorbujú na polysacharid alebo zložky proteínového precipitátu bez toho, aby prebehla transglykozylačná reakcia. Z tohto dôvodu je potrebné pozitívne výsledky overiť ďalšími metódami, ako napr. gélovou chromatografiou s využitím HPLC s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom.

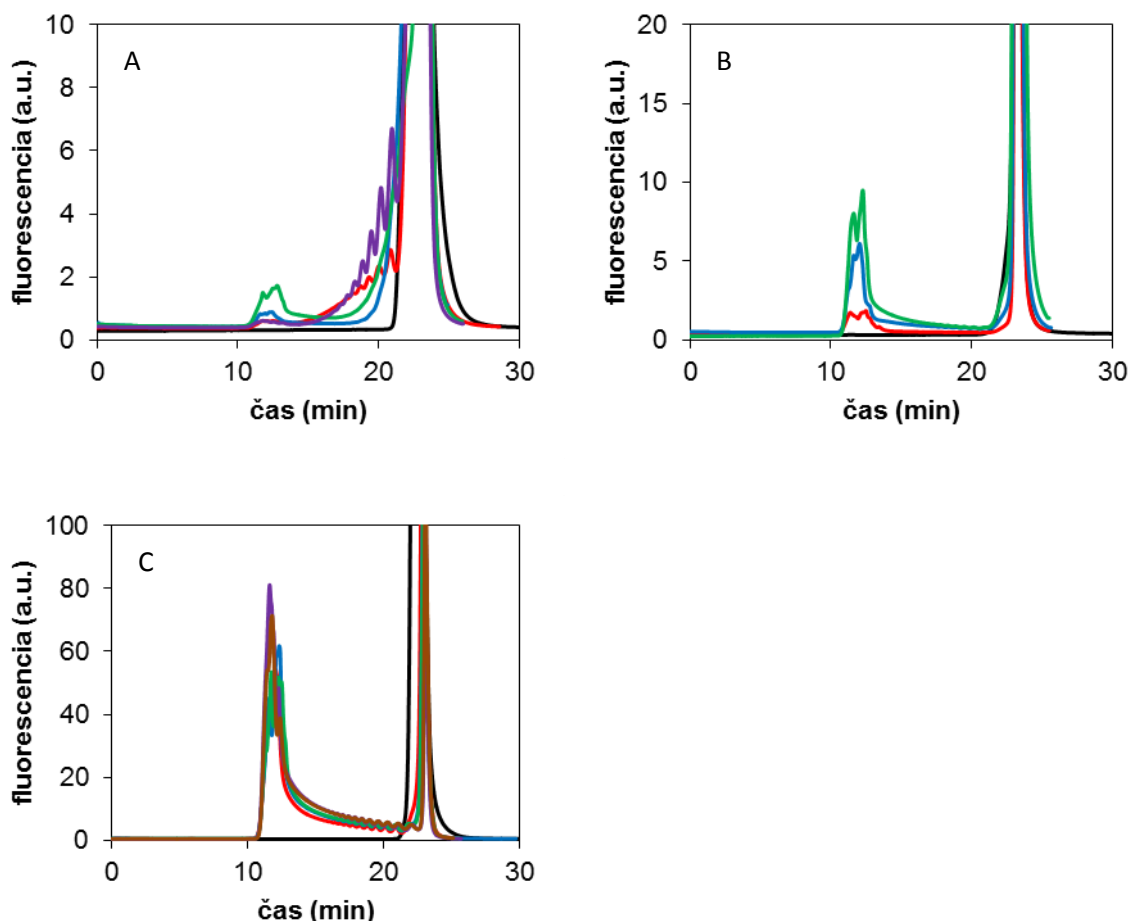
Materiál a metódy

Proteínový extrakt bol získaný z stoniek kapucínky (*Tropaeolum majus*). Ako akceptorové substráty sa použili 27,2 µM roztoky OS odvodené od celulózy (CEOS), xylánu (XYLOS), laminarínu (LAOS), 1,3;1,4-β-glukánu (MLGOS), pustulánu (PUOS) a pre porovnanie aj xyloglukánu (XGOS). Ako donorový substrát bol použitý 0,3% roztok xyloglukánu (XG). Pre heterotransglykozylačné aktivity s rôznymi donorovými substrátmi bola použitá hydroxyetylcelulóza (HEC), galaktomanán (GM) a arabinoxylán (AX). V týchto prípadoch sa ako akceptorový substrát použil XGOS-SR. Všetky OS boli značené SR.

Priebeh reakcie (miera zabudovávania OS-SR do polymérneho substrátu v závislosti od doby reakcie) bol sledovaný pomocou izokratickej gélovej chromatografie na Hewlett Packard 1100 systéme

s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom kontrolovaným ChemStation softvérom (Agilent). Fluorescenčný detektor bol programovaný na excitačnú vlnovú dĺžku 530 nm a emisnú vlnovú dĺžku 575 nm. Analýzy boli robené na TSKgel G3000 SWXL kolóne, 7,8 x 300 mm (TosoHaas) pri teplote 24 °C. Kolóna bola kalibrovaná na XG detegovaný refraktometrom a XGOS-SR detegované fluorescenčným detektorom. Ako mobilná fáza bol použitý 100mM octan sodný pH 5.7 s 20% acetonitrilom. Prietoková rýchlosť bola 0.5 ml/min.

Výsledky a diskusia



Obr. 4: Elučný profil reakčných zmesí pozostávajúcich zo získaného proteínového extraktu z nadzemných častí kapucínky a rozličných donor/akceptorových párov. A – HEC/XGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 2 hod, ■ - 6 hod, ■ - 24 hod, ■ - 72 hod), B – XG/CEOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 16 hod, ■ - 72 hod, ■ - 120 hod), C – XG/XGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 1 hod, ■ - 2,5 hod, ■ - 3,5 hod, ■ - 16 hod, ■ - 72 hod)

Pozitívne transglykozylačné aktivity, ktoré boli stanovené v proteínovom extrakte z nadzemných častí kapucínky (stoniek) gélovou chromatografiou na HPLC sú zobrazené na Obr. 1. Ako z obrázku vyplýva, jediné aktivity boli pozorované na substrátový pár XG/XGOS, ktorý znázorňuje typické substráty XET (Fig.1C), alebo ich analógy hydroxyetylcelulózu (HEC, Fig. 1A) alebo od celulózy odvodené oligosacharidy (CEOS, Fig. 1B) v kombinácii s prirodzeným substrátom, t.j. XG alebo XGOS. Rovnaký výsledok bol získaný s proteínovým extraktom z listov tejto rastliny, pričom experimenty boli vyhodnotené dot-blot metódou.

Z porovnania s formami XET z kľúčiacich semien kapucínky (Stratilová a kol., 2010) vyplýva, že kým kotyledon obsahoval aj nešpecifickú formu XET, ostatné časti rastliny obsahovali výlučne striktné špecifické formy tohto enzýmu. Nezodpovedaná zostala otázka, či nešpecifická forma je typická pre podzemné časti alebo výlučne pre semená a či ide o všeobecnú vlastnosť dvojkľúčolistých rastlín.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50 %) a finančnej podpore poskytnutej VEGA 2/0020/12 a ústavnou podporou RVO: 68081715 Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i.

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res.*, 341, 577-581.
- Farkaš, V., Sulová, Z., Stratilová, E., Hanna, R., Maclachlan, G. (1992). *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 365-370
- Fry, S.C. (1997). *Plant J.* 11, 1141–1150.
- Fry, S. C., Smith, R. C., Renwick, K. F., Martin, D. J., Hodge, S. K., Matthews, K.J.(1992). *Biochem. J.* 282, 821-828
- Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
- Nishitani, K., Tominaga, R. (1992). *J. Biol. Chem.* 267, 21058-21064
- Nishitani, K. (1997). *Int Rev Cytol.* 173, 157-206.
- Sinnott, M.L. (1990). *Chem. Rev.* 90, 1171-1202.
- Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Řehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulková, H., & Farkaš, V. (2010). *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 207–215. Doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.016.

Substrátová špecificita xyloglukánendotransglykozylázy z koreňov petržlenu (*Petroselinum crispum*)

Soňa Garajová^a, Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Jiří Šalplachta^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko a Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

^bÚstav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 967/97, CZ- 602 00 Brno, Česká republika

*chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

Heterotransglykozylácia, *Petroselinum crispum*, značené oligosacharidy, sulforodamín, HPLC, xyloglukánendotransglykozyláza

Úvod

Xyloglukánendotransglykozyláza (XET) bola v rastlinách objavená v roku 1992 naraz tromi výskumnými skupinami (Farkaš a kol. 1992, Fry a kol. 1992, Nishitani a Tominaga 1992). Tento enzým umožňuje expanziu bunkovej steny, ktorá nevyhnutne sprevádza rast rastlinných buniek tým, že rozpája a nadstavuje vlákna štruktúrneho xyloglukánu a tým umožňuje oddľalovanie vlákien celulózy, ktoré vytvárajú akúsi kostru primárnej bunkovej steny rastlín. Typ reakcie, ktorým sa predlžovanie vlákien realizuje, sa nazýva transglykozylácia.

Ait Mohand a Farkaš publikovali v roku 2006 nový typ transglykozylačnej reakcie, tzv. heterotransglykozyláciu. Heterotransglykozylácia znamená prenos sacharidu s novovytvoreným redukujúcim koncom, ktorý vznikol v dôsledku štiepenia polysacharidu (donorový substrát) na štruktúrne odlišný sacharid (akceptorový substrát). Až v roku 2010 priradili Stratilová a kol. túto aktivitu, resp. aktivity v kľúčiacich kapucínkových semenách majoritnej forme xyloglukánendotransglykozylázy (XET, EC 2.4.1.207). Aktivita na niektoré substrátové páry sa našla aj v jednoklíčnolistových rastlinách ako napr. jačmeň (Hrmová a kol. 2007, 2009).

Na stanovenie transglykozylačných aktivít sa zvyknú využívať ako akceptorové substráty značené oligosacharidy (OS). V tejto práci boli použité OS fluorescenčne značené sulforodamínom (SR) podľa metódy vypracovanej Kosíkom a Farkašom (2008). Najbežnejšou metódou stanovenia aktivity je tzv. dot-blot metóda na papieri (Fry 1997), ktorej použitie môže byť limitované v prípade, keď značené OS interagujú s papierom alebo sa sorbujú na polysacharid alebo zložky proteínového precipitátu bez toho, aby prebehla transglykozylačná reakcia. Z tohto dôvodu je potrebné pozitívne výsledky overiť ďalšími metódami, ako napr. gélovou chromatografiou s využitím HPLC s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom.

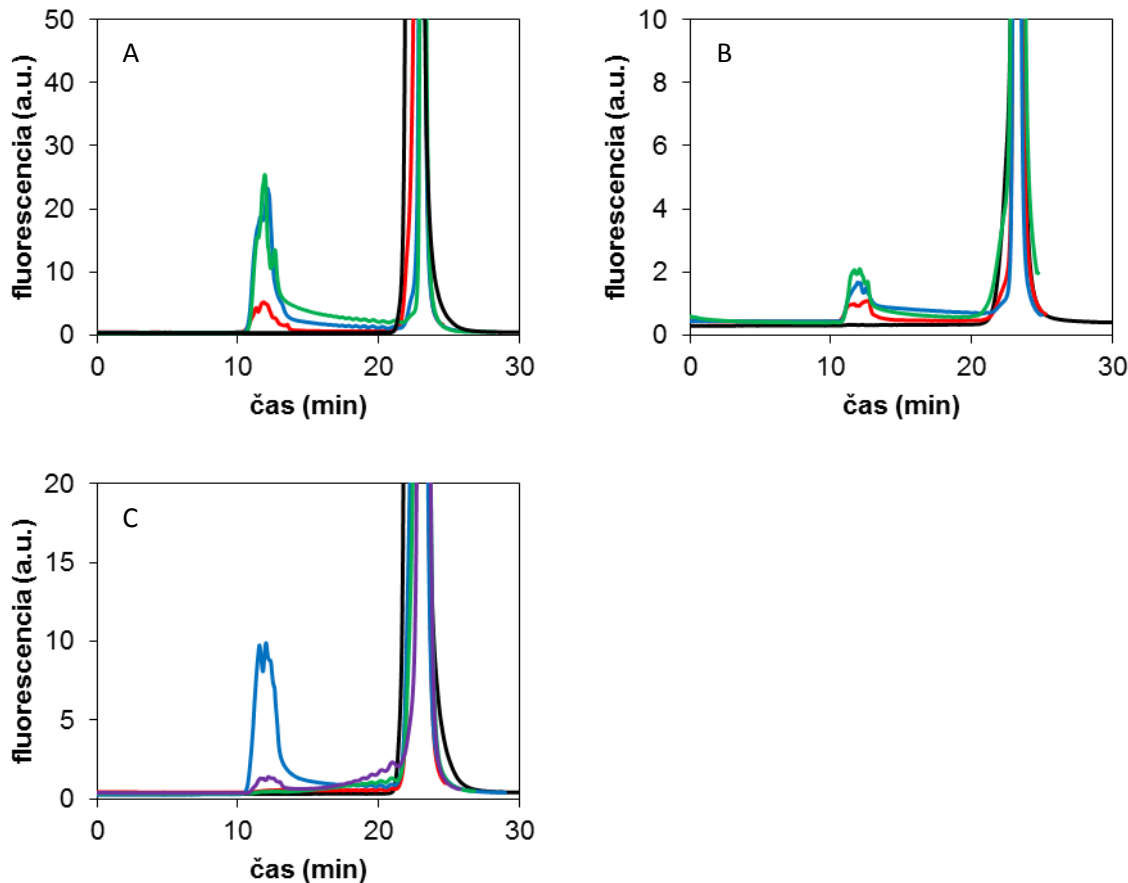
Materiál a metódy

Proteínový extrakt bol získaný z koreňov petržlenu (*Petroselinum crispum*). Ako akceptorové substráty sa použili 27,2 μ M roztoky OS odvodené od celulózy (CEOS), xylánu (XYLOS), laminarínu (LAOS), 1,3;1,4- β -glukánu (MLGOS), pustulánu (PUOS) a pre porovnanie aj xyloglukánu (XGOS). Ako donorový substrát bol použitý 0,3% roztok xyloglukánu (XG). Pre heterotransglykozylačné aktivity s rôznymi donorovými substrátmi bola použitá hydroxyetylcelulóza (HEC), galaktomanán (GM) a arabinoxylán (AX). V týchto prípadoch sa ako akceptorový substrát použil XGOS-SR. Všetky OS boli značené SR.

Priebeh reakcie (miera zabudovávania OS-SR do polymérneho substrátu v závislosti od doby reakcie) bol sledovaný pomocou izokratikkej gélovej chromatografie na Hewlett Packard 1100 systéme s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom kontrolovaným ChemStation softvérom (Agilent).

Fluorescenčný detektor bol programovaný na excitačnú vlnovú dĺžku 530 nm a emisnú vlnovú dĺžku 575 nm. Analýzy boli robené na TSKgel G3000 SWXL kolóne, 7,8 x 300 mm (TosoHaas) pri teplote 24 °C. Kolóna bola kalibrovaná na XG detegovaný refraktometrom a XGOS-SR detegované fluorescenčným detektorom. Ako mobilná fáza bol použitý 100mM octan sodný pH 5.7 s 20% acetonitrilom. Prietoková rýchlosť bola 0.5 ml/min.

Výsledky a diskusia



Obr. 5: Elučný profil reakčných zmesí pozostávajúcich zo získaného proteínového extraktu z koreňa petržľenu a rozličných donor/akceptorových párov. A – XG/XGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 2 hod, ■ - 16 hod, ■ - 72 hod), B – XG/CEOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 16 hod, ■ - 72 hod, ■ - 120 hod), C – HEC/XGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 3 hod, ■ - 6 hod, ■ - 24 hod, ■ - 40 hod). Koncentrácia použitých oligosacharidov bola 27,2 μ M a sacharidových polymérov 0,3%.

Pozitívne transglykozylačné aktivity, ktoré boli stanovené v proteínovom extrakte z koreňov petržľenu gélovou chromatografiou na HPLC sú zobrazené na Obr. 1. Ako z obrázku vyplýva, jediné aktivity boli pozorované na substrátový pár XG/XGOS, ktorý znázorňuje typické substráty XET (Fig.1A), alebo ich analógy hydroxyetylcelulózu (HEC, Fig. 1C) alebo od celulózy odvodené oligosacharidy (CEOS, Fig. 1B) v kombinácii s prirodzeným substrátom, t.j. XG alebo XGOS. Podmienky stanovení boli odvodené od vlastností zistených pri biochemicko-fyzikálnej charakterizácii XET z tohto zdroja (Garajová a kol. 2008).

Z porovnania s formami XET z klíčiach semien kapucínky (Stratilová a kol., 2010), nadzemných častí tejto rastliny a semien petržľenu vyplýva, že kým semená týchto rastlín obsahovali aj nešpecifickú formu XET, ostatné časti rastliny obsahovali výlučne striktne špecifické formy tohto enzýmu. Funkcia nešpecifickej XET pri klíčení rastlín zostáva neznáma.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50 %) a finančnej podpore poskytnutej VEGA 2/0020/12 a ústavnou podporou RVO: 68081715 Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i..

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res.* 341, 577-581.
- Farkaš, V., Sulová, Z., Stratilová, E., Hanna, R., Maclachlan, G. (1992). *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 365-370
- Fry, S.C. (1997). *Plant J.* 11, 1141–1150.
- Fry, S. C., Smith, R. C., Renwick, K. F., Martin, D. J., Hodge, S. K., Matthews, K.J.(1992). *Biochem. J.* 282, 821-828
- Garajová, S., Flodrová, D., Ait-Mohand, F., Farkaš, V. & Stratilová, E. (2008). *Biologia* 63, 1-7.
- Hrmova, M., Farkaš, V., Lahnstein, J., & Fincher, G.B. (2007). *J. Biol. Chem.*, 282, 12951-12962.
- Hrmova, M., Farkaš, V., Harvey, J.H., Lahnstein, J., Wischmann, B., Kaewthai, N., Ezcurra, I., Teeri, T.T., & Fincher, G.B. (2009). *FEBS J.*, 276, 437-456.
- Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
- Nishitani, K., Tominaga, R. (1992). *J. Biol. Chem.* 267, 21058-21064
- Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Řehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulková, H., & Farkaš, V. (2010). *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 207–215. Doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.016.

Identifikácia nových akceptorových substrátov pre transglykozylačné reakcie katalyzované proteínovými extraktami z klíčiach semien petržlenu

Zuzana Zemková^a, Dana Flodrová^b, Dagmar Benkovská^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko a Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

^bÚstav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 967/97, CZ- 602 00 Brno, Česká republika

*chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

Petroselinum crispum, značené oligosacharidy, sulforodamín, HPLC, xyloglukánendotransglykozyláza

Úvod

Ait Mohand a Farkaš (2006) boli prví, ktorí publikovali nový typ transglykozylačnej reakcie, ktorá bola katalyzovaná surovým proteínovým extraktom z klíčiach semien kapucínky, tzv. heterotransglykozyláciou. Heterotransglykozylácia znamená prenos odštiepeného sacharidového fragmentu na štrukturálne odlišný sacharid. Až v roku 2010 priradili Stratilová a kol. túto aktivitu, resp. aktivitu, majoritnej forme xyloglukánendotransglykozylázy (XET, EC 2.4.1.207). Aktivita na niektoré substrátové páry sa našla aj v jednoklíčolistových rastlinách ako napr. jačmeň (Hrmová a kol. 2007, 2009). Keďže sa v kapucínke našli nešpecifické XET v klíčiach semenách, kým nadzemné časti takéto enzýmy neprodukovali, zisťovalo sa, či sa vyskytujú výlučne v semenách alebo v podzemných častiach dvojklíčolistových rastlín všeobecne. Ako modelová rastlina sa zvolil petržlen. Zistilo sa, že v jeho koreňoch sa vyskytujú výlučne špecifické XET. Z tohto dôvodu sa táto práca zaoberá identifikáciou oligosacharidov, ktoré by mohli slúžiť ako akceptorové substráty transglykozylačných enzýmov s heterotransglykozylačnými aktivitami v klíčiach semenách tejto rastliny.

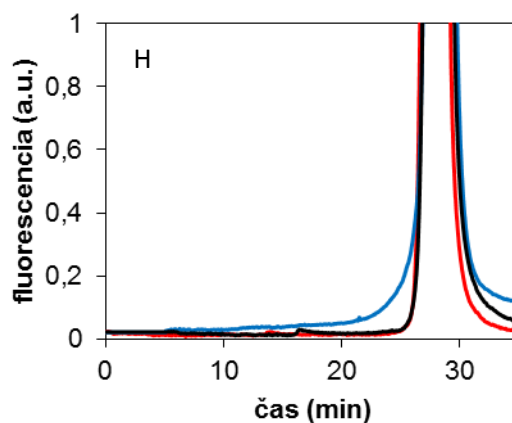
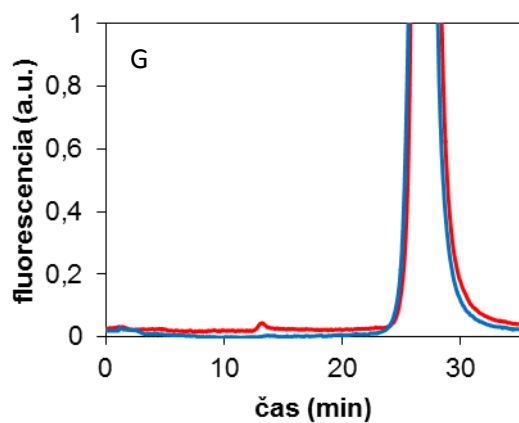
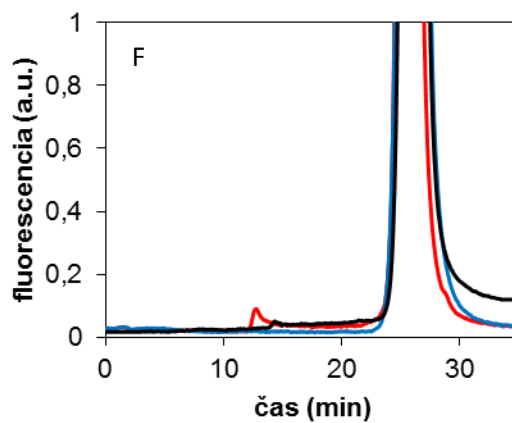
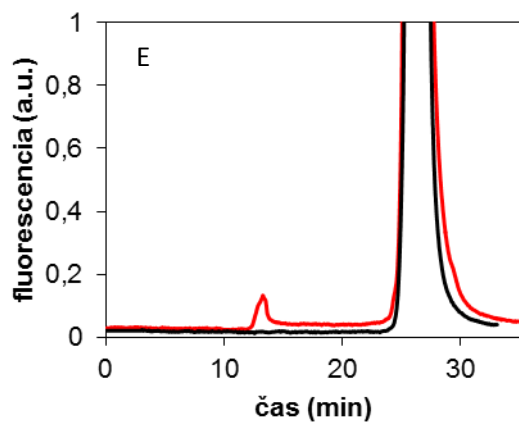
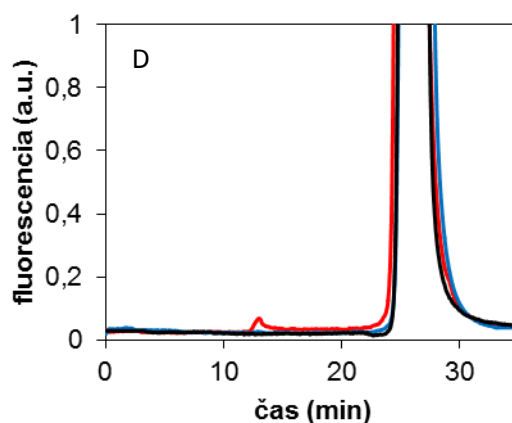
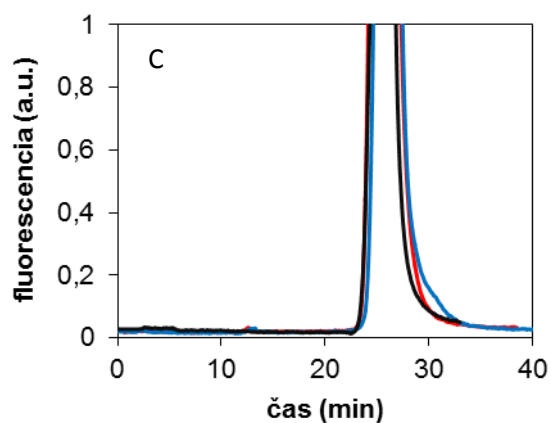
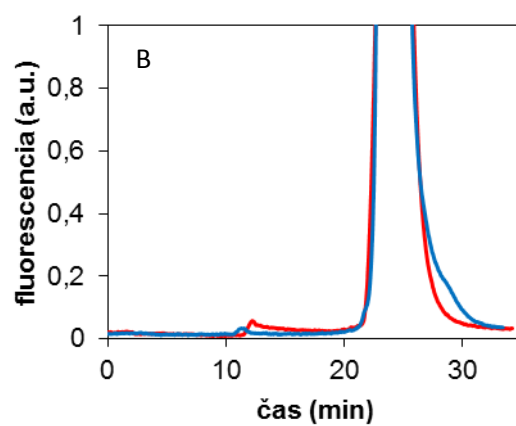
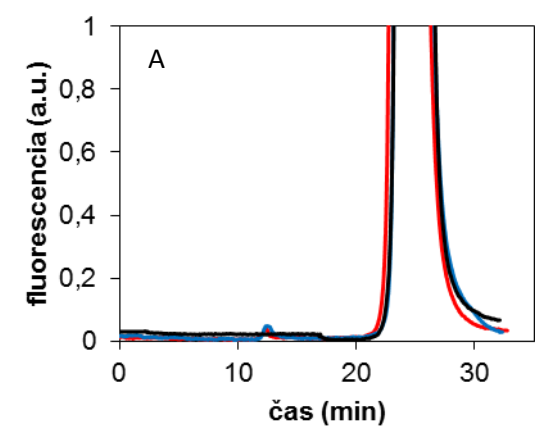
Na stanovenie transglykozylačných aktivít sa zvyknú využívať ako akceptorové substráty značené oligosacharidy. V tejto práci boli použité rôzne oligosacharidy fluorescenčne značené sulforodamínom (SR) podľa metódy vypracovanej Kosíkom a Farkašom (2008). Keďže použitie tzv. dot-blot metódy na papieri (Fry 1997) je limitované, na stanovenie zabudovávanie značených oligosacharidov do xyloglukánu sa použila metóda gélovej chromatografie s využitím HPLC s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom. Použili sa oligosacharidy odvodené od manánu (MANOS), galaktomanánu (GMOS), arabinogalaktánu (AGOS), arabinoxylánu (AXOS), laminarínu (LAOS), zmiešaného 1,3:1,4- β -glukánu (MLGOS), celulózy (CEOS), xylánu (XYLOS), pustulánu (PUOS) a pre porovnanie aj xyloglukánu (XGOS), ktorý je prirodzeným substrátom XET. Ako donorový substrát bol použitý xyloglukán (XG).

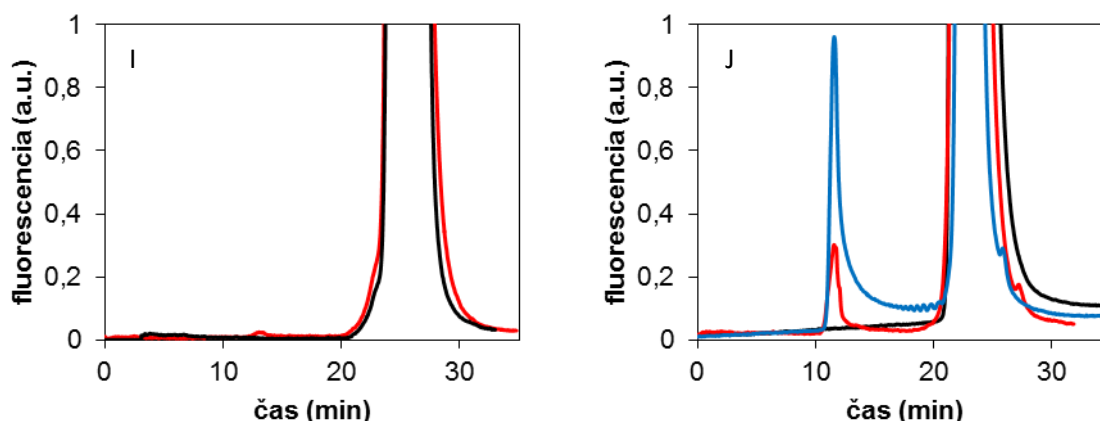
Materiál a metódy

Proteínový extrakt bol získaný z klíčiach semien petržlenu (*Petroselinum crispum*). Ako akceptorové substráty sa použili 27,2 μ M roztoky značených oligosacharidov (OS) a ako donorový substrát 0,3% roztok XG.

Priebeh reakcie (miera zabudovávanie OS-SR do polymérneho substrátu v závislosti od doby reakcie) bol sledovaný pomocou izokratickej gélovej chromatografie na Hewlett Packard 1100 systéme s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom kontrolovaným ChemStation softvérom (Agilent). Fluorescenčný detektor bol programovaný na excitačnú vlnovú dĺžku 530 nm a emisnú vlnovú dĺžku 575 nm. Analýzy boli robené na TSKgel G3000 SWXL kolóne, 7,8 x 300 mm (TosoHaas) pri teplote 24 °C. Kolóna bola kalibrovaná na XG detegovaný refraktometrom a XGOS-SR detegované fluorescenčným detektorom. Ako mobilná fáza bol použitý 100mM octan sodný pH 5.7 s 20% acetonitrilom. Prietoková rýchlosť bola 0.5 ml/min.

Výsledky a diskusia





Obr. 6: Elučný profil reakčných zmesí pozostávajúcich zo získaného proteínového extraktu z klíčiach semien petržľenu a rozličných donor/akceptorových párov. A – XG/GMOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 3,15 hod, ■ - 10 hod), B - XG/MANOS-SR (■ - 2,5 hod, ■ - 9,15 hod), C – XG/AGOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 4 hod, ■ - 11 hod), D - XG/LAOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 13 hod, ■ - 72 hod), E – XG/MLGOS (■ - 0 hod, ■ - 72 hod), F – XG/CEOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 12,5 hod, ■ - 72 hod), G – XG/XYLOS-SR (■ - 14,25 hod, ■ - 72 hod), H – XG/PUOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 15 hod, ■ - 72 hod), I – XG/AXOS-SR (■ - 0 hod, ■ - 4,75 hod), J – XG/XGOS (■ - 0 hod, ■ - 4 hod, ■ - 6,5 hod)

Výsledky získané analýzou reakčných zmesí kvapalinovou chromatografiou sú zobrazené na Obr. 1 a naznačujú, že s výnimkou PUOS-SR (Obr. 1H) dochádza k zabudovávaniu OS-SR do XG, aj keď v prípade AGOS-SR (Obr. 1C) a AXOS-SR (Obr. 1I) len nepatrne. Tak ako u nešpecifickej XET z kapucínky bola najvyššia heterotransglykozylačná aktivita zistená na substrátový pár XG/MLGOS-SR (Stratilová a kol. 2010). Všetky heterotransglykozylačné reakcie boli rovnako ako u kapucínky v porovnaní s transglykozylačnou reakciou na substrátový pár XG/XGOS-SR (Obr. 1J), ktorá je typická pre XET, oveľa pomalšie.

Na záver sa dá zhrnúť, že nešpecifické XET sa zatiaľ našli v dvojkľúčolistových rastlinách výlučne v klíčiach semenách. Výsledky naznačili rôzny pomer heterotransglykozylačných aktivít kapucínkovej a petržľenovej XET na rôzne donor/akceptorové páry, čo poukazuje na rozdiely v aktívnom mieste týchto enzýmov.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50 %) a finančnej podpore poskytnutej VEGA 2/0020/12 a ústavnou podporou RVO: 68081715 Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i..

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res.*, 341, 577-581.
- Fry S.C. (1997). *Plant J.* 11, 1141–1150.
- Garajová, S., Flodrová, D., Ait-Mohand, F., Farkaš, V. & Stratilová, E. (2008). *Biologia* 63, 1-7.
- Hrmová, M., Farkaš, V., Lahnstein, J., & Fincher, G.B. (2007). *J. Biol. Chem.*, 282, 12951-12962.
- Hrmová, M., Farkaš, V., Harvey, J.H., Lahnstein, J., Wischmann, B., Kaewthai, N., Ezcurra, I., Teeri, T.T., & Fincher, G.B. (2009). *FEBS J.*, 276, 437-456.
- Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
- Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Řehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulková, H., & Farkaš, V. (2010). *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 207–215. Doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.016.

Stanovenie donorových substrátov pre transglykozylázy z proteínových extraktov klíčiach semien petržlenu

Zuzana Zemková^a, Soňa Garajová^a, Dana Flodrová^b, Dagmar Benkovská^b, Vladimír Farkaš^a a Eva Stratilová^{a,*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko a Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

^bÚstav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 967/97, CZ- 602 00 Brno, Česká republika

*chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

Bunková stena, štrukturálne polysacharidy, *Petroselinum crispum*, heterotransglykozylácia, xyloglukánendotransglykozyláza

Úvod

Ait Mohand a Farkaš boli prví, ktorí publikovali (rok 2006) nový typ transglykozylačnej reakcie, ktorá bola katalyzovaná surovým proteínovým extraktom z klíčiach semien kapucínky, tzv. heterotransglykozyláciou. Heterotransglykozylácia znamená prenos odštiepeného sacharidového fragmentu na štrukturálne odlišný sacharid. Až v roku 2010 priradili Stratilová a kol. túto aktivitu, resp. aktivitu, majoritnej forme xyloglukánendotransglykozylázy (XET, EC 2.4.1.207). V porovnaní s ostatnými formami, ktoré sa našli v kotyledone semien kapucínky, vykazoval tento enzým značnú nešpecifitu voči akceptorovým aj donorovým substrátom.

V tejto práci sme sa zamerali na stanovenie polysacharidov, ktoré by mohli slúžiť ako donorové substráty XET z klíčiach semien petržlenu, pričom sme predpokladali rovnaké výsledky, ako sa získali pre kotyledon kapucínky (obe rastliny patria medzi dvojklíčnolistové). Keďže sa na stanovenie transglykozylačných aktivít zvyčajne využívajú značené oligosacharidy, použili sme xyloglukánoligosacharidy s naviazaným sulforodamínom (XGOS-SR; Kosík a Farkaš 2008), ktoré reprezentujú prirodzený akceptorový substrát XET. Ako donorové substráty boli použité: hydroxyetylcelulóza (HEC), laminarín (LAM), glukomanán (GM), zmiešaný 1,3; 1,4 – β -glukán (MLG), arabinoxylán (AX), pustulán (PUS) a xylán (XYL). Aktivita na tieto substráty bola porovnaná s aktivitou na xyloglukán (XG), ktorý je prirodzený donorový substrát XET. Na stanovenie zabudovávania značených oligosacharidov do polysacharidov sa použila tzv. dot-blot metóda (Fry 1997) a metóda gélovej chromatografie s využitím HPLC s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom.

Materiál a metódy

Proteínový extrakt bol získaný z klíčiach semien petržlenu (*Petroselinum crispum* cv. Olomoucká dlouhá). Ako akceptorový substrát sa použil 40 μ M roztok XGOS značený SR pre dot-blot metódu a 27,2 μ M roztok XGOS-SR pre HPLC. Ako donorové substráty boli použité HEC, LAM, GM, MLG, AX, PUS, XYL a pre porovnanie aj XG.

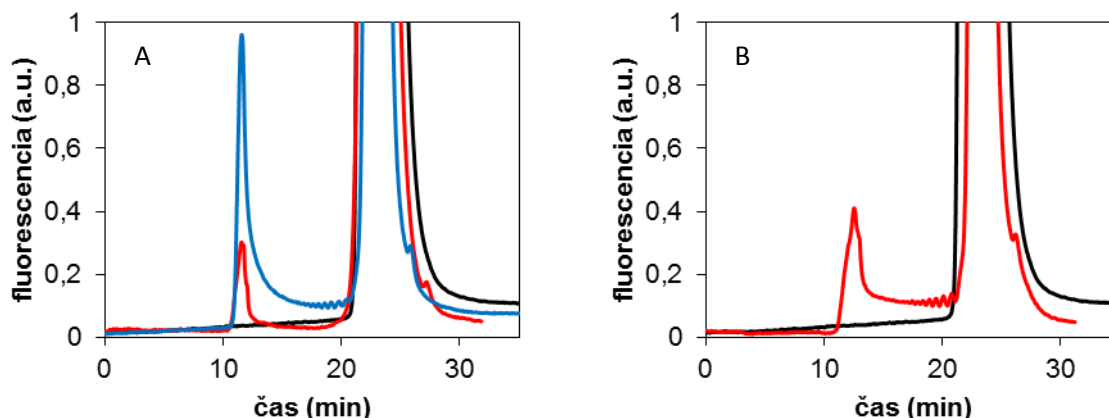
Priebeh reakcie (miera zabudovávania XGOS-SR do polymérneho substrátu v závislosti od doby reakcie) bol sledovaný pomocou izokratickej gélovej chromatografie na Hewlett Packard 1100 systéme s fluorescenčným a refraktometrickým detektorom kontrolovaným ChemStation softvérom (Agilent). Fluorescenčný detektor bol programovaný na excitačnú vlnovú dĺžku 530 nm a emisnú vlnovú dĺžku 575 nm. Analýzy boli robené na TSKgel G3000 SWXL kolóne, 7,8 x 300 mm (TosoHaas) pri teplote 24 °C. Kolóna bola kalibrovaná na XG detegovaný refraktometrom a XGOS-SR detegovaný fluorescenčným detektorom. Ako mobilná fáza bol použitý 100 mM octan sodný pH 5.7 s 20% acetonitrilom. Prietoková rýchlosť bola 0.5 ml/min.

Dot-blot metóda využívala interakciu papiera (Whatman 3MM) s polysacharidom, do ktorého sa v dôsledku transglykozylačnej reakcie zabudovávali XGOS-SR. Nezreagované oligosacharidy boli vymyté. Intenzita fluorescence produktu sa merala fluorescenčným detektorom Synergy HT 1 (Biotek), pričom sa použil papier zodpovedajúci tvarom a rozmerom 96-pozíciovej Elisa platni.

Výsledky a diskusia

Jediný donorový substrát, na ktorý bola stanovená dot-blot metódou heterotransglykozylačná aktivita proteínov (pravdepodobne XET) z klíčiacych semien petržľenu, bola HEC. Prekvapujúci bol pomer medzi aktivitou na substrátový pár HEC/XGOS-SR a XG/XGOS-SR, ktorý je prirodzeným substrátom XET – viac ako 50%. Tento istý pomer v klíčiacych semenách kapucínky sa pohyboval okolo 10%.

Výsledok inkorporácie XGOS-SR do XG a HEC stanovený gélovou chromatografiou na HPLC potvrdil tento výsledok (Obr. 1 A,B). Súčasne poukázal na oveľa nižšiu aktivitu XET v semenách petržľenu v porovnaní so semenami kapucínky.



Obr. 7: Elučný profil reakčných zmesí pozostávajúcich zo získaného proteínového extraktu z klíčiacych semien petržľenu a rozličných donor/akceptorových párov. A – XG/XGOS-SR (■ - 0 hod, ■ – 4 hod, ■ – 6,5 hod), B - HEC/XGOS-SR (■ – 0 hod, ■ – 6,5 hod).

Ďalší významný rozdiel medzi XET z týchto dvoch zdrojov bola výrazne vyššia špecificita XET zo semien petržľenu vzhľadom na ďalšie donorové substráty. Kým XET z kotyledonu kapucínky vôbec nekatalyzovala len reakcie, v ktorých ako donory slúžili XYL, PUS a AX, XET zo semien petržľenu nekatalyzovala ani reakcie s LAM, MLG a GM.

Schopnosť XET katalyzovať okrem reakcie substrátového páru XG/XGOS-SR aj reakciu HEC/XGOS-SR sa zdôvodňuje homológiou medzi štruktúrou XG a HEC, keďže tieto polysacharidy majú rovnakú štruktúru hlavného reťazca a bočné reťazce XG čiastočne priestorovo nahrádzajú hydroxyetyly HEC. Z tohto dôvodu je sporné, či sa dá aktivita na substrátový pár HEC/XGOS považovať za heteroaktivitu.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50 %) a finančnej podpore poskytnutej VEGA 2/0020/12 a ústavnou podporou RVO: 68081715 Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i.

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res.*, 341, 577-581.
 Fry S.C. (1997). *Plant J.* 11, 1141–1150.
 Fry, S.C., Mohler, K.E., Nesselrode, B.H.W.A., Franková, L. (2008). *Plant J.*, 55, 240-252..
 Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
 Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Řehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulková, H., & Farkaš, V. (2010). *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 207–215. Doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.016.

In vivo lokalizácia zabudovania značených oligosacharidov do štruktúr rastlinnej bunky

Zuzana Zemková, Renáta Vadkertiová, Ivan Zelko, Vladimír Farkaš a Eva Stratilová*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-94976 Nitra, Slovensko

*chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

Bunková stena, kotyledon, sulforodamín, *Tropaeolum majus*, značené oligosacharidy

Úvod

Ait Mohand a Farkaš boli prví, ktorí publikovali (rok 2006) nový typ transglykozylačnej reakcie, ktorá bola katalyzovaná surovým proteínovým extraktom z klíčiach semien kapucínky, tzv. heterotransglykozyláciu. Heterotransglykozylácia znamená prenos odštiepeného sacharidového fragmentu na štrukturálne odlišný sacharid. Až v roku 2010 priradili Stratilová a kol. túto aktivitu, resp. aktivitu, majoritnej forme xyloglukánendotransglykozylázy (XET, EC 2.4.1.207).

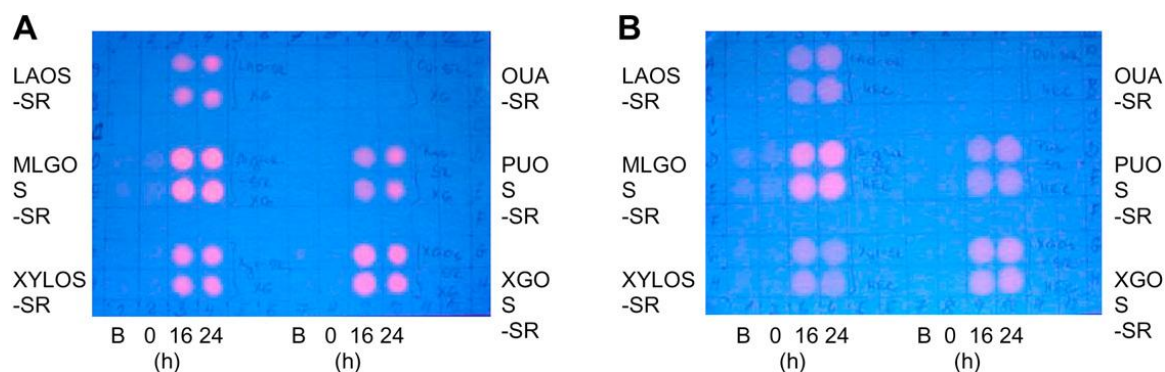
Vzhľadom na vypracovanú metodiku *in vivo* stanovenia transglykozylačnej aktivity tohto enzýmu (Vissenberg a kol., 2000; Ibatullin a kol., 2009), bolo cieľom tejto práce stanoviť, či sa heterotransglykozylačné aktivity prejavajú aj *in vivo*. Použili sa oligosacharidy fluorescenčne značené sulforodamínom podľa metódy vypracovanej Kosíkom a Farkašom (2008).

Materiál a metódy

Klíčiace semená kapucínky (kotyledon *Tropaeolum majus*) boli nakrájané na tenké plátky a inkubované s jantaranovým tlmivým roztokom pH 5,5 obsahujúcim 27,2 $\mu\text{mol/l}$ oligosacharidov značených sulforodamínom (SR). Ako oligosacharidy sa použili XGOS (xyloglukán oligosacharidy), LAOS (laminarioligosacharidy), MLGOS (zmiešané $\beta(1,3;1,4)$ -glukooligosacharidy), XYLOS (xylooligosacharidy) a PUOS (pustulooligosacharidy). Po ukončení reakcie (1 hod pre XGO9 a 6 hod pre ostatné) boli rezy premývané 12 hod roztokom etanol:kyselina mravčia:voda (66:5:2), za čím nasledovalo opakované premývanie 60% etanolom. Inkorporácia oligosacharidov bola sledovaná pomocou fluorescenčného mikroskopu Nikon Eclipse 80i (CFI 15 x 40 CFI Plan Fluor) s použitím excitačnej vlnovej dĺžky 550 nm a emisnej vlnovej dĺžky 570 nm. Výsledok bol dokumentovaný DS-Fil Nikon kamerou (rozlíšenie 5 Mpx).

Výsledky a diskusia

Heterotransglykozylačné aktivity, ktoré boli stanovené v extraktoch z klíčiach semien kapucínky tzv. dot-blot metódou, sú znázornené na Obr. 1. Ako z obrázku vyplýva, jediná pozitívna reakcia sa nezistila s OUA-SR, ktoré ako jediné reprezentovali nabité molekuly oligogalakturónových kyselín. Ostatné neutrálne oligosacharidy ako LAOS-SR, MLGOS-SR, XYLOS-SR a PUOS-SR boli schopné sa zabudovať do xyloglukánu (XG, Fig.1A) alebo jeho analógu hydroxyetylcelulózy (HEC, Fig. 1B) rovnako ako XGOS-SR, ktoré reprezentovali prirodzený substrát pre XET.



Obr. 1: Stanovenie heterotransglykozylačných aktivít v extrakte z klíčiacych semien kapucínky dot-blot metódou. A – donorový substrát XG a B – donorový substrát HEC.

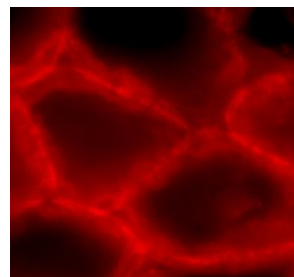
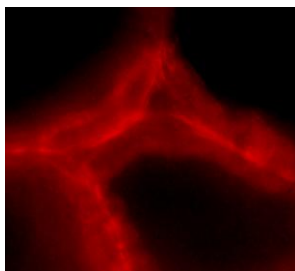
In vivo stanovenia boli robené s oligosacharidmi, na ktoré bola v dot-blot metóde stanovená pozitívna reakcia (Obr. 2).

Značený substrát:

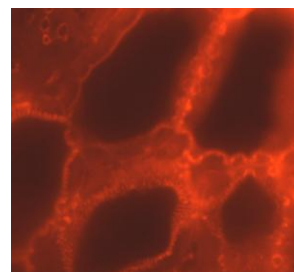
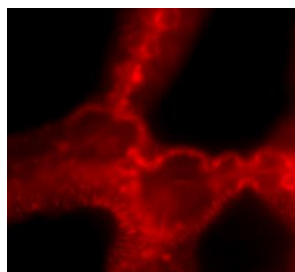
Detail

Hrubý rez

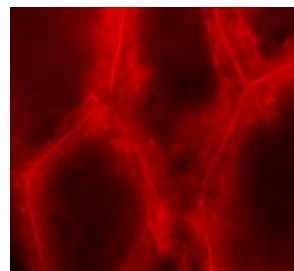
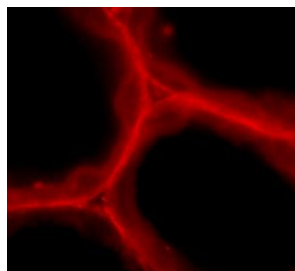
XGOS-SR



LAOS-SR



MLGOS-SR

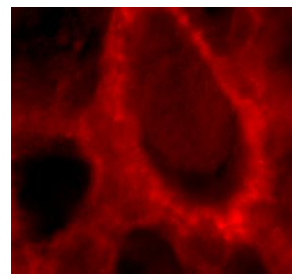
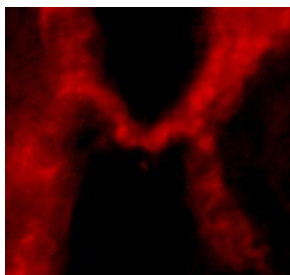


Značený substrát:

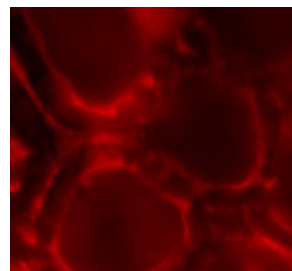
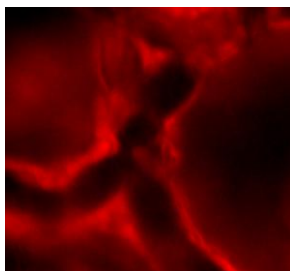
Detail

Hrubý rez

XYLOS-SR



PUOS-SR



Obr. 2: In vivo lokalizácia zabudovania fluorescenčne značených oligosacharidov do štruktúr kotyledonu *Tropaeolum majus*.

Ako vyplýva z výsledkov mikroskopického stanovenia, všetky značené oligosacharidy sa zabudovali do štruktúr bunky, ako naznačovali výsledky s proteínovými extraktami. S výnimkou PUOS-SR sa všetky typy oligosacharidov v súlade s očakávaním zabudovali do bunkovej steny, čím indikovali reakciu nešpecifickej formy XET (Stratilová a kol., 2010). PUOS-SR sa primárne zabudovávali do cytoplazmatickej membrány a tým sa stali predmetom ďalšieho výskumu (Zemková a kol., 2012).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res*, 341, 577-581.
- Ibatullin, F.M., Banasiak, A., Baumann, M.J., Greffe, L., Takahashi, J., Mellerowicz, E.J., & Brumer, H. (2009). *Plant Physiol.*, 151, 1741-1750. Doi: 10.1104/pp.109.147439
- Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
- Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Řehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulková, H., & Farkaš, V. (2010). *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 207-215. Doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.016.
- Vissenberg, K., Martinez-Vilchez, I.M., Verbelen, J.P., Miller, J.G., & Fry, S.C. (2000). *Plant Cell*, 12, 1229-1237.
- Zemková, Z., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulka, P., Zelko, I., Vadkertiová, R., Farkaš, V., & Stratilová, E. (2012). *Chem. Pap.*, DOI: 10.2478/s11696-012-0167-x

In vivo lokalizácia zabudovania značených oligosacharidov do štruktúr rastlinnej bunky II. – celooligosacharidy, manooligosacharidy, arabinogalaktooligosacharidy, arabinoxyloligosacharidy, galaktomanooligosacharidy

Zuzana Zemková, Ivan Zelko, Danica Kučerová, Renáta Vadkertiová, Vladimír Farkaš a Eva Stratilová*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

*chemevi@savba.sk

Kľúčové slová

Bunková stena, kotyledon, sulforodamín, *Tropaeolum majus*, značené oligosacharidy

Úvod

Ait Mohand a Farkaš boli prví, ktorí publikovali (rok 2006) nový typ transglykozylačnej reakcie, ktorá bola katalyzovaná surovým proteínovým extraktom z klíčiach semien kapucínky, tzv. heterotransglykozyláciu. Heterotransglykozylácia znamená prenos odštiepeného sacharidového fragmentu na štrukturálne odlišný sacharid. Až v roku 2010 priradili Stratilová a kol. túto aktivitu, resp. aktivitu, majoritnej forme xyloglukánendotransglykozylázy (XET, EC 2.4.1.207).

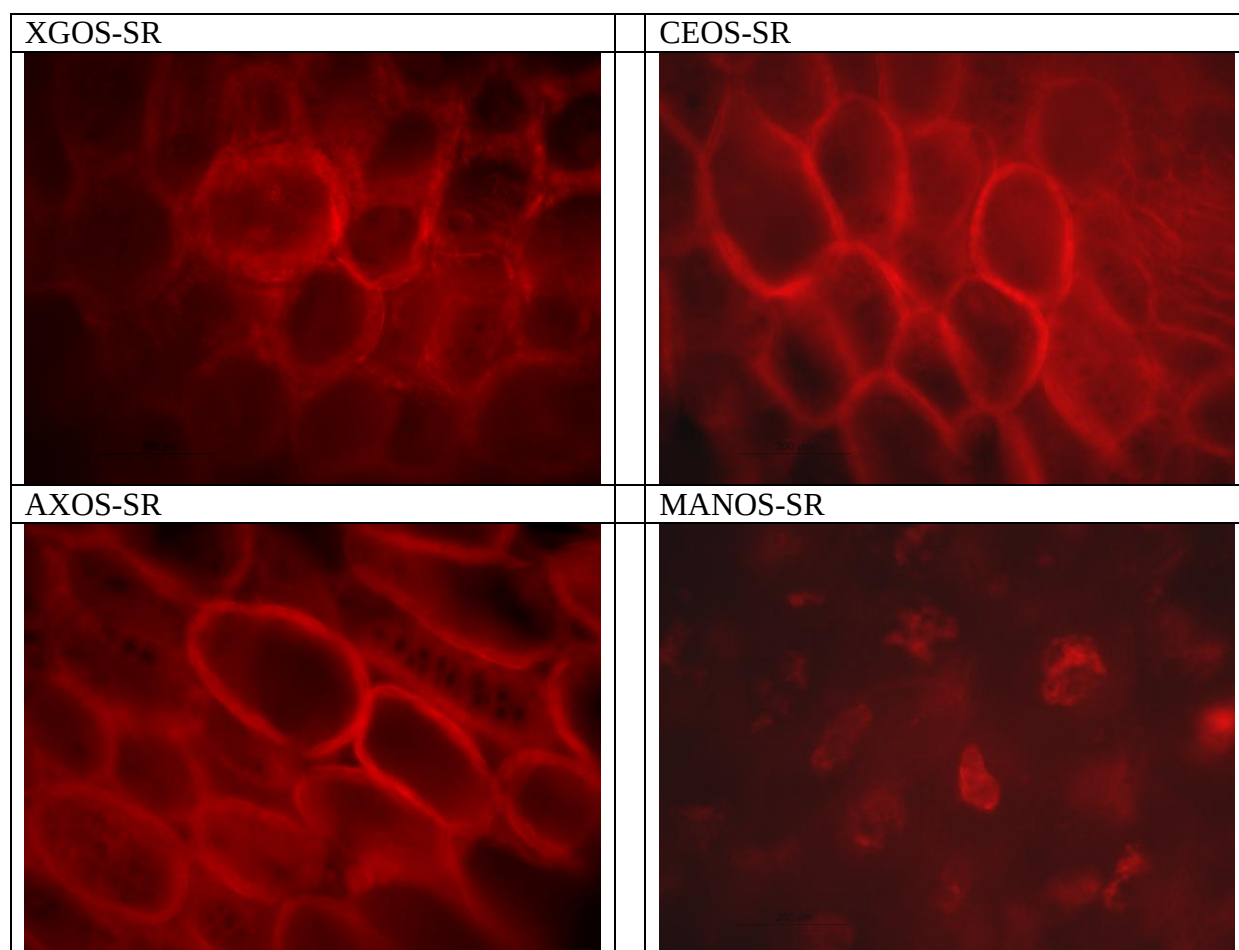
Vzhľadom na to, že v surových extraktoch z kapucínkového kotyledonu boli identifikované heterotransglykozylačné aktivity na ďalšie substrátové páry, využila sa vypracovaná metodika *in vivo* stanovenia transglykozylačnej aktivity XET (Vissenberg a kol., 2000; Ibatullin a kol., 2009) na potvrdenie toho, že tieto reakcie prebiehajú aj *in vivo* a že sú katalyzované XET, t.j. prebiehajú primárne v bunkovej stene. Použili sa oligosacharidy fluorescenčne značené sulforodamínom podľa metódy vypracovanej Kosíkom a Farkašom (2008).

Materiál a metódy

Klíčiace semená kapucínky (kotyledon *Tropaeolum majus*) boli nakrájané na tenké plátky a inkubované s 0,1 M citrát-fosfátovým tlmivým roztokom pH 5,5 obsahujúcim 27,2 $\mu\text{mol/l}$ oligosacharidov značených sulforodamínom (SR). Ako oligosacharidy sa použili XGOS (xyloglukán oligosacharidy), AGOS (arabinogalaktooligosacharidy), AXOS (arabinoxyloligosacharidy), CELOS (celooligosacharidy), MANOS (manooligosacharidy) a GMOS (galaktomanooligo-sacharidy). Po ukončení reakcie (1 hod pre XGO9 a 6 hod pre ostatné) boli rezy premývané 2 dni tlmivým roztokom. Inkorporácia oligosacharidov bola sledovaná pomocou invertovaného fluorescenčného mikroskopu Leica DMI 3000B. Výsledok bol dokumentovaný DFC 295 - Leica kamerou.

Výsledky a diskusia

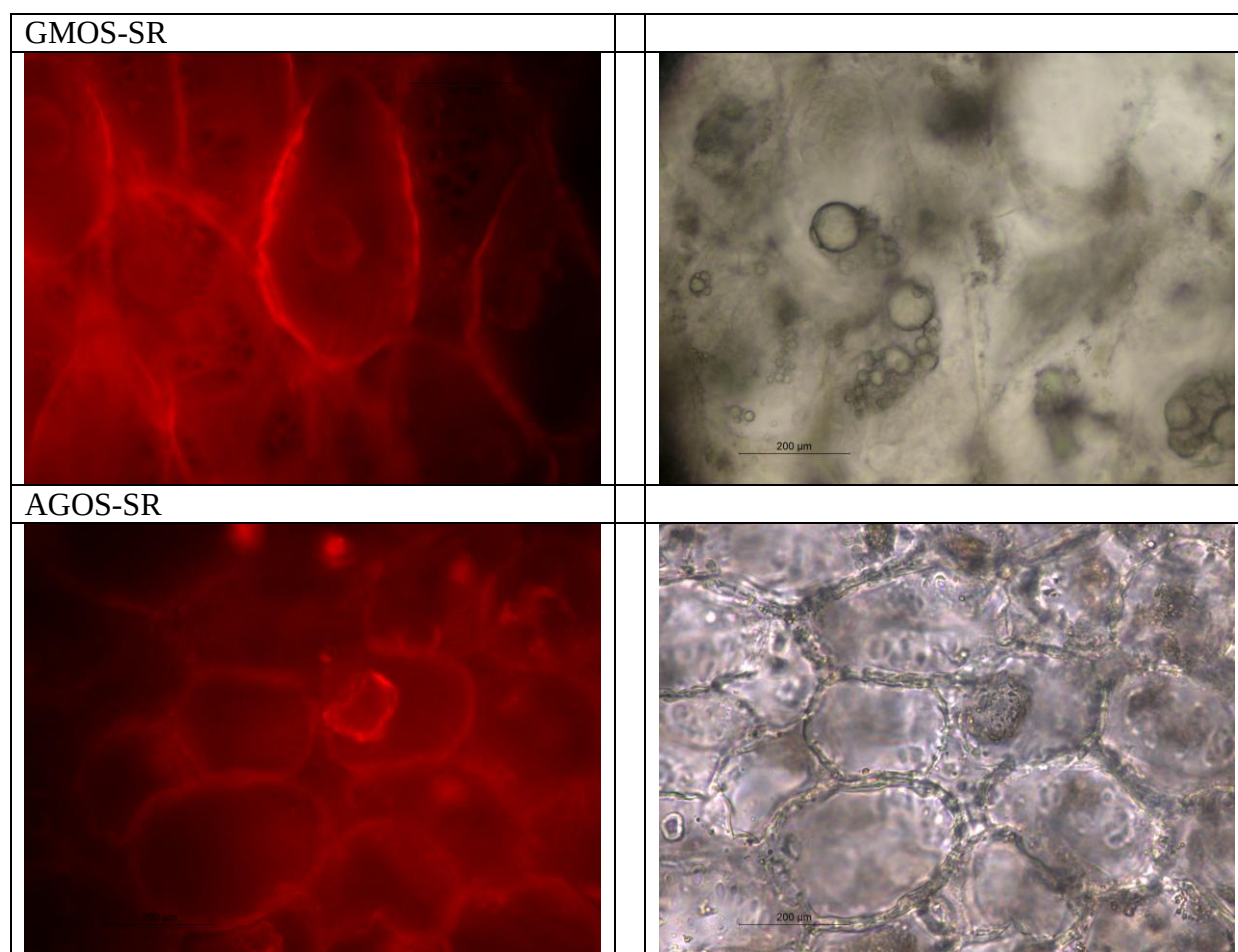
In vivo stanovenia boli robené s oligosacharidmi, na ktoré sa zistila metódou gélovej chromatografie (HPLC) pozitívna reakcia na nové substrátové páry (Obr. 1, 2).



Obr. 1: In vivo lokalizácia zabudovania fluorescenčne značených oligosacharidov do štruktúr kotyledonu *Tropaecolum majus*.

Ako vyplýva z výsledkov mikroskopického stanovenia na Obr. 1, CEOS-SR a AXOS-SR sa zabudovávali do bunkovej steny ako XGOS, ktoré reprezentujú typickú reakciu XET. Naopak MANOS sa zabudovávali do vnútra bunky, pravdepodobne do zásobných polysacharidov. Ďalšie oligosacharidy, GMOS, reagovali primárne s polysacharidmi bunkovej steny, ale slabá reakcia bola pozorovaná aj so zásobnými polysacharidmi, pravdepodobne so škrobom (Obr. 2). AGOS reagovali podobne, ale výraznejšia reakcia ako s bunkovou stenou, ktorá bola v porovnaní s ostatnými oligosacharidmi s výnimkou MANOS veľmi slabá, bola pozorovaná so zásobnými polysacharidmi vo vnútri bunky (Obr. 2). Zabudovanie posledných dvoch oligosacharidov bolo sledované aj v svetlom poli, aby sa zabudovanie dalo lepšie lokalizovať (Obr. 2).

Výsledky podčiarkujú nutnosť ďalších experimentov týkajúcich sa reakcie MANOS, AGOS a prípadne aj GMOS s polysacharidmi alebo inými látkami v bunkách kotyledonu *Tropaecolum majus*.



Obr. 2: In vivo lokalizácia zabudovania fluorescenčne značených oligosacharidov do štruktúr kotyledonu *Tropaeolum majus*. Naľavo – fluorescenčné stanovenie, napravo – stanovenie v svetlom poli.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res*, 341, 577-581.
- Ibatullin, F.M., Banasiak, A., Baumann, M.J., Greffe, L., Takahashi, J., Mellerowicz, E.J., & Brumer, H. (2009). *Plant Physiol.*, 151, 1741-1750. Doi: 10.1104/pp.109.147439
- Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
- Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Řehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulková, H., & Farkaš, V. (2010). *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 207–215. Doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.016.
- Vissenberg, K., Martinez-Vilchez, I.M., Verbelen, J.P., Miller, J.G., & Fry, S.C. (2000). *Plant Cell*, 12, 1229–1237.

Porovnanie foriem xyloglukánendotransglykozylázy v rôznych častiach dvojklíčnolistových rastlín

Soňa Garajová, Fairouz Ait Mohand, Zuzana Zemková, Vladimír Farkaš a Eva Stratilová*

*Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; *chemevi@savba.sk*

Kľúčové slová

Dvojklíčnolistové rastliny, *Petroselinum crispum*, *Tropaeolum majus*, bunková stena, transglykozylázy, heterotransglykozylácia

Úvod

Enzým xyloglukánendotransglykozyláza (XET) sa našiel vo všetkých rastlinách, od najnižších ako riasy (Van Sandt a kol. 2006) cez prasličky (Fry a kol. 2008), jednoklíčnolistové (Hrmova a kol. 2007, 2009) až po dvojklíčnolistové rastliny (Vissenberg a kol. 2003). Funkciou tohto enzýmu, ktorý sa nachádza výlučne v rastlinách, je aktívne predlžovanie a skracovanie xyloglukánu rastlinných bunkových stien, ktoré umožňuje rozpínanie steny, ktoré je nevyhnutné pri raste buniek. Toto predlžovanie a skracovanie sa deje pomocou transglykozylačnej reakcie, ktorá primárne prebieha medzi dvomi vláknami xyloglukánu (XG). Ait Mohand a Farkaš boli prví, ktorí publikovali (2006) nový typ transglykozylačnej reakcie, ktorá bola katalyzovaná surovým proteínovým extraktom z klíčiach semien kapucínky, tzv. heterotransglykozyláciou. Heterotransglykozylácia znamená prenos odštiepeného sacharidového fragmentu na štrukturálne odlišný sacharid.

Na stanovenie týchto aktivít sa využívajú ako akceptorové substráty rádioaktívne alebo fluorescenčne značené oligosacharidy (Kosík a Farkaš 2008). Samotné stanovenie sa dá uskutočniť delením produktov reakcie kvapalinovou chromatografiou (HPLC s príslušným detektorom) alebo tzv. dot-blot metódou, ktorá bola predstavená aj v podobe high-throughput metódy na glykočipoch (Kosík a kol. 2010).

Táto práca bola zameraná na porovnanie heterotransglykozylačných aktivít na xyloglukán (XG) a hydroxyetylcelulózu (HEC) ako donorové substráty a xyloglukán oligosacharidy (XGOS), pustulooligosacharidy (PUOS), xylooligosacharidy (XYLOS), laminarioligosacharidy (LAOS) a zmiešané β -1,3;1,4-glukooligosacharidy (MLGOS) ako akceptory v proteínových extraktoch získaných z rôznych častí kapucínky a petržlenu.

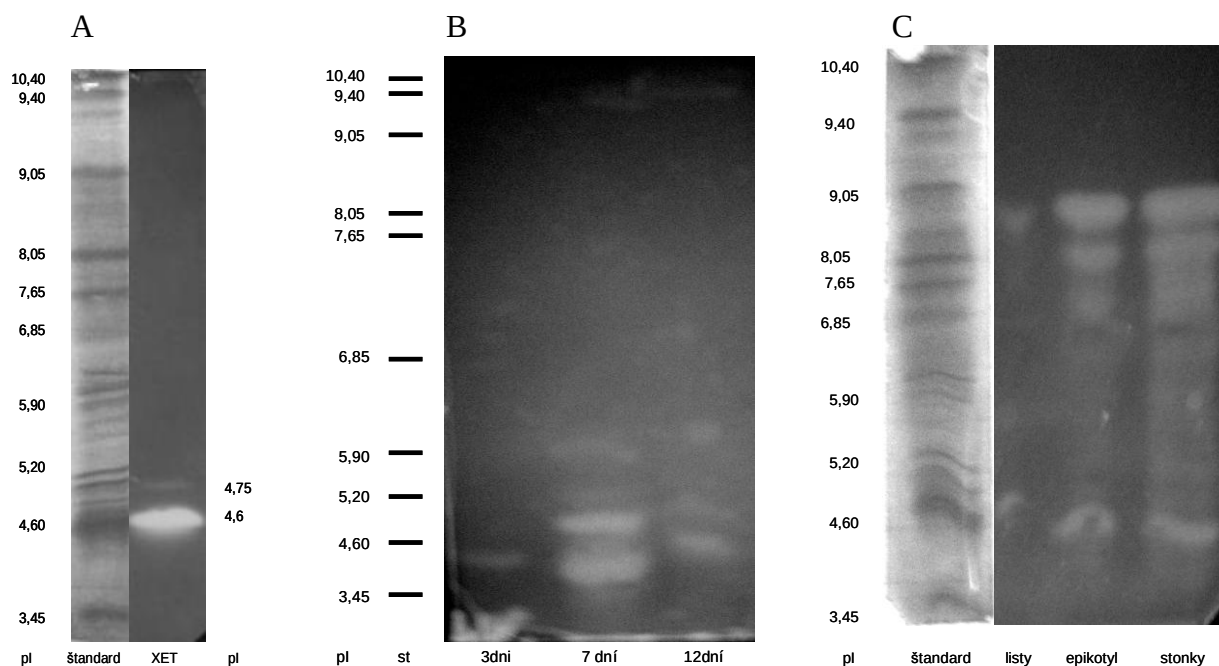
Materiál a metódy

Proteínové extrakty boli získané z klíčiach semien petržlenu a kapucínky, ako aj z koreňov petržlenu a nadzemných častí kapucínky reprezentovaných stonkami a listami. Mnohotné formy XET sa identifikovali pomocou IEF-PAGE a detekcie XET aktivity v géloch zymogramovou technikou využívajúcou fluorescenčne značené xyloglukán oligosacharidy (Farkaš a kol., 2005; Kosík, O. & Farkaš, V., 2008). Transglykozylačné aktivity a heterotransglykozylačné aktivity boli stanovené dot-blot metódou na papieri alebo nitrocelulózevej membráne a potvrdené gélovou filtráciou na HPLC. V oboch prípadoch sa využívali ako donorové substráty rasrtlinné polysacharidy a ako akceptory oligosacharidy odvodené od týchto polysacharidov značené fluorescenčne pomocou sulforodamínu (OS-SR).

Výsledky a diskusia

Výsledky IEF-PAGE sú zobrazené na Obr. 1 s výnimkou klíčiach kapucínkových semien (Stratilová a kol. 2010). XET sa vyskytovali v podobe mnohotných foriem vo všetkých častiach rastlín, hoci

kapucínka vykazovala vo všeobecnosti vyšší počet foriem ako petržlen. Najmenej foriem, len jedna majoritná a jedna minoritná, sa našli v koreňoch petrženu (Obr. 1 A).



Obr. 1: IEF-PAGE (pH 3-10): A - surového extraktu z koreňa petržlenu, B – surového extraktu z klíčiacych semien petržlenu a C – surových extraktov z nadzemných častí kapucínky (). Ako štandard sa použil Test Mix 9, ktorý sa vyfarbil Commassie blue. Aktivita XET (vpravo) sa detegovala zymogramovou technikou (Farkaš a kol., 2005).

Typické heterotransglykozylačné aktivity XET sa zistili len v semenách. V prípade kapucínky boli priradené výlučne majoritnej forme XET (Stratilová a kol. 2010). Dá sa predpokladať, že podobne to bude aj v semenách petržlenu, lebo v dvanásťdňovej rastlinke sa už heteroaktivity nedetegovali a navyše aj v semenách bola prítomná forma totožná s tou v koreňoch (Garajová a kol., 2009), ktorá heterotransglykozylačné aktivity nevykazovala. Výnimkou boli aktivity merané vo všetkých prípadoch na substrátové páry HEC/XGOS-SR a XG/CEOS-SR, ktoré za heteroaktivity nepovažujeme, keďže HEC je štrukturálnym analógom XG. Funkcia nešpecifických foriem XET indukovaných pri klíčení semien nie je známa.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Ait Mohand, F., & Farkaš, V. (2006). *Carbohydr. Res.*, 341, 577-581.
- Farkaš, V., Ait Mohand, F., Stratilová, E. (2005). *Plant Physiol. Biochem.*, 43, 431-435.
- Fry S.C. (1997). *Plant J.* 11, 1141–1150.
- Fry, S.C., Mohler, K.E., Nesselrode, B.H.W.A., Franková, L. (2008). *Plant J.*, 55, 240-252..
- Garajová, S., Flodrová, D., Ait-Mohand, F., Farkaš, V., Stratilová, E. (2008). *Biologia, Bratislava* 63, 313-319
- Hrmova, M., Farkaš, V., Lahnstein, J., & Fincher, G.B. (2007). *J. Biol. Chem.*, 282, 12951-12962.

- Hrmova, M., Farkaš, V., Harvey, J.H., Lahnstein, J., Wischmann, B., Kaewthai, N., Ezcurra, I., Teeri, T.T., & Fincher, G.B. (2009). *FEBS J.*, 276, 437-456.
- Kosík, O., & Farkaš, V. (2008). *Anal. Biochem.*, 375, 232-236. Doi: 10.1016/j.ab.2007.11.025
- Kosík, O., Auburn, R.P., Russell, S., Stratilová, E., Garajová, S., Hrmova, M., Farkaš, V. (2010) *Glycoconjugate J.*, 27, 79-87. Doi: 10.1007/s10719-009-9271-8.
- Stratilová, E., Ait-Mohand, F., Řehulka, P., Garajová, S., Flodrová, D., Řehulková, H., & Farkaš, V. (2010). *Plant Physiol. Biochem.*, 48, 207–215. Doi:10.1016/j.plaphy.2010.01.016.
- Van Sandt, V.S., Guisez, Y., Verbelen, J.P., Vissenberg, K. (2006). *J Exp Bot.*, 57,, 2909-2922.
- Vissenberg K., Van Sandt V., Fry S.C., Verbelen J.P. (2003). *J. Exp. Bot.*, 54, 335-344.

Combined Chemical, Biological and Theoretical DFT-QTAIM Study of Potent Glycosidase Inhibitors Based on Quaternary Indolizinium Salts

Peter Šafář,^[a,b] Jozefína Žúžiová,^[b] Štefan Marchalín,^[b] Nadežda Prónayová,^[c] Ľubomír Švorc,^[d] Viktor Vrábel,^[d] Sergej Šesták,^[e] Dubravko Rendić,^[f] Vincent Tognetti,^[g] Laurent Joubert,^[g] and Adam Dařch^[a]

^[a] URCOM, EA 3221, INC3M CNRS FR3-038, UFR des Sciences & Techniques de l'Université du Havre, 25 rue Philippe Lebon, BP 540, 76058 Le Havre Cedex, France

Fax: +33-2-32744391

^[b] Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemical & Food Technology, University of Technology, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovakia

^[c] Central Laboratories Faculty of Chemical & Food Technology, University of Technology, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovakia

^[d] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical & Food Technology, University of Technology, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovakia

^[e] Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovakia

^[f] Department für Chemie, Universität für Bodenkultur, Muthgasse 18, 1190 Wien, Austria

^[g] IRCOF, CNRS UMR 6014 & FR 3038 Université de Rouen & INSA de Rouen, 76821 Mont St Aignan Cedex, France

Introduction

Six novel enantiopure epimeric indolizidinediols have been easily prepared in high yields by an effective and well-established regioselective THF ring-opening reaction as a key step. Quarternization of these species was also studied and comparison was made to the quaternizations of other substituted indolizidines. Importantly, a combined theoretical DFTQTAIM study has cast light on the various factors that explain the observed conformational selectivity. The inhibitory properties of the six synthesized indolizidines were then investigated against the recombinant Golgi α -mannosidase-IIb (dGMIIb) and lysosomal α -mannosidase (dLM408), human homologues of *Drosophila melanogaster*. Among the tested compounds, two of them, **4a** and **4b**, exhibited a pH-dependent inhibition of dGMIIb at the milimolar level ($IC_{50} = 3.5$ or 1.7 mM at pH 5.8 or 6.5, respectively) without affecting the activity of dLM408.

Methods (Poláková et al., 2011; Paschinger et al., 2006)

Expression of Recombinant Enzymes

The expression of both α -mannosidases was performed in *Pichia pastoris*. The enzyme was expressed in a secreted form into the condition medium. The supernatant of the condition medium was used as a crude enzyme or further purified by His-tag affinity chromatography.

α -Mannosidase Assay

The enzyme assay was performed with the substrate PNP-Manp at 37 °C in 100 mM sodium acetate buffer at two different pH. The reactions were terminated by the addition of 100 mM Na₂CO₃ (0.5 mL) and the absorbances were recorded at 410 nm. The samples were prepared in triplicate.

Inhibition Assay

Inhibition assays of the new indolizidine analogues with dGMIIb and dLM408 mannosidases were carried out under the conditions outlined above. Stock concentrations of inhibitors were made up in deionized H₂O at a concentration of 100 mM and stored at -20 °C. Swainsonine and mannostatin-A were used as standard α -mannosidase inhibitors. The IC₅₀ values (concentrations of inhibitor at which 50% of activity remains) were determined.

Results of biological activity

Glycosidases are enzymes that catalyse the cleavage of glycosidic bonds and are clinical targets in the design of potent inhibitors (drugs). Inhibition of mannose-trimming enzyme Golgi α -mannosidase II (GMII) would provide a therapeutic tool for the blocking of onco-related cell-surface oligosaccharide structures (Dennis et al., 1999). The alkaloid swainsonine, a natural inhibitor of GMII, and some other indolizidine derivatives that have been synthesized and clinically tested exhibit inhibitory effects also towards lysosomal mannosidase (LM) and strongly induce problems identical to lysosomal storage disease, mannosidosis (Dorling et al., 1980; Tulsiani et al., 1985). Thus the design and synthesis of new selective GMII inhibitors is now very challenging for many synthetic and clinical laboratories. Epimeric indolizidinediols **4a,b** are analogues of the alkaloid 6-(+)-epicastanospermine. As we planned initially, the glycosidase inhibitory activities of the six reported compounds **2a,b**, **4a,b** and **7a,b** were studied with two glycosidases at two different pH values, 5.8/6.5 and 5.2/6.5, in each case, and the results are shown in Table 1. In fact, two out of the six new indolizidine compounds tested (**4a** and **4b**) exhibited selective inhibitory activity towards Golgi α -mannosidase without affecting the lysosomal α -mannosidase activity. The inhibition is more pronounced at pH values above the pH optimum of the enzymes.

Acknowledgments

Biological part of this work was supported by the Grant Agency of the Slovak Republic (grant numbers 02/0176/11). This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for white-green biotechnology (ITMS 26220120054), supported by the Research & Development Operational Programme funded by the European Regional Development Fund (ERDF).

Literature

- Poláková M, Šesták S, Lattová E, Petruš L, Mucha J, Tvaroška I, Kóňa J (2011) *Eur. J. Med. Chem.*, 46, 944–952.
- Paschinger K, Hackl M, Gutternigg M, Kretschmer-Lubich D, Stemmer U, Jantsch V, Lochnit G, Wilson IB (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 28265–28277.
- Dennis JW, Granovsky M, Warren CE (1999) *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. Biochim. Biophys. Acta*, 1473, 21–34.
- Dorling PR, Huxtable CR, Colegate SM (1980) *Biochemistry J.*, 191, 649–651.
- Tulsiani DRP, Broquist HP, Touster O (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, 236, 427–434.

The role of phosphorylation of Ire1p for the sensing of endoplasmic reticulum stress

Sergej Šesták^a, Miroslava Droppová^a, Jakub Boška^a, Ahmed A. Ali^b, Martin Schröder^b

^[a] Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovakia

^[b] School of Biological and Biomedical Sciences, Durham University, South Road, Durham, DH1 3LE, United Kingdom

Introduction

Endoplasmic reticulum (ER) stress is characterized by the accumulation of toxic misfolded protein aggregates in the ER lumen. Ire1 is an evolutionarily conserved, ER stress sensor present in all eukaryotes with both protein kinase and ribonuclease activities. These activities are critical for the induction of the Unfolded Protein Response (UPR), a complex set of homeostatic mechanisms evolved to cope with ER stress in eukaryotes by promoting protein folding and maturation in the ER. Ire1 detects elevated unfolded protein levels in the ER and transmits a signal to the nucleus by splicing mRNAs encoding master transcriptional regulators of the UPR response - Hac1p in yeast - independent of the spliceosome. Inactive unspliced *HAC1* (*HAC1^u*) is spliced to mature *HAC1* (*HAC1ⁱ*, *i* - means induced) which execute the UPR transcription program to upregulate the expression of a multitude of gene products including ER-resident proteins that promote protein folding and maturation and ER-associated proteins involved in protein degradation. The identical activation of UPR occurs in metazoans through transcription factor Xbp1 (*XBP1^u* – unspliced and *XBP1^s* – spliced). Ire1 is a type I transmembrane receptor consisting of an N-terminal ER luminal domain, a transmembrane segment and a cytoplasmic region. The cytoplasmic region of Ire1 encompasses a protein kinase domain followed by a RNase domain. In analogy to many transmembrane receptor kinases, the signal induced dimerization/oligomerization of human and yeast Ire1 in the plane of a membrane is thought to promote trans-phosphorylation on positive regulatory sites within the protein kinase domain. In addition to effecting a change in its protein kinase catalytic function, dimerization and autophosphorylation of Ire1 lead to the activation of its ribonuclease activity.

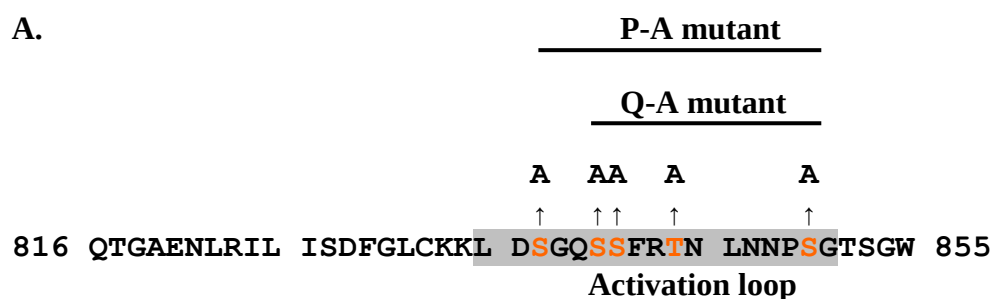
Ire1 expressed in *E. coli* has ~3 clusters where it autophosphorylates. These are the linker domain, the activation loop, and the insertion loop in the kinase domain. Based on knowledge

on other protein kinases, the five phosphorylation sites in the activation loop (S837, S840, S841, T844, and S850) are involved in formation of the kinase active conformation. In some kinases, so-called phosphorylation-dependent RD kinases, the kinase active conformation is formed when phosphorylated residues in the action loop are deposited into a basic pocket formed by R796 and K833 in yeast Ire1. There may be a primary phosphorylation site in the activation loop, whose deposition into the RD pocket forms the kinase active conformation. The other phosphorylation sites in the activation may have other (if any) roles. The role of these pphosphorylation sites was studied as a part of cooperative project with Dr. Martin Schröder from Durham University, UK.

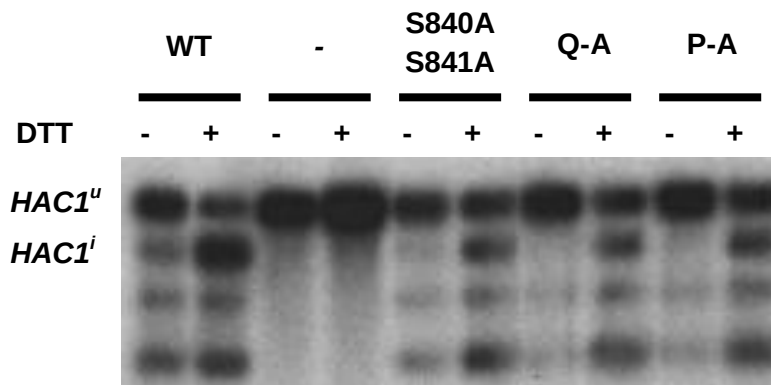
Results

Single phosphorylation sites of activation loop in yeast Ire1 protein were generated by mutagenesis (S837) or cloning (S840, S841, T844, S850) into YCplac33 plasmid. Plasmids carrying single mutation in IRE1 together with empty vector or wilde type (WT) IRE1 plasmid were transformed into *S. cerevisiae* strain with deleted IRE1 gene ($\Delta ire1$). Yeast transformed with empty vector (YCplac33) was used as $\Delta ire1$ control (unable to activate UPR pathway) and with WT IRE1 as positive control. The mutants were tested by spotting analysis on selective media supplemented with either DTT or tunicamycin, the effectors of protein folding. The correlation of the growth phenotype during stress conditions with HAC1 splicing will be done in cooperation with partner at Durham University, UK.

A.



B.



C.

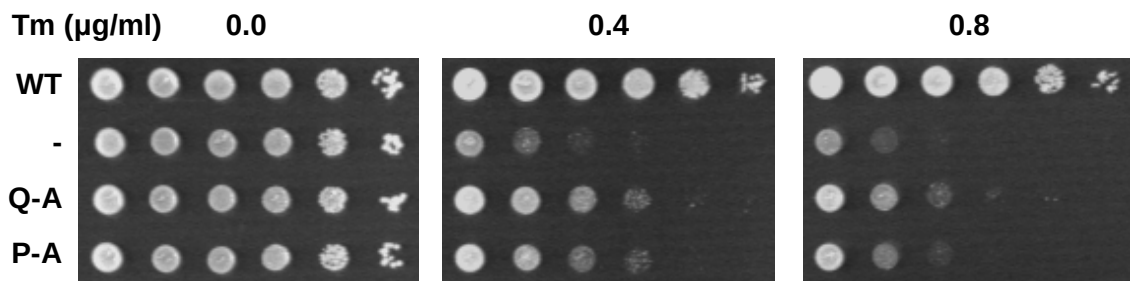


Figure 1. A-loop phosphorylation is not required for RNase activity. (A) The activation loop of Ire1. Used phosphorylation sites in *S. cerevisiae* Ire1 are shown in red, indicating the nature of the Q-A and P-A mutants. **(B)** Northern blot showing that Q-A-Ire1 retains full RNase activity monitored as *HAC1* splicing. Unsliced *HAC1* (*HAC1^u*) and spliced *HAC1* (*HAC1ⁱ*, *i* = induced) are indicated. Two smaller bands correspond to two cleavage intermediates consisting of the 1st exon plus the intron and the 1st exon. The ER stress was executed using 2 mM DTT for 2 hours. **(C)** Spotting assays showing that Q-A and P-A-Ire1 confer partial resistance to ER stress. Five microliters of five serial 1:10 dilutions of the stock solution corresponding to density $A_{600} = 3$ yeast culture in 100 µl of H₂O were spotted on synthetic selective SD agar medium without uracil supplemented with tunicamycin of indicated concentration. The growth at 30 °C was recorded after 2-3 days.

Tm = tunicamycin; DTT = dithiothreitol

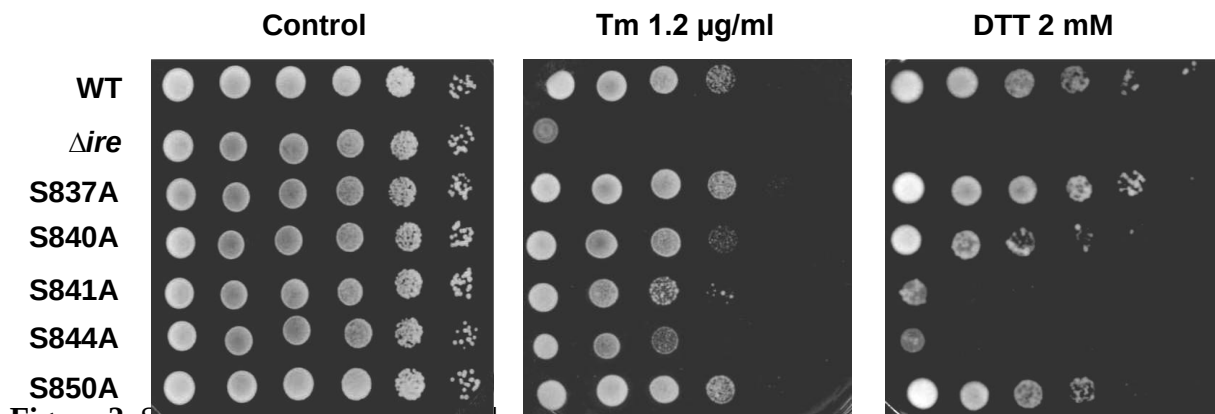


Figure 2. Single alanine mutants of phosphorylation sites in *S. cerevisiae* Ire1 respond differently to ER stress.

Conclusion

There is the question of how Ire1 gains kinase activity. Our mutational analysis of yeast Ire1 supports that Ire1 is a phosphorylation-dependent protein kinase, and that activation loop phosphorylation is important for kinase activity, as it is evident from multiple mutants. To test the role of the individual phosphorylation sites single mutants in all phosphorylation sites of activation loop in yeast Ire1 protein were generated and checked for the ability to activate UPR pathway. They showed different degree of sensitivity towards ER stress. While S837 and S850 were unsensitive or almost unsensitive towards ER stress, the other three mutants were sensitive and seem to play an important role in the formation of active kinase conformation.

Acknowledgment

This work was supported by the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education of Slovak Republic and Slovak Academy of Sciences, the project VEGA 02/0194/11 and grants of M. Schröder. This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for white-green biotechnology (ITMS 26220120054), supported by the Research & Development Operational Programme funded by the European Regional Development Fund (ERDF).

Evolučné štúdie polyfosfátkináz

Lucia Achbergerová a Jozef Nahálka*

Chemický ústav SAV, Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76
Nitra, Slovensko

*nahalka@savba.sk

Kľúčové slová

Polyfosfátkináza, polyfosfát, evolúcia, ATP, ADP

Úvod

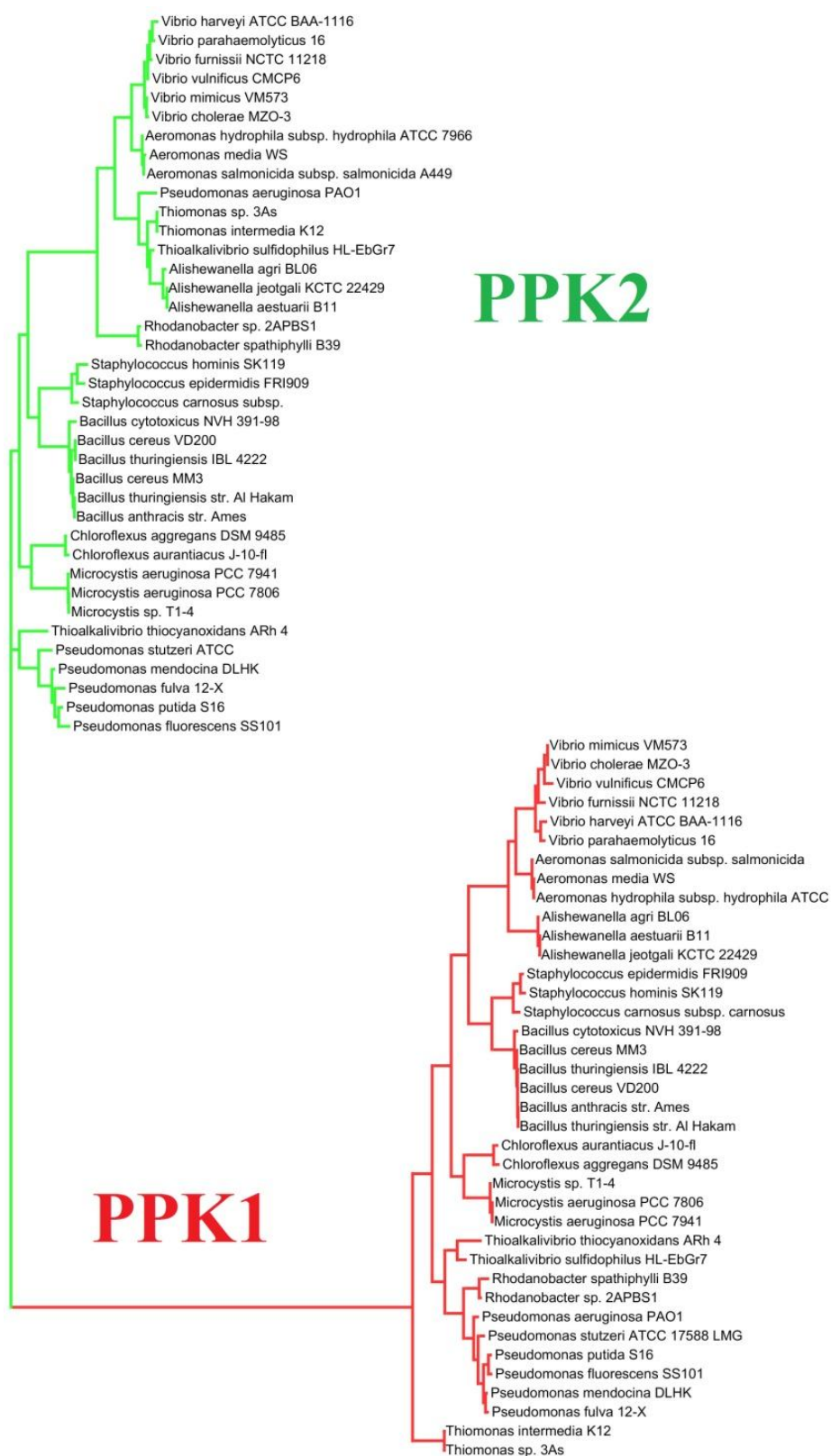
Polyfosfát (polyP) je lineárna molekula pozostávajúca z desiatok až stoviek fosfátových zvyškov (Kulaev, 1975). PolyP by mohol byť bohatým zdrojom energie od prebiotického obdobia až dodnes. Je však veľa nezodpovedaných otázok ohľadom pôvodu a funkcie polyP. Podľa teórie prof. Arthura Kornberga, ktorý charakterizoval polyP ako bioenergetickú fosíliu, bol polyP vytvorený počas prebotickej evolúcie Zeme a stal sa hlavným zdrojom energie prvých organizmov na Zemi (Kornberg, 1995). Polyfosfátkinázy (PPK) sú kľúčové enzýmy zapojené do metabolizmu polyP (Kornberg et al., 1956). Tieto enzýmy katalyzujú polymerizáciu a degradáciu polyP vlákna za súčasnej produkcie alebo spotrebe ATP (Kornberg et al., 1956; Kuroda and Kornberg, 1997). Keďže otázky polyP a PPK sú úzko prepojené, z uvedenej teórie vyplýva, že PPK sú evolučne staré enzýmy. Bolo popísaných viacero PPK, prevažne vyskytujúcich sa v doméne života Baktéria (Achbergerová and Nahálka, 2011). Naším cieľom bolo objasniť, ktorá PPK vyskytujúca sa v doméne života Baktéria je staršia. Či je to PPK1 alebo PPK2.

Materiál a metódy

Pre zostavenie kolekcie 109 proteínových sekvencií PPK1 a 109 proteínových sekvencií PPK2 sme použili proteínovú sekvenciu *Escherichia coli* PPK1 (PDB kód- 1XDO) a *Pseudomonas aeruginosa* PPK2 (PDB kód- 3CZP) (Berman et al., 2000) v štandardnom vyhľadávaní v programe BLAST (Altschul et al., 1990). Sekvencie sme zarovnali v programe Clustal X2 (Larkin et al., 2007) a USEARCH 5 (Edgar, 2010). Pre fylogenetické analýzy bol použitý program MEGA 5 (Tamura et al., 2011). Fylogenetický strom bol zostavený použitím štatistickej metódy Maximum Likelihood a modelu Whelan-Goldman. Redukovaný nezakorenený strom, uložený vo formáte Newick a graficky upravený v programe TreeGraph 2 (Stöver and Müller, 2010) je na obr. 1.

Výsledky a diskusia

Genetické duplikácie sa považujú za hlavný evolučný zdroj nových funkcií proteínov. Prvé práce Susumu Ohno hovorili o tom, že po zdvojení génu sa jeden z nich vymaní zo selektívneho obmedzenia a následne začne voľne hromadiť neutrálne mutácie, ktoré by boli inak v konzervovanom gène škodlivé (Ohno, 1999). V posledných rokoch prevláda však názor, že väčšina duplikovaných génov, ktoré sú fixované v populácii, zvyšuje fitness ak sú prítomné v dvoch alebo viacerých kópiách v genóme (Lynch and Conery, 2000; Kondrashov et al., 2002). Myslíme si,



Obr. 1: Nezakorenený strom zostavený použitím štatistickej metódy Maximum Likelihood a modelu Whelan-Goldman. Fylogenetický strom ukazuje evolúciu v poradí PPK2→PPK1.

že jedným z takých prípadov bola aj duplikáciu génu pre proteín PPK. V našej práci sme sa snažili zistiť, ktorý z génov pre proteín, PPK1 alebo PPK2 je starší. Použitím metód popísaných v kapitole materiál a metódy sme urobili fylogenetickú štúdiu 109 PPK1 a 109 PPK2 proteínových sekvencií. Nezakorenený strom sme zostavili štatistickou metódou Maximum Likelihood (model Whelan-Goldman). Na obr. 1 je

redukovaný strom zostavený z 38 PPK1 a 38 PPK2 sekvencií z jedenástich rodov (*Pseudomonas*, *Rhodanobacter*, *Thioalkalivibrio*, *Thiomonas*, *Chloroflexus*, *Microcystis*, *Alishewanella*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Bacillus*). Na základe tohto stromu môžeme povedať, že proteín PPK2 je starší ako PPK1.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Achbergerová, L., and Nahálka, J. (2011). *Microbial Cell Factories* 10, 63.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E. (2000). *Nucleic Acids Research* 28, 235 – 242.
- Edgar, R.C. (2010). *Bioinformatics*.
- Kondrashov, F.A., Rogozin, I.B., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2002). *Genome Biol* 3, research0008.1–research0008.9.
- Kornberg, A. (1995). *J Bacteriol* 177, 491 – 496.
- Kornberg, A., Kornberg, S.R., and Simms, E.S. (1956). *Biochim Biophys Acta* 20, 215 – 227.
- Kulaev, I.S. (1975). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 73, 131 – 158.
- Kuroda, A., and Kornberg, A. (1997). *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 439 – 442.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Lynch, M., and Conery, J.S. (2000). *Science* 290, 1151–1155.
- Ohno, S. (1999). *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10, 517–522.
- Stöver, B., and Müller, K. (2010). *BMC Bioinformatics* 11, 7.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.

Antioxidačná aktivita polysacharidov z listov Fallopie sachalinensis

Zdenka Hromádková*, Zuzana Košťálová,

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

*chemhrom@savba.sk

Kľúčové slová

Fallopia sachalinensis, antioxidačná aktivita, DPPH a FRAP metóda, pektín

Úvod

Primárne zdroje prirodzene sa vyskytujúcich antioxidantov sú všetky obilniny, ovocie a zelenina (Prakash a kol., 2001). V poslednej dobe sa zvyšuje záujem o prírodné antioxidanty vrátane polysacharidov, polyfenolových látok, vitamínu E a C a karotenoidov, ktoré sú považované za významné látky v prevencii proti oxidačnému stresu. Z chemického hľadiska sa za antioxidant považuje látka, ktorá zabraňuje autooxidácii. Autooxidácia je spôsobená prevažne radikálovou reťazovou reakciou medzi kyslíkom a substrátom. Antioxidanty sú zbierače radikálov, ktoré rušia radikálovú reťazovú reakciu.

Cieľom práce bolo posúdiť antioxidačnú aktivitu polysacharidov krídlatky sachalínskej (*Fallopia sachalinensis*) dvomi metódami.

Materiál a metódy

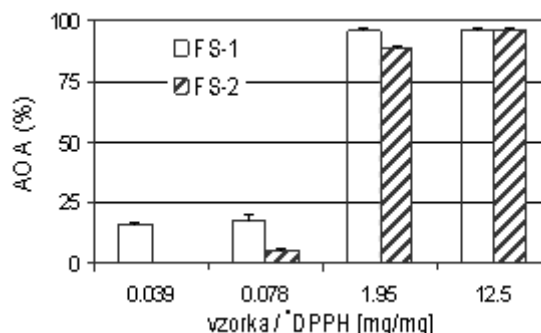
Listy krídlatky boli nazbierané v apríli 2007 v Českom Krumlove (ČR) a poskytnuté Dr. N. Vrchotovou (Centrum výskumu globálnej zmeny, AV ČR, v.v.i.). Listy boli usušené a pomleté na jemný prášok. Extrakciou podľa postupu uvedeného v práci Jureček a kol., 2012 sa získali dve polysacharidové frakcie. FS-1 extrahovaná destilovanou vodou a FS-2 extrahovaná acetátovým pufrom pH 4,8.

Obsah urónových kyselín (UA) bol stanovený s 3-hydroxybifenylovým činidlom (Blumenkrantz a Asboe-Hansen, 1973), kde galakturónová kyselina bola použitá ako štandard. Celkový obsah fenolov bol stanovený s Folin-Ciocalteu metódou (Yu a kol., 2002), kde sa ako štandard použila kyselinu gálovú. Na stanovenie antioxidačnej aktivity bola použitá DPPH metóda (Košťálová a kol. 2013) a FRAP metóda (Rao and Muralikrishna, 2006).

Výsledky a diskusia

Frakcie FS-1 a FS-2 predstavujú pektínové polysacharidy, ktoré sa líšia v obsahu kyslých cukrov FS-1 29,2% a FS-2 57,9 %. Vodný extrakt FS-1 obsahuje značne vyšší obsah fenolových látok (18,9 %) v porovnaní s FS-2 (7,1 %).

Schopnosť vychytávať stabilné voľné radikály DPPH sa testovala na obidvoch vodorozpustných polysacharidových frakciách extrahovaných z listov *F. sachalinensis*.



Obr. 1 . Antioxidačná aktivita polysacharidov FS-1 a FS-2 pri rôznych koncentráciách

Vychytaním $\text{DPPH}^{\bullet}$ pomocou antioxidantu dochádza k zmene hodnoty absorbanie pri 517 nm (zmena farby roztoku z fialovej na žltú), ktorá sa meria spektrofotometricky. Antioxidačná aktivita (AOA) polysacharidov sa výrazne zvyšovala so stúpajúcou koncentráciou vzorky (Obr.1). Frakcia FS-1 bola aktívnejšia pri nižších koncentráciách, zatiaľ čo pri koncentrácii 0,5 mg/ml sa aktivitou obidve frakcie vyrovnali.

Rovnakú tendenciu mali obidve vzorky pri sledovaní ich redukčnej schopnosti pomocou FRAP metódy. Základom tejto metódy je redukcia železitých iónov na železnaté pri nízkom pH, pričom sa tvorí farebný železnato-tripyridyltriazinový komplex. Roztok FeSO_4 pri rôznej koncentrácii bol použitý na vytvorenie kalibračnej krivky a FRAP hodnota bola vypočítaná porovnaním zmeny absorbancie pri 595 nm. Výsledky FRAP metódy (vyjadrené v $\mu\text{mol FeSO}_4$ ekvivalentu/1 g vzorky) dokazujú takmer 2,6 násobne vyššiu redukčnú schopnosť polysacharidu FS-1 (674.4 ± 11.8) v porovnaní s polysacharidom FS-2 (253.6 ± 15.2).

Je dokázané, že galakturónova kyselina alebo jej polymer tj. polygalaturónan sú silné antioxidanty (Rao and Muralikrishna, 2006). V tomto kontexte je zaujímavé, že polysacharid FS-1 s nižším obsahom UA (29,1 %) dosiahol maximálnu hodnotu AOA pri nižšej koncentrácii ako vzorka FS-2, ktorá mala obsah UA až 57,9 %. Z toho vyplýva, že vyšší obsah UA v polysacharide nie je jediným dôvodom vysokej antioxidačnej aktivity testovaných vzoriek. Polysacharidové frakcie obsahovali tiež fenolové látky, ktoré sú známe svojimi antioxidačnými vlastnosťami (Yu et al., 2002). V izolovaných polysacharidoch sú rôzne druhy fenolových látok a tieto samotné majú rozdielnú antioxidačnú aktivitu v závislosti na ich chemickej štruktúre (Scherer and Godoy, 2009). Rozdiel medzi celkovým obsahom fenolových látok (TP) v FS-1 (18,9 %) a FS-2 (1,7 %) je relatívne veľký a je zrejme že obsah a zloženie TP výrazne prispieva k antioxidačnej aktivite sledovaných polysacharidov. Výsledky in vitro experimentov demonštrujú, že schopnosť vychytávať radikály je spojená aj s obsahom týchto látok v polysacharidových frakciách.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973) *Analytical Biochemistry* 54, 484–489.
- Jureček, L., Nosál'ová, G., Hromádková, Z., Košťálová, Z. (2012) *Acta medica Martiniana* 1, 24-30.
- Košťálová, Z., Hromádková, Z., Ebringerová, A., Polovka, M., Michaelsen, T.E., Paulsen, B.S. (2013) *Industrial Crops and Products* 41, 127-133.

Prakash, A. (2001) *Medallion Laboratories Analytical Progress* 19, 2.
Rao, R.S.P., Muralikrishna, G. (2006) *Phytochemistry*. 67, 91–99.
Scherer, R., Godoy H.A. (2009) *Food Chemistry* 112, 654–658.
Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1619–1624.

Antitusicky aktívne polysacharidy z listov Fallopie sachalinensis

Zdenka Hromádková^{1*}, Zuzana Košťálová¹, Ľubomír Jureček², Gabriela Nosáľová²

¹ Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

¹ Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

² Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Malá Hora 10701/4, 03601 Martin

*chemhrom@savba.sk

Kľúčové slová

Fallopia sachalinensis, antitusická aktivita, pektín

Úvod

Krídlatka (pohánkovec) je známa invazívna rastlina pochádzajúca z Východnej Ázie patriaca do čeľade stavikrvovité. Na Slovensku sa najprv rozšírili ako záhradná okrasná rastlina, ale v súčasnosti vytláča domáce porasty v okolí riek a ciest. Bioaktívne produkty pripravené z rastlín čeľade stavikrvovité sa bežne používajú v čínskej a japonskej medicíne (Chang and But, 1987). Z pohľadu potenciálneho využitia listov krídlatky sa sledovalo jej polysacharidové zloženie. Hromádková a kol. (2010) potvrdili, že hlavnou zložkou vodných výluhov sú pektínové polysacharidy. Pektín je známy pre jeho zdraviu prospešné vlastnosti, preto je aj často používaný v rôznych bioproduktoch.

Cieľom práce bolo prešetriť schopnosť polysacharidov krídlatky sachalínskej (*Fallopia sachalinensis*) zmierniť kašľový reflex vyvolaný chemickým stimulom.

Materiál a metódy

Listy krídlatky boli nazbierané v apríli 2007 v Českom Krumlove (ČR) a poskytnuté Dr. N. Vrchotovou (Centrum výskumu globálnej zmeny, AV ČR, v.v.i.). Listy boli usušené a pomleté na jemný prášok.

Extraktívne látky boli odstránené Soxhletovou extrakciou so zmesou chloroform/etanol (65:35) 6 h a následne s metanolom 3,5 h. Takto upravené listy boli extrahované destilovanou vodou 2 h, 60 °C a potom 14 h pri laboratórnej teplote. Sediment sa odcentrifugoval a supernatant bol vyzrážaný do štvornásobného objemu etanolu. Vzniknutá zrazenina sa odfiltrovala, dialyzovala a lyofilizovala (FS-1; 1,34 g). Sediment z prvej extrakcie sa následne extrahoval acetátovým pufróm pH 4,8 (800 mL; 70 °C) 2,5 h. Po extrakcii sa zmes centrifugovala a extrakt sa ešte prefiltroval na frite S4, zneutralizoval na pH 7,1 a vyzrážal do etanolu. Zrazenina sa odfiltrovala, dialyzovala a lyofilizovala (FS-2; 2,15 g).

Celkový obsah cukrov (TC) bol stanovený fenol-kyselina sírová testom (Saha a Brewer, 1994) a obsah urónových kyselín (UA) bol stanovený s 3-hydroxybifenylovým činidlom (Blumenkrantz a Asboe-Hansen, 1973). V oboch metódach bola použitá galakturónová kyselina ako štandard. Celkový obsah fenolov bol stanovený Folin-Ciocalteu metódou (Yu a kol., 2002), kde sa ako štandard použila kyselinu gálovú.

Supresia kašľa a špecifický odpor dýchacích ciest pôsobením polysacharidových extraktov sa merala na bdelych morčatách v dvojkomorovom body pletyzmografe (Hugo Sachs Elektronik, typ 855) a výsledky sa porovnávali s účinkom kodeínu (Nosáľová a kol., 2011). Polysacharidy boli aplikované v dávke 50 mg kg⁻¹ hmotnosti a kodeín v dávke 10 mg kg⁻¹ hmotnosti. Kašľový reflex bol vyvolaný aplikáciou 0,3 M kyseliny citrónovej.

Výsledky a diskusia

Vyzrážaním vodných extraktov sa získali polysacharidové frakcie FS-1 a FS-2 v množstve 1,47 % a 2,37 % vzťahované na vzducho-suchú vzorku. Hodnoty analytických meraní sú prehľadne uvedené v tabuľke 1. Celkový obsah cukrov bol 65,9 % pre FS-1 a 67,9 % pre FS-2. Obidve vzorky obsahujú takmer rovnaký celkový obsah cukrov. Podstatný rozdiel je v pomere medzi obsahom kyslých cukrov (UA) a neutrálnych cukrov. V porovnaní s FS-2, vodný extrakt FS-1 obsahuje polovičné množstvo UA a značne vyšší obsah fenolových látok (TP).

Tabuľka 1

Analytické zloženie polysacharidov extrahovaných z listov *F. sachalinensis*

Vzorka	UA ^a	TP ^a	Neutrálne cukry (mol %)					
	(%)	(%)	Gal	Glc	Man	Ara	Xyl	Rha
FS-1	29.2 ± 1.2	18.9 ± 1.6	28	31	8	24	6	2
FS-2	57.9 ± 2.6	7.1 ± 0.6	29	18	2	32	6	12

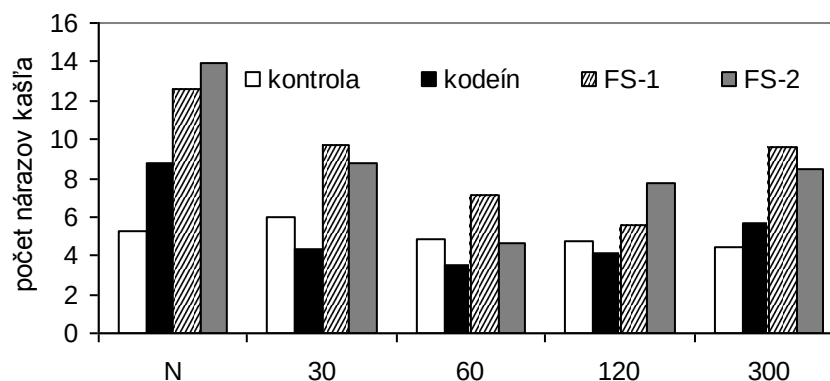
UA — urónové kyseliny, TP — fenolové látky, ^a prepočítané na vzducho-suchú vzorku.

Papierová chromatografia hydrolyzátu potvrdila, že galakturónová kyselina je hlavnou kyslou cukornou zložkou v oboch frakciách, čo je charakteristické pre pektíny. Vysoký obsah arabinózy a galaktózy vo vzorke FS-1 poukazuje na prítomnosť arabinogalaktánu. Arabinogalaktány sa vyskytujú v bunkových stenách rastlín ako samostatné komponenty alebo ako zložky iných polysacharidov, napríklad pektínových látok. Frakcia FS-2 je bohatšia na UA (~ 58%) a z neutrálnych cukrov obsahuje hlavne arabinózu, galaktózu a ramnózu (Tab. 1), čo svedčí o dominancii vetveného pektínového polysacharidu.

Antitusická aktivita

Získané polysacharidové frakcie sa testovali na antitusickú aktivitu, kde sa sledoval ich vplyv na supresiu kašľa a špecifický odpor dýchacích ciest, pričom kašeľ bol vyvolaný u morčiat chemicky pomocou kyseliny citrónovej (Nosál'ová a kol. 2011). Antitusická účinnosť bola porovnávaná s látkami bežne používanými v klinickej praxi. Išlo o centrálné pôsobiace antitusikum – kodeín v dávke 10 mg kg⁻¹ hmotnosti. Aplikácia pektínových polysacharidov v dávke 50 mg kg⁻¹ hmotnosti viedla k štatisticky významnému poklesu sledovaných parametrov kašľa. Namerané hodnoty sú graficky znázornené na Obr. 2.

Orálna aplikácia polysacharidu FS-1 sa prejavila značným znížením počtu nárazov kašľa už po 30 min. V ďalších intervaloch, bola antitusická aktivita ešte viac výrazná a maximálne potlačenie kašľa bolo dosiahnuté po 120 minútach od aplikácie. Vzorka FS-2 bola účinnejšia a maximálny pokles počtu nárazov kašľa dosiahla už po 60 minútach. po aplikácii. Ako je vidieť na Obr. 2, pri aplikácii obidvoch vzoriek dochádza k štatisticky významnému potlačeniu kašľa počas celej dĺžky trvania experimentu. Supresia kašľa pektínovými polysacharidmi z *F. sachalinensis*. dosiahla účinnosť centrálného pôsobiaceho antitusika kodeínu.



Obr. 2. Zmeny počtu nárazov kašľa indukovaného chemicky po podaní polysacharidov FS-1, FS-2 (50 mg kg^{-1}) a kodeínu (10 mg/kg). N – hladina citlivosti zvierat pred aplikáciou testovanej látky.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973) *Analytical Biochemistry* 54, 484–489.
- Chang, H.M., But, P.P.H. (1987) *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2, 918–928.
- Hromádková, Z., Hirsch, J., Ebringerová, A. (2010) *Chemical Papers* 64, 663–672.
- Košťálová, Z., Hromádková, Z., Ebringerová, A., Polovka, M., Michaelsen, T.E., Paulsen, B.S. (2013) *Industrial Crops and Products* 41, 127–133.
- Nosál'ová, G., Prisenžňáková, L., Ebringerová, A., Hromádková, Z. (2011) *Fitoterapia* 82, 357–364.
- Saha, S.K., Brewer, C.F. (1994) *Carbohydrate Research* 254, 157–167.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1619–1624.

Využitie tekvicovej biomasy

Zuzana Košťálová*, Zdenka Hromádková,

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

*chemzuko@savba.sk

Kľúčové slová

Tekvicová biomasa, pektín, kyslá extrakcia

Úvod

Domáce suroviny sa v podmienkach SR využívajú iba obmedzene, relatívne málo efektívne a stupeň ich využitia naďalej klesá. *Cucurbita pepo* L. var. *styriaca* je spontánnym mutantom obvyčajnej tekvice *Cucurbita pepo*, pri ktorej obalové semenné vrstvy nie sú zdrevnatené a zhrubnuté. Použitím týchto bezšupkových odrôd sa koncom 19. storočia výrazne zjednodušila výroba oleja. V priemysle sú využívané iba semená a nevyužitá tekvicová biomasa sa bežne zaoráva. V súčasnosti sa vie, že tekvicová biomasa je nádejný a zaujímavý zdroj pektínu (Shodina a kol., 1998). Pektín sa bežne izoluje z jablčných a citrusových výliskov. Najväčšie uplatnenie má ako zahusťovadlo, ale dostáva sa do popredia aj ako prídavok do bioproduktov vďaka výborným zdravotným prospešným účinkom.

Cieľom práce je dokázať, že vysoko kvalitný pektín sa dá extrahovať aj z poľnohospodárskeho odpadu akým je tekvicová biomasa.

Materiál a metódy

Základný materiál predstavuje tekvica olejná (*Cucurbita pepo* var. *Styriaca*) zberaná v septembri 2005 v lokalite Koliňany na pokusnej báze na školskom poľnohospodárskom podniku SPU v Nitre. Tekvicová biomasa po odstránení semien bola postrúhaná, voľne usušená a následne pomletá.

Pomletá tekvicová biomasa (2g) bola extrahovaná 0,03M HCl pri 80 °C 1 h. Nerozpustný materiál bol oddelený filtráciou cez tkanivový filter a potom sa nechal voľne usušiť. Filtrát sa vyzrážal do rovnakého objemu etanolu. Sediment sa odcentrifugoval (12000 rpm) a zlyofilizoval (ODK, 84 mg). ODK bola následne rozpustená a upravená pomocou NaOH na pH 7,1. Získaná polysacharidová frakcia sa ďalej analyzovala.

Na stanovenie celkového obsahu cukrov bol použitý fenol-kyselina sírová test (Saha a Brewer, 1994). Obsah urónových kyselín bol stanovený s 3-hydroxybifenylovým činidlom (Blumenkrantz a Asboe-Hansen, 1973). V týchto dvoch metódach sa ako štandard použila galakturónová kyselina. Obsah dusíka bol meraný na elementárnom analyzátoe Fisons instrument EA1108. Celkový obsah fenolov sa stanovil spektrofotometricky s použitím Folin-Ciocalteu činidla (Yu a ko., 2002). Ako štandard sa použila kyselina gálová. FT-IR spektrum bolo merané v KBr tablete na spektrometri Nicolet-Magna 750 s rozlíšením 4 cm⁻¹. Vnútna viskozita bola meraná v 0,1M NaCl pri 25 °C pomocou Ubelohdeho viskozimetra. Stupeň metylesterifikácie tekvicového pektínu bol stanovený z ¹H-¹³C HSQC NMR spektra. NMR bolo merané v D₂O pri 60 °C na prístroji Varian 400 MR.

Výsledky a diskusia

Kyslou extrakciou sa z tekvicovej biomasy izolovala pektínová frakcia (4,1 %). Základná charakterizácia tekvicového pektínu je uvedená v tabuľke 1. Z celkového obsahu cukrov (65,43

%) tvorili urónové kyseliny 40,15 %, pričom papierová chromatografia potvrdila prítomnosť iba galakturónovej kyseliny. Vysoký podiel neutrálnych cukrov (~ 25 %) a ich zloženie naznačilo, že vzorka obsahuje aj neutrálny arabinogalaktán. Prítomnosť pektínu a arabinogalaktánu potvrdzuje FT-IR spektrum izolovaného polysacharidu (Obr. 1).

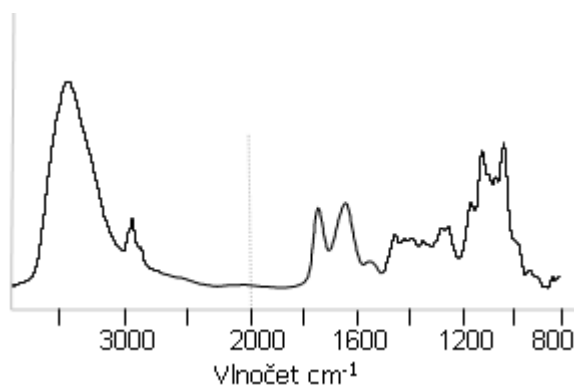
Aj napriek tomu že extrakt bol zrážaný etanolom, v izolovanej polysacharidovej frakcii ostala časť proteínov, ktorých prítomnosť potvrdzuje vyšší obsah dusíka (1,23 %) vo vzorke. Tieto proteíny sa tu môžu vyskytovať v podobe komplexu s arabinogalaktánom (Classen a kol., 2000). Fenolové látky sú ďalšou necukornou zložkou ktorej prítomnosť bola potvrdená v izolovanom polysacharide. Tieto látky bývajú často esterovo naviazané na polysacharidový reťazec.

Tab.1. Analytické zloženie tekvicového pektínu

	Tekvicový pektín ODK
Celkové cukry (%) ^a	65,43 ± 10,85
Urónové kyseliny (%) ^a	40,15 ± 2,90
Fenolické látky (%) ^a	0,6 ± 0,1
Dusík (%) ^a	1,23
Stupeň metylesterifikácie DE (%)	~ 55
Vnútorná viskozita (ml/g)	214

^a počítané na vzducho-suchú vzorku; – nebolo merané.

Základnou charakteristikou pektínových polysacharidov je ich stupeň esterifikácie a vnútorná viskozita. Stupeň esterifikácie vo vzorke (~ 55 %) bol stanovený z ¹H-¹³C HSQC NMR spektra (nepublikované) porovnaním metylesterifikovanej a neesterifikovanej galakturónovej jednotky. Izolovaný pektín s DE vyšším ako 50 % sa považuje za vysoko esterifikovaný. Tieto druhy pektínu vytvárajú v kyslom prostredí pevné gély a preto majú uplatnenie hlavne ako zahusťovadlo pri výrobe džemov či želé (Voragen a kol., 1995). Vyššia vnútorná viskozita 214 ml/g naznačuje zaujímavé možnosti uplatnenia tohto polysacharidu aj v iných oblastiach.



Obr. 1. FT-IR spektrum tekvicového pektínu

Základná charakteristika izolovanej frakcie bola potvrdená FT-IR spektrom (Obr.1). Spektrum obsahuje absorpčné pásy karboxylových (1635 cm⁻¹) a esterových (1743 cm⁻¹) skupín a v strednej oblasti spektra typické pásy pre pektínové arabinogalaktány (1076 , 1051 a 887 cm⁻¹) (Kačuráková a kol., 2000). Prítomnosť proteínov bola potvrdená vibračnými pásmi 1650 cm⁻¹ amidu I a 1547 cm⁻¹ amidu II, pričom v prípade tekvicového pektínu bol pás amidu I prekrytý pásom dominantnej galakturónovej kyseliny.

Kyslou extrakciou sa z tekvicovej biomasy izoloval viskózný vysoko esterifikovaný pektín, ktorý by mohol nájsť rovnaké uplatnenie ako citrusový pektín. Využitím tohto polysacharidu v potravinárskom či farmaceutickom priemysle by viedlo k zúžitkovaniu ďalšieho nevyužívaného a zároveň vysoko produkovaného poľnohospodárskeho odpadu.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973) *Analytical Biochemistry* 54, 484–489.
- Classen, B., Witthohn, K., Blaschek, W. (2000) *Carbohydrate Research* 327, 497–504.
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Weller, N., Ebringerová, A. (2000) *Carbohydrate Polymers* 43, 195–203.
- Saha, S.K., Brewer, C.F. (1994) *Carbohydrate Research* 254, 157–167.
- Shkodina, O.G., Zeltser, O.A., Selivanov, N.Y., Ignatov V.V. (1998) *Food Hydrocolloids* 12, 313–316.
- Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A. V., Renard, C. M. G. C. (1995) Pectins In: Stephen, A. M. (Ed.), *Food Polysaccharides and Their Applications*, Marcel Dekker, New York, s. 287-339.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. (2002) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1619–1624.

Využitie povrchovej plazmovej rezonancie na štúdium interakcie lektín-glykoproteín

J.Katrlík^a, R.Škrabana^b, D.Mislovičová^{a,c}, P.Gemeiner^a

^a*Chemický ústav SAV, Oddelenie glykobiotechnológie, Dúbravská cesta 9,
845 38 Bratislava*

^b*Neuroimunologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 10 Bratislava*

^c*Chemický ústav, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu SAV, Trieda A.Hlinku
2, Nitra SK-94976*

chemmisl@savba.sk

Kľúčové slová

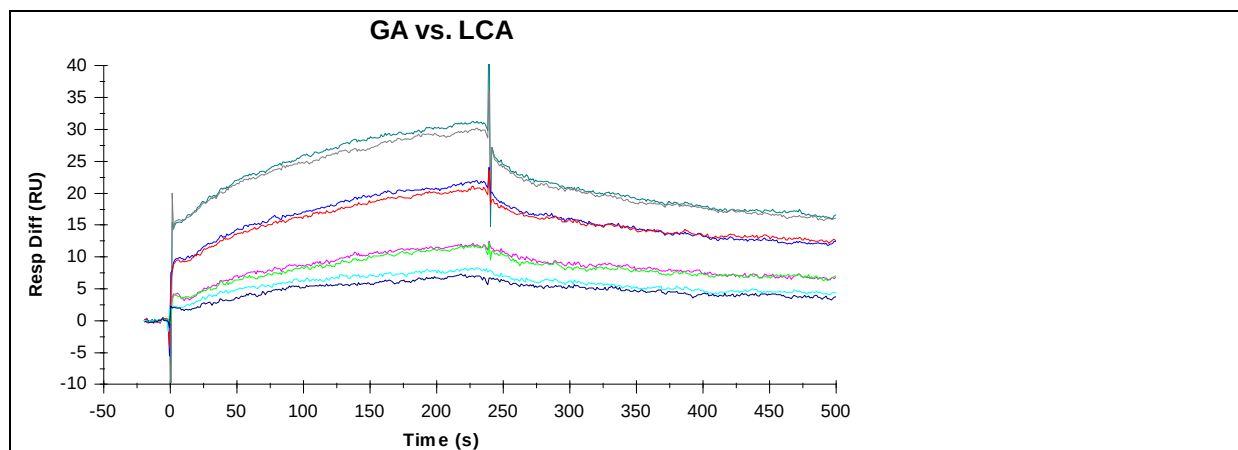
Glykoproteíny, lektíny, interakcia, SPR,, disociačné konštanty

Úvod

Glykozylácia proteínov patrí medzi posttranslačné modifikácie proteínov a v súčasnosti sa vie, že glykoproteíny majú kľúčovú úlohu vo väčšine biologických procesov založených na bunkovom rozpoznávaní ako regulácia vývoja, bunková diferenciácia, imunitná odpoveď, zápaly, oplodnenie, interakcie atogén – hostiteľ a ďalšie (Yue et al. 2009). K zmenám glykozylácie dochádza v dôsledku vývoja rôznych ochorení vrátane rakoviny. V súčasnosti je veľký záujem vyvinúť vhodné metódy na určenie zmeny glykozylácie. Použitie lektínov v kombinácii s niektorou z biozrozpoznávacích metód je možný spôsob ako určiť tieto zmeny. Lektíny sú proteíny ktoré špecificky viažu molekuly obsahujúce cukry, a preto sú vhodné na ich detekciu. Táto ich vlastnosť sa v poslednej dobe začína využívať najmä v moderných bioanalytických metódach ako povrchová plazmová rezonancia (SPR), microarray a prietoková cytometria (Mislovičová et al. 2009, Katrlík et al. 2010). SPR ako "label-free" metóda, teda metóda nevyžadujúca značenie, je veľmi populárna pre sledovanie interakcií biomolekúl. Keďže je plne automatizovateľná a v porovnaní s inými technikami merania interakcií vyžaduje veľmi malé množstvá často ťažko dostupných materiálov, je čoraz častejšie využívaná pri štúdiu najrôznejších biologických systémov, vrátane nízkomolekulových zlúčenín, glykoproteínov, oligonukleotidov, receptorov, protilátok, ako aj vírusov a intaktných buniek.(Rich et al.2007).

Výsledky a diskusia

Pre štúdium použiteľnosti SPR metódy na kvalitatívne a kvantitatívne hodnotenie prítomnosti glykoproteínov vo vzorke sa použili 3 komerčne dostupné lektíny so známou glykošpecifitou na α -D-manóзовé štruktúry, ktoré perspektívne môžu slúžiť na bioanalytické stanovenie manózových glykoproteínov, Konkanavalín A (Con A), šošovicový lektín (LCA) a hrachový lektín (PSA). Z glykoproteínov obsahujúcich α -D-manóзовé štruktúry sa použila invertáza (INV), glukoamyláza (GA) a transferín (TRSF). Merania sa robili na prístroji Biacore 3000.



Obrázok 1. Senzorgram interakcie GA na LCA biočipe.

Koncentrácie GA boli 6,2 μM , 2,1 μM , 0,69 μM , a 0,23 μM . Najvyššej koncentrácii zodpovedá najvyššia odozva.

Tabuľka 1. Disociačné konštanty K_D študovaných interakcií

	ConA K_D [μM]		LCA K_D [μM]		PSA K_D [μM]	
	(steady state)	(steady state, Hillova metóda)	(steady state)	(steady state, Hillova metóda)	(steady state)	(steady state, Hillova metóda)
Invertáza	0.31	0.78	0.09	0.26	0.41	0.47
Glukoamyláza	2.61	3.05	1.43	4.85	5.56	3.27
Transferín	1.15	13.50	6.52	24.20	14.10	3.40

Podarilo sa pripraviť lektínové biočipy, nájsť optimálne pracovné podmienky pre interakciu s glykoproteínmi a regeneráciu, a namerať disociačné konštanty K_D interakcií lektín – glykoproteín, ktoré boli v rozmedzí 10^{-5} - 10^{-7} M. Tieto hodnoty sú v súlade s už publikovanými hodnotami K_D pre interakciu invertázy a GA s ConA nameranými pomocou SPR na dextránovom čipe¹¹, a navyše sú rozšírené o K_D pre glykoproteín transferín využívaný aj ako biomatker, a o interakcie s ďalšími dvoma lektínmi špecifickými na α -D-manózu, všetko na čipe s karboxymetylovým povrchom s nízkou väzobnou kapacitou pre potlačenie efektu klastrovania. Získané výsledky sú dobrým základom pre bioanalytické využitie lektínových biočipov na stanovenie koncentrácie glykozylovaných proteínov vo vzorkách.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Bielo-zelenú biotechnológiu ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja

Literatúra

Katrlik J., Švitel J., Gemeiner P., Kožár T., Tkáč J. *Med. Res. Rev.* (2010) **30**, 394-418

Mislovicova D., Gemeiner P., Kozarova A., Kozar T. *Biologia* (2009) **64**, 1-19

Rich R. L., Myszka D. G. *Anal. Biochem.* (2007) **361**, 1-6

Yue T., Haab B. B. *Clin. Lab. Med.* (2009) **29**, 15-29

Príprava neoglykoproteinov mananu za účelom zvýšenia ich antioxidačnej and antimutagénnej aktivity.

L. Križková^a D. Mislovičová^{b,c}, J. Masárová^b, V. Sasinková^b

^aÚstav bunkovej biológie, Univerzita J.A.Komenského, Fakulta prírodných vied,
Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská Republika

^bChemický ústav, Slovenská Akadémia Vied, Dúbravská cesta 9, 845
38 Bratislava, Slovenská Republika

^c Chemický ústav, Centrum excelencie SAV, Trieda A.Hlinku 2, Nitra SK-94976
chemmisl@savba.sk

Kľúčové slová

Manan z *Saccharomyces cerevisiae*, ľudský sérum albumín, penicilin G acyláza, antimutagenita, antioxidačná aktivita

Úvod

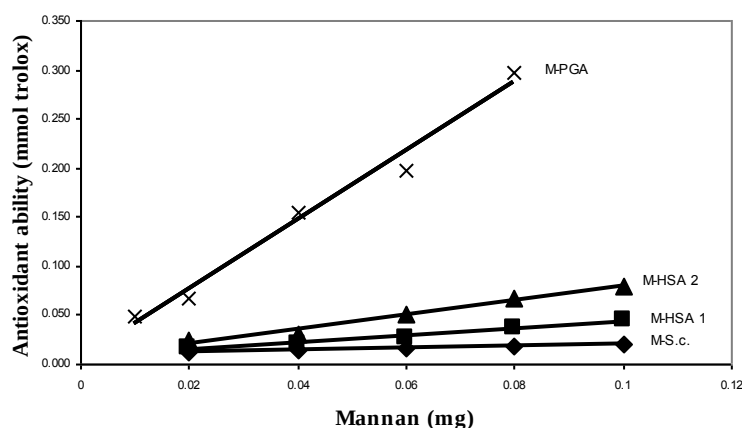
Naše predchádzajúce výsledky ukázali, že manany and glukomanany rôzneho pôvodu majú dobrú antioxidačnú aktivitu a antimutagenitu (Križková et al. 2001). Vysoká aktivita extracelulárneho mananu *C. albicans* je v súlade s výsledkami Liu et al. (Liu et al. 1997) ktorý predpokladal, že prítomnosť proteínov v sacharidových molekulach zosilňuje ich aktivitu odstraňovať voľné radikály.

Výsledky a diskusia

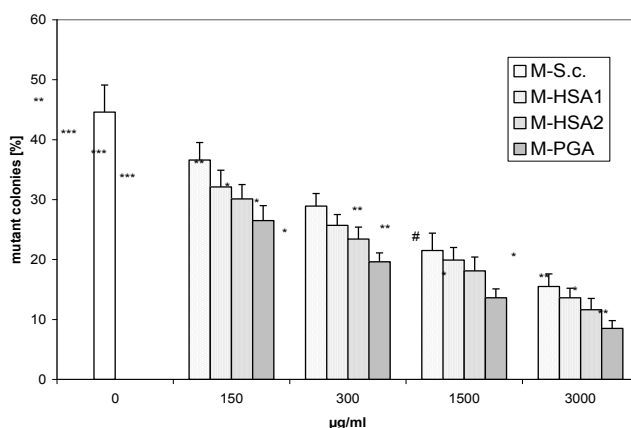
Antioxidačná a antimutagenická aktivita mananov a manan-konjugátov izolovaných z bunkovej steny kvasiniek najmä *Saccharomyces cerevisiae* (M-S.c.) syntetických neoglykokonjugátov mananu *S. cerevisiae* s ľudským serum albumínom (M-HSA1, M-HSA2) a mikrobiálnym enzýmom penicilin G acylázou (M-PGA) – boli skúšané in vitro v unicelulárnych flagelatoch *Euglena gracilis* pôsobením genotoxických činidiel ofloxacínu a akridin oranže (AO).

Tabuľka 1. Charakteristiky manánu a manán-proteín konjugátov

Vzorka	Obsah sacharidov [%]	M _w (HPLC) [kDa]
Manan S.c.	100	46
M-HSA 1	25.5	160
M-HSA 2	36.0	240
M-PGA	37.2	153



Obrázok 1. Antioxidačná aktivita manánu a manán-konjugátov



Obrázok 2. Účinok M-S.c., M-HSA1, M-HSA2 a M-PGA na AO-indukovanú genotoxickosť v *E.gracilis*

M-S.c., M-HSA1, M-HSA2 a M-PGA ukazujú štatisticky významnú koncentračnú závislosť ochrannej antigenotoxické aktivity proti obom látkam. M-PGA sa javil ako najefektívnejší inhibítor ofloxacin- a AO-indukovaného poškodenia chloroplastu DNA, pričom M-HSA2 a M-HSA1 boli menej efektívne a M-S.c. mal najnižšiu antigenotoxickú aktivitu. Predpokladá sa, že rozdielny mechanizmus môže byť obsiahnutý v ich ochrannom účinku – antioxidačnej aktivite v prípade ofloxacinom indukovaného poškodenia DNA a priamou adsorpciou AO na konjugáty manánu ako možný mechanizmus ochrany, ktorý je založený na spektrofotometrických meraniach. Dôležité charakteristiky manánov izolovaných z bunkovej steny kvasiniek a ich konjugátov, ako ich dobrá rozpustnosť vo vode, široké spektrum ich biologickej aktivity, nízka toxicita, dobrá stabilita a ich antimutagénne efekty s rôznym spôsobom účinku, sú perspektívnym faktorom pre ich praktickú aplikáciu ako antioxidanty a antimutagénne činidlá.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Bielo-zelenú biotechnológiu ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja

Literatúra

Križková L., Ďuračková Z., Šandula J., Sasinková V., Krajčovič J. *Mutat.Res.* (2001) **497**, 213-222.

Liu F., Ooi V.E.C., Chang S.T. *Life Sci.* (1997) **60**, 763-771

Príprava manan neoglykoproteínov a ich charakterizácia

D.Mislovičová^{a,b}, J.Masárová^a

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava

^bChemický ústav, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu SAV, Trieda A.Hlinku 2, Nitra SK-94976

chemmis@savba.sk

Kľúčové slová

Manan z *Saccharomyces cerevisiae*, jodistanová oxidácia, BSA, PGA, neoglykokonjugát

Úvod

Glykoproteíny sú produkty post-translačného procesu proteínov vo všetkých biologických organizmov. Prítomnosť sacharidových jednotiek v prírodných glykoproteínoch modifikujú ich fyzikálnochemické a biologické vlastnosti. Glykozylácia proteínov má kritickú úlohu na ich expresiu, terciárnu štruktúru, zvyšuje tepelnú a proteolytickú stabilitu a tvorí ich interakciu s druhými biomolekulami. Davis et al.1999, Varki A. 1993, Specker D. et al. 2007). Sacharidové zložky, ktoré sa nachádzajú v prírodných glykoproteínoch obyčajne majú komplexnú a nehomogénnu štruktúru. Modifikácia proteínov so sacharidmi kedy sa získavajú nové funkčné glykoproteíny nazvané neoglykoproteíny je známa viac ako 30 rokov. Neoglykoproteíny sú látky, ktoré napodobňujú prírodné glykoproteíny. Výhodou neoglykoproteínov pripravených synteticky z proteínov je že obsahujú sacharidy o známej štruktúre istej čistote.

Účelom tejto práce bolo optimalizovať prípravu mannan dialdehydov, ktoré sú východzími medziproduktami pri konjugácii s proteínmi – hovädzím serum albumínom (BSA) a penicilin G acylázou (PGA). Získané neoglykoproteíny sa charakterizovali z hľadiska ich molekulovej hmotnosti ako aj percentuálneho obsahu sacharidov a proteínov.

Výsledky a diskusia

Miernou perjodátovou oxidáciou mananu *Saccharomyces cerevisiae* sa pripravili jeho dialdehydy (Masárová et al. 2001), ktoré sú vhodné na syntézu nových druhov neoglykoproteínov. Stredné molekulové hmotnosti pôvodného mananu ako aj jeho oxidovaných derivátov sa stanovili HPLC metódou a obsah aldehydových skupín Park-Johnson metódou.

Tabuľka 1. Produkty perjodátovej oxidácie mananu Sc.

Vzorka	$n(\text{NaIO})_4/n(\text{monosach.})$	Obsah aldehyd. skupín $n(\text{aldehyd})/n(\text{polysach.})$	M_w (Da)
Manan	–	1	55 000
ManO1	0.054	11	54 500
ManO2	0.135	20	51 200
ManO3	0.270	28	49 500
ManO4	0.540	22	46 100
ManO5	0.710	13	39 600

Vybrané oxidované manany sa použili na prípravu BSA a PGA konjugátov metódou reduktívnej aminácie aplikovaním rôznych pomerov manan/proteín (4:1, 1:1, 2:3, a 2:5). Podmienky reakcie boli: prítomnosť NaCNBH_3 , laboratórna teplota pri reakcii s BSA a 4 °C

pri reakcii s PGA (Masárová et al. 2002)). Získané neomanoproteínu sa potom charakterizovali.

Tabuľka 2. Molekulové charakteristiky manan-BSA konjugátov

Vzorka	Obsah sach. [%]	M _w [kDa]	Polydisperzita M _w /M _n
BSA	0	66.7	-
Manan	100	53.0	1.3
ManO1-BSA	25	176.2	2.8
ManO2-BSA	28	246.3	3.2
ManO3-BSA	30	169.1	3.6

Tabuľka 3. Molekulové charakteristiky manan-PGA konjugátov

Vzorka	Obsah sach. [%]	M _w [kDa]
PGA	0	80.0
Manan	100	55.0
ManO1-PGA	22	260.0
ManO2-PGA	41	310.0
ManO3-PGA	40	240.0

Dva oxidované manany s nízkym obsahom dialdehydových skupín ManO1 a ManO2 sa použili na prípravu štyroch rôznych konjugátov s PGA aplikovaním rozdielnych manan/PGA hmotnostných pomerov. SEC frakcionáciou na Sephacryl S-300 HR kolone sa zistilo, že každý pripravený konjugát obsahoval 2 rozdielne frakcie a síce menší podiel vysokomolekulárnej frakcie (fr.1) s molekulovou hmotnosťou M_w nad 10³ kDa (charakterizované s HPSEC chromatografiou na kolone HEMA-BIO 1000) a väčší podiel nízkomolekulárnej frakcie (fr.2) s molekulárnou hmotnosťou v rozmedzí 286-395 kDa (stanovené SEC-MALS-SCV systémom).

Tabuľka 4. Charakteristiky mananPGA neoglykoproteínov

Vzorka	Pomer pri konjug. ManO/PGA(w/w)	Podiel frakcií (%, w/w)	Obsah sacharidu (%, w/w)	M _w (kDa)	M _w /M _n
PGA	—	—	—	78.4	—
ManO1-PGAa-fr.1	1:1	28	51±3	>10 ³	—
ManO1-PGAa-fr.2	1:1	72	47±5	332	2.1
ManO1-PGAb-fr.1	1:3	31	53±4	>10 ³	—
ManO1-PGAb-fr.2	1:3	69	42±4	283	1.5
ManO2-PGAa-fr.1	3:1	46	67±3	>10 ³	—
ManO2-PGAa-fr.2	3:1	54	61±5	395	1.8
ManO2-PGAb-fr.1	1:3	38	47±3	>10 ³	—
ManO2-PGAb-fr.2	1:3	62	43±6	286	1.8

Získané údaje ukázali, že množstvo vysoko-molekulárnej frakcie závisí od stupňa oxidácie mananu a tiež od pomeru reakčných zložiek pri konjugácii. Všetky vysokomolekulárne frakcie obsahovali vyšší obsah sacharidov ako nízkomolekulárne frakcie pripravené z tej istej vzorky oxidovaného mananu.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Bielo-zelenú biotechnológiu ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja

.

Literatúra

Davis B.G., Jones J.B., Synlett (1999) **9**,1495–1507

Masárová J., Mislovičová D. Gemeiner P. *Chem.Pap.* (2001) **55**, 130-131.

Masárová J., Mislovičová D. Šoltés L. *Int.J.Polymer Anal. Charact.* (2002) **7**, 106-116

Specker D., Wittmann V. *Top Curr. Chem.* (2007) **267**, 65–107

Varki A. *Glycobiology* (1993) **3**, 97-130

Interakcia Concanavalinu A s neoglykoproteínmi MBSA a MPGA

D.Mislovičová^{a,b}, J.Masárová^a, J.Švitel^c

^aChemický ústav, Centrum Glykomiky, SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava, SK-84538

^bChemický ústav, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu SAV, Trieda A.Hlinku 2, Nitra SK-94976

^cPure and Applied Biochemistry, Lund University, S-22100 Lund, Sweden

chemmisl@savba.sk

Kľúčové slová

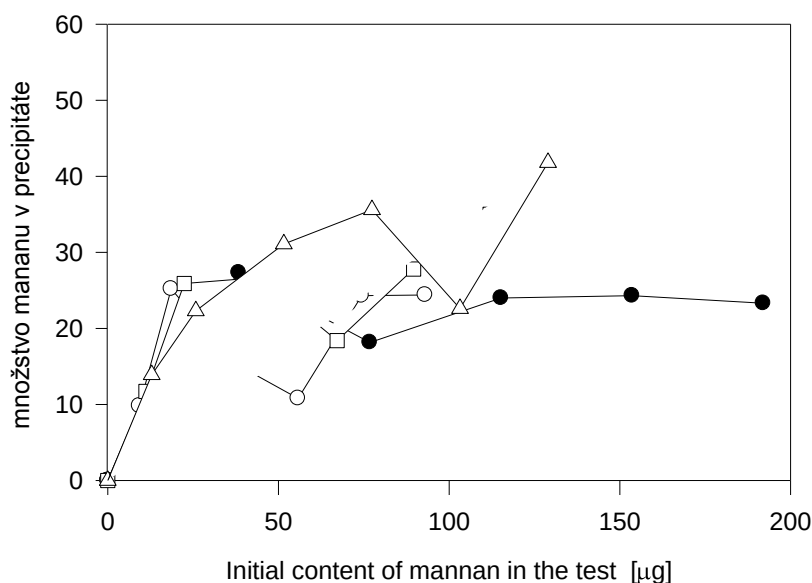
Neoglykokonjugát, manan, Concanavalin A, interakcia, precipitácia, sorpcia, SPR

Úvod

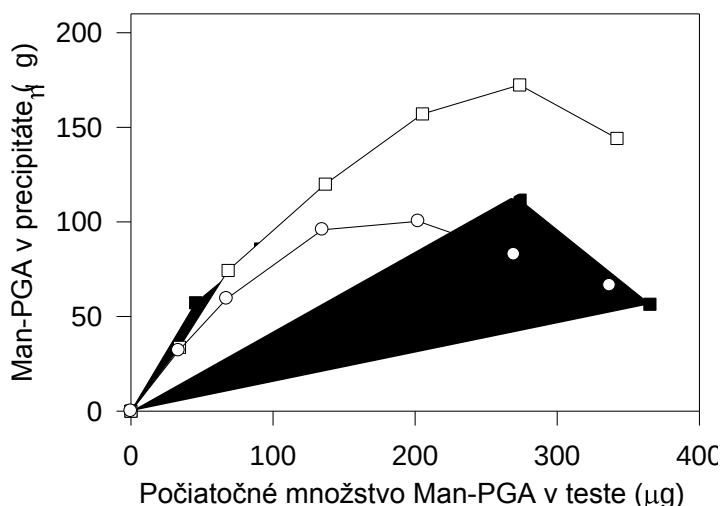
Manan je polysacharid, ktorý sa vyznačuje silnou afinitou k lektínu Concanavalin A a z tohto dôvodu je významný pre syntézu glykoproteínov, ktoré majú perspektívne využitie v lektinológii. (Jennings et al. 1994). Je známe, že tento polymér obsahuje viacnásobné špecifické manozylové skupiny, ktoré majú niekoľkonásobne vyššiu afinitu ku Concanavalinu A ako metyl α -D-manopyranozid (α -MMP) známy ako najsilnejšie interagujúci monosacharid (Morell et al. 1996). Myšlienka konjugovať manan s proteínom, a tým zabudovať do proteínovej molekuly polysacharidové vlastnosti, bola prvý krát použitá pri príprave syntetických antigénov (Young et al. 1998).

Výsledky a diskusia

Táto práca bola zameraná na konjugáciu mananu s proteínmi za účelom ich interakcie s lektínmi. Optimalizácia oxidácie mananu a jeho ďalšej konjugácie s proteínmi BSA a PGA bola už študovaná a sumarizovaná. (Masárová et al. 2001, Masárová et al. 2002) Interakcia manan-proteínu konjugátov s Con A with sa študovala tromi rôznymi metódami: 1/ kvantitatívna precipitácia; 2/ sorpčná metóda; a 3/ SPR.



Obrázok 1. Precipitation of mannan and mannan-BSA conjugates with Con A. -●- original mannan, -○- ManO1-BSA (25% of saccharides, M_w =176 kDa) -□- ManO2-BSA (28% of saccharides, M_w =246 kDa), -△- ManO3-BSA (30% of saccharides, M_w =169 kDa)



Obrázok 2. Precipitácia manan-PGA konjugátov s Con A.

-○- ManO1-PGAb (42% sacharidov, $M_w=283$ kDa) -■- ManO2-PGAa (61% sacharidov, $M_w=395$ kDa) -□- ManO2-PGAb (43% sacharidov, $M_w=286$ kDa)

Tabuľka 1. Interakcia mananu a jeho BSA konjugátov s Con A stanovená Langmuirovou adsorpčnou izotermou na Con A-perlovej celulóze a ako disociačné konštanty metódou SPR

Sorbát	Q_m ($\mu\text{mol sorbátu/g}$ vlhký sorbent)	K_D (M)	R^a	K_D (SPR) (M)
Manan	3.16×10^{-3}	5.2×10^{-8}	0.941	–
ManO1-BSA	8.68×10^{-3}	5.67×10^{-7}	0.962	5.32×10^{-7}
ManO2-BSA	3.44×10^{-3}	8.98×10^{-8}	0.945	3.25×10^{-7}
ManO3-BSA	5.71×10^{-3}	2.81×10^{-7}	0.721	5.02×10^{-7}

Tabuľka 2. Dissociačné konštanty interakcie Man-PGA konjugátov s Con A stanovené metódou SPR

Konjugát	K_D [M]
ManO1-PGAb	4.09×10^{-7}
ManO2-PGAa	3.64×10^{-7}
ManO2-PGAb	3.94×10^{-7}

Modifikácia mananu jodistanovou oxidáciou spôsobuje zmenu jeho interakcie s Con A a následne tiež ovplyvňuje vlastnosti manan-protein neoglykokonjugátov. Merania interakcie neoglykokonjugátov s Con A však potvrdili, že metóda ich prípravy zachováva možnosť mananu interagovať s lektínom Con A. Bolo zistené všetkými tromi použitými metódami, že affinita mananu naviazaného na proteín v neoglykokonjugátoch je podobná v porovnaní s pôvodným mananom. Bolo to dokumentované hodnotami K_D manan-proteín – Con A interakcie (v rozmedzí 10^{-7} a 10^{-8} mol.L⁻¹). Táto metóda konjugácie sa dá použiť pri

glykozylácií proteínov/enzýmov, pri príprave biologicky aktívnych glykokonjugátov alebo všeobecne ako imobilizačná technika pre glykoproteíny.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Bielo-zelenú biotechnológiu ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja

Literatúra

- Jennings H.J., Sood R.K. (1994) *Neoglycoconjugates: Preparation and Application* (Y.C.Lee, R.T.Lee, Eds.) pp 325-371, Academic Press, San Diego.
- Masárová J., Mislovičová D. Gemeiner P. *Chem.Pap.* (2001) **55**, 130-131.
- Masárová J., Mislovičová D. Šoltés L. *Int.J.Polymer Anal. Charact.* (2002) **7**, 106-116
- Morell K.H., Weatherman R.V., Kiessling L.L. *J.Am.Chem.Soc.* (1996) **118**, 2297-2298.
- Young M., Davies M.J., Bailey D., Gradwell M.J., Smestad-Paulsen B., Wold J.K., Barnes R.M.R. Hounsell E.F. *Glycoconjugates J.* (1998) **15**, 815-822.

Glykozylácia penicilin G acylázy *Escherichia coli* s kvasinkovým mananom za účelom zvýšenia jej stability

J.Masárová^a, D.Mislovičová^{a,b}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-842 38 Bratislava

^bChemický ústav, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Trieda A.Hlinku 2, Nitra SK-94976

chemmisl@savba.sk

Kľúčové slová

Penicilin G acyláza, manan z *Saccharomyces cerevisiae*, neoglykokonjugát, stabilita

Úvod

Penicilin G acyláza (PGA; penicillin amidohydrolase, EC 3.5.1.11) z *Escherichia coli* sa komerčne používa na výrobu 6-aminopenicilánovej kyseliny a 7-deacetoxycefalosporínovej kyseliny cez penicilín G a cefalosporín G hydrolýzu. Tieto zlúčeniny sú známe ako medziprodukty produkcie semisyntetických β -laktamových antibiotík (Erarslan, 1993). Rýchlosť enzymatickej reakcie všeobecne je závislá od teploty, takže zvýšenie stability enzýmu je dôležitým faktorom z praktického hľadiska. (Klibanov, 1983) Spôsob imobilizácie enzýmu je najviac prezentovaný v štúdiách venovaných tejto problematike. (Lafuente et al 1992). Chemická modifikácia s vodorozpustnými makromolekulami je jedným zo spôsobov stabilizácie enzýmu. (Inada, et al. 1994). V posledných štúdiách sa dosiahol značný nárast stability vďaka proteolýze, vyššej teplote a pri skladovaní zosieťovaním proteínovej molekuly a aktivovaným sacharidovým reťazcom.

Výsledky a diskusia

Táto práca sleduje vplyv glykozylácie PGA mananom na jej pH- a tepelnú stabilitu. Studovali sa 3 aspekty tejto stabilizácie enzýmu: najmä 1/ stupeň oxidácie mananu 2/ obsah sacharidu v manan-PGA konjugátoch 3/ priemerná molekulová hmotnosť (M_w)

Tabuľka 1 Charakteristiky oxidovaných mananov a glykozylovaných enzýmov pripravených ich konjugáciou s PGA

Manan	Aldehyd.skupiny (mol CHO/mol man)	M_w	Pripravený glyko- enzým	Konjug. pomer man/PGA(w/w)	Obsah sach. (%,w/w)	Špec.aktivita (U/mg prot.)	M_w
–	–	–	Native PGA	–	–	7.0	80000
M-1	11	44500	MPGA-1-1	3:1	25	4.1	520000
			MPGA-1-2	1:1	22	3.2	260000
			MPGA-1-3	1:3	18	2.8	140000
M-2	20	42000	MPGA-2-1	3:1	50	6.0	580000
			MPGA-2-2	1:1	41	6.0	310000
			MPGA-2-3	1:3	33	5.2	300000
M-3	28	40000	MPGA-3-1	3:1	41	6.3	490000
			MPGA-3-2	1:1	40	6.4	240000
			MPGA-3-3	1:3	28	5.9	310000

pH- a tepelná stabilita konjugátov sa študovali a vypočítali ako “half-life” a voľná aktivačná energia deaktivácie (Masárová et al. 2001). Získané výsledky hodnôt „half-lives“ sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2.. Charakteristiky “half-lives” manna-PGA a rozličných podmienok.

Vzorka	pH 3, 37 °C $t_{1/2}$ (min)	pH 10, 37 °C $t_{1/2}$ (min)	pH 8, 37 °C $t_{1/2}$ (min)	pH 8, 50 °C $t_{1/2}$ (min)
PGA	12	23	95	18
MPGA-1	90	98	210	138
MPGA-2	36	124	182	78
MPGA-3	76	71	104	65
MPGA-1	116	117	229	224
MPGA-2	40	141	186	108
MPGA-3	62	72	126	56
MPGA-1	160	152	334	289
MPGA-2	52	187	213	136
MPGA-3	80	122	171	68

Získané výsledky ukázali, že stabilita manan-konjugátov je vyššia v porovnaní s pôvodnou PGA a závisí od charakteru derivátu mananu naviazaného na enzýme a obsahu sacharidu v konjugáte. Okrem v prostredí pH 10, bola stabilita PGA pri ostatných použitých pH úmerná obsahu mananu a molekulovej hmotnosti konjugátu.

Manozylovanýmá tiež schopnosť tvoriť veľmi stabilné nerozpustné zrazeniny s lektínom Con A, v dôsledku biošpecifickej lektínovej interakcie mananu s Con A. Táto precipitácia sa môže aplikovať ako ďalší spôsob stabilizácie PGA, pretože stabilita Con A-sieťovaných manna-PGA konjugátov je vyššia ako pôvodných manna-PGA konjugátov. Účinok precipitácie s Con A na stabilizáciu manna-PGA bol pozorovaný ako u vysokomolekulárnych frakcií tak aj u nízkomolekulárnych frakcií. (Masárová et al. 2004).

Derivatizácia PGA s mananom a inými polysacharidmi vplýva tiež na stabilitu enzýmu v prostredí organických rozpúšťadiel. Konjugácia PGA s dextránom a mananom zvyšuje významne ich stabilitu v extrémnych podmienkach a to pri pH 3 a mierne pri pH 9 a tiež ukazuje zvýšenie stability pri vyššej teplote 55 °C. Stabilizačný účinok of dextránu a mananuv prostredí organických rozpúšťadiel (*n*-butyl alkohol, *n*-propyl alkohol, metyl alkohol and butyl acetát) spôsobuje, že deaktivčný polčas sa zvýšil z 1,3 násobného na 10,6 násobný v závislosti od typu použitého polysacharidu a koncentrácie organického rozpúšťadla. (Mislovičová et al. 2006).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Bielo-zelenú biotechnológiu ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja

Literatúra

- Erarslan A. *Process Biochem.* (1993) **28**, 311–318
- Inada Y., Matsushima A., Hiroto M., Nishimura H., Kodaera Y. (1994) *Method Enzymol.* **242**, 65–90
- Klibanov A. M. *Adv. Appl. Microbiol.* (1983) **29**, 1–28
- Lafuente R. F., Rosell C. M., Alvaro G. and Guisan J. M. *Enzyme Microb. Technol.* (1992) **14**, 489–495
- Masárová J., Mislovičová D., Gemeiner P., Michálková E. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2001) **34**, 127–133
- Masárová J., Mislovičová D., Mendichi R., Švitel J., Gemeiner P., Danielsson B. *Biotechnol. Appl. Biochem* (2004) **39**, 285–291
- Mislovičová D., Masárová J., Bučko M., Gemeiner P. *Enzyme Microb. Technol.* (2006) **39**, 579–585

Spracovanie chitin-glukánu vysoko-energetickým ultrazvukom za účelom prípravy vodorozpustných frakcií a ich charakterizácia s HPLC

Danica Mislovičová^{a,b}, Jana Masárová^a, Katarína Bendžálova^c, Ladislav Šoltés^d

^aChemický ústav SAV, SK-84238 Bratislava

^bChemický ústav, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu Trieda A.Hlinku 2, Nitra SK-94976

^cPrírodovedecká fakulta UK, SK-84215 Bratislava

^dÚstav experimentálnej farmakológie SAV, SK-84216 Bratislava

chemmisl@savba.sk

Kľúčové slová

Chitín-glukan, vodorozpustnosť, ultrasonikácia, HPLC

Úvod

Zvyšky bunkových stien biomasy *Aspergillus niger* nerzpustné v alkáliách obsahujú hlavne chitín a (1→3, 1→6)-β-D-glukan. Chitín je prítomný vo forme mikrofibríl fyzikálne zabudovaných v β-glukánovej matrixi. (Rosenberger, 1976, Sietsma et al. 1981). Polysacharidy (1→3)-β-D-glukánového typu patria do skupiny takzvaných biologických látok tvoriacich odozvu (Machová et al. 1995, Kulicke et al. 1997). Imunofarmakologická aktivita β-glukánu zahŕňa zvýšenie rezistencie hostiteľa voči virovej, bakteriálnej, plesňovej a parazitickej infekcii.

Výsledky a diskusia

Cieľom tejto práce bolo pripraviť vodorozpustné chitín-glukány z mycélia *Aspergillus niger*, odpadového materiálu, ktorý sa získava pri priemyselnej výrobe kyseliny citrónovej. Použila sa metóda pôsobenia ultrazvuku o vysokej energii. Študoval sa vplyv podmienok napučievania a čas pôsobenia ultrazvuku na výťažok vodorozpustného produktu. Na stanovenie vplyvu ultrazvuku na distribúciu molekulovej hmotnosti vodorozpustných chitín-glukánov sa použila chromatografická metóda HPLC a tiež sa ňou charakterizovali produkty získané frakcionáciou.

Tabuľka 1. Vplyv času pôsobenia ultrazvuku na výťažok vodorozpustných polysacharidov

Ultrasonikácia [min]	0	10	20	30	40
Vodorozpustné polysacharidy [mg]*	2.4	2.8	3.4	3.5	3.8
Vodorozpustné polysacharidy [%] ⁺	9.6	11.2	13.6	14.0	15.2

*Stanovené fenol-sírovou met

⁺ % relatívne vzhľadom ku pôvodnej váhe vzorky

Tabuľka 2. Vplyv množstva východzieho CHG na výťažok vodorozpustných polysacharidov

Vsádka CHG [mg/25 ml 1M NaOH]	Bez pôsobenia ultrazvuku		Pôsob. ultrazvuku	
	[mg]*	[%] ⁺	[mg]*	[%] ⁺
25	2.4	9.6	3.4	13.6
50	3.8	7.6	6.1	12.2
100	8.2	8.2	8.5	8.5
200	17.8	8.9	14.6	7.3

* Stranovené fenol-sírovou metódou

⁺ % relatívne vzhľadom ku pôvodnej váhe vzorky

Tabuľka 3. Vplyv pomeru CHG:NaOH na výťažok vodorozpustného lyofilizátu

Vsádka [mg/25ml NaOH]	Váha lyofilizátu [mg]	Výťažok lyofilizátu [%] ⁺
25	3.9	15.6
50	8.8	17.6
100	24.4	24.4
200	32.6	16.3

⁺ % relatívne vzhľadom ku pôvodnej váhe vzorky

Tabuľka 4. Výťažok vodorozpustných frakcií

Frakc. No	Characterizacia	Lyofilizát [mg]	Lyofilizát rozpust. CHG [%] ⁺	Dusík [%]
0	Vzorka pred frakcionáciou	—	100	2.40
1	Frakcia Mw<30 kDa, odsolená	3.2	11.9	3.22
2	Frakcia Mw>30 kDa rozpust.v stud.vode	15.9	59.1	3.45
3	Frakcia Mw>30 kDa rozpust. v horúcej vode	7.8	29.0	2.51

⁺ % relatívne vzhľadom ku Σ váhy lyofilizátov (1+2+3)

Záverom možno konštatovať, že pôsobenie vysoko-energetického ultrazvuku na vodorozpustný CHG dochádza k štepeniu reťazcov na vodorozpustné fragmenty s vysokým obsahom chitínu, ktoré sa odštiepujú z povrchu napučených častíc (vytváranie dutín na povrchu). Následne tieto fragmenty pôsobením ultrazvuku tvoria agregáty s vysokou molekulovou hmotnosťou (cca 600 kDa), ktoré môžu pri vyššej koncentrácii koagulovať.

Množstvo CHG fragmentov o vysokej molekulovej hmotnosti je úmerné času pôsobenia ultrazvuku, teplote a pomeru CHG:1M NaOH.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Bielo-zelenú biotechnológiu ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja

Literatúra

- Kulicke, W.-M., Lettau, A.I., Thielking, H. *Carbohydr. Res.* (1997) **297**, 135–143.
Machová, E., Kogan, G., Alföldi, J. Šoltes, L., Šandula, J. *J. Appl. Polym. Sci.* (1995) **55**, 699–704.
Rosenberger, R.F. The cell wall, in: J.E. Smith, D.R. Berry (Eds.), *The Filamentous Fungi*, vol. 2, Edward Arnold, London, 1976, pp. 328–344.
Sietsma, J.H., Wessels, J.G.H. *J. Gen. Microbiol.* (1981) **125**, 209–212.

Levels of antimicrobial peptide defensin1 vary in larval jellies in honeybee colonies.

Jaroslav Klaudiny^{*a}, Katarína Bachanová^a, Lenka Kohútová^a, Mária Dzúrová^a, Ján Kopernický^b, Juraj Majtán^c

^a Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovakia

^b Animal Production Research Centre, Institute of Apiculture, Gašperíkova 599, 03308, Liptovský Hrádok, Slovakia

^c Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 84506 Bratislava, Slovakia

* Jaroslav.Klaudiny@savba.sk

Key words: honeybee, antimicrobial peptide, immunoblotting, honeybee disease, American foulbrood

Introduction

Honeybee brood food, larval jelly (LJ) produced by nurses (bees aged between 5 and 15 days) contains antimicrobial peptide defensin1. It was documented that the peptide (originally characterized as royalisin- Fujiwara et al 1990) is capable to inhibit *in vitro* growth of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* (Bíliková et al. 2001, Bachanová et al. 2002). The pathogen is a causative agent of the most serious larval disease American foulbrood (AFB) which causes substantial financial losses in beekeeping and agricultural production dependent on pollination. Young larvae are infected by bacterial spores that contaminate the brood food (Shimanuki et al. 1992, Genersch 2010). The presence of defensin1 in LJ and its antimicrobial properties suggest that defensin1 could contribute to the protection of the brood against AFB. The aim of this work was to compare defensin1 levels: (1) in royal a worker jellies representing food of queen and worker larva, respectively, (2) in colonies of different breeding lines and to evaluate two ways of normalization of defensin1 levels- against total protein (TP) or water-soluble protein (WSP) of LJs.

Materials and Methods

Biological material

Samples of RJs and WJs were collected from *Apis mellifera carnica* colonies belonging to different breeding lines. Colonies came from three apiaries: the apiary of the Institute of Apiculture Liptovský Hrádok (L) and private apiaries in Valaská (V) and in Slatina (S). LJs were collected during June – July within three years. RJs were collected from natural queen cells, mostly from one cell during swarming of colonies. WJs were gathered from a number of worker cells containing 2–3 days old larvae in the total volumes of 40–50 µl. LJ samples were collected into microtubes, stored at –20 °C and before weighing for analysis homogenized well by stirring with a spatula.

Analysis of protein content of LJs

The dry weight of LJ samples was determined in around 20 mg of LJs after their lyophilization in microtubes. In the lyophilized samples, nitrogen (N) content was determined with an elementary analyzer (Fisons Instrument EA 1108). From N, total protein (TP) was fixed employing the universal conversion factor of 6.25 (FAO Food and nutrition paper 77, Rome 2003, ISSN 02544725, pp.7–11). The amount of water-soluble proteins (WSP) in LJs was

measured in their water extracts using Coomassie Blue protein assay (Sedmak & Grossberg 1977) and BSA as a reference.

Quantification of defensin1 in LJs by immunoblotting

RJ or WJ samples of about 2.5 mg were resuspended at a concentration 1 mg/100 µl in the loading buffer and boiled for 8 minutes. Aliquots containing 0.2 mg of jellies were electrophoresed on 16.5% Tricine-SDS-polyacrylamide gel (Schägger & Jagow 1987). Two parallel gels were run in a Mini-Protean II electrophoresis cell (BioRad), one loaded with LJ samples and the second one with various amounts defensin1 quantification standard. Proteins were transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotting was performed as described Klaudiny et al. (2012).

Comparison of defensin1 levels in LJs

Membranes after immunodetection were scanned or photographed with a DC120 Zoom Digital Camera and defensin1 bands were semi-quantified with 1D Image Analysis Software (Kodak). Amounts of defensin1 in bands were determined using calibration curves derived from defensin1 quantification standards. Two or three independent quantification of defensin1 in each LJ were performed from which average value was calculated. Defensin1 amounts were then normalized to the TP as well as WSP in LJs. Relative levels of defensin1 in compared set of LJs were estimated by dividing normalized defensin1 amounts with the lowest value occurred in the set.

Results and discussion

Levels of defensin1, TP and WSP were determined in 43 RJ and 9 WJ samples. Analyzed LJs showed variability in all determined parameters. The highest differences among jellies were in their TP and WSP contents reaching almost two-fold and more than two-fold values, respectively. WSP/TP ratios lying in the range 56.4 - 86.0% and dry weights had lower variability. RJs contained less TP and WSP than WJs. Defensin1 levels varied in jellies between 0.159-0.524 µg/mg LJ. WJs contained similar relative amounts of defensin1 as RJs. Relative defensin1 levels normalized to TP varied between 1-3.01 and those normalized to WSP between 1-2.72. Importantly, similar patterns of variations of LJ defensin1 levels were obtained with both types of normalizations. The average relative levels of defensin1 in the LJs were 1.61 and 1.63, respectively. In vast majority of samples, relative levels of defensin1 fluctuated between 1.0-1.9 (both normalizations) (Fig.1).

Based on obtained findings, we classified colonies according to magnitude of LJ defensin1 levels into two groups -those producing LJs with standard defensin1 levels (SDef1P) and those with higher defensin1 levels (HrDef1P). As HrDef1P colonies, we took colonies containing LJs with relative defensin1 levels higher than 1.9. Several colonies of apiaries L and V belonging to various breeding lines met these criteria (Fig. 1). However, none of the examined breeding lines can be marked as the line with higher LJ defensin1 expression because the lines with HrDef1P colonies contained also SDef1P colonies. Obtained data demonstrated that defensin1 is constitutive component of RJ and WJ. Further research is needed to reveal whether the observed variability in defensin1 amounts in the larval food of young larvae may influence susceptibility of honeybee colonies against AFB.

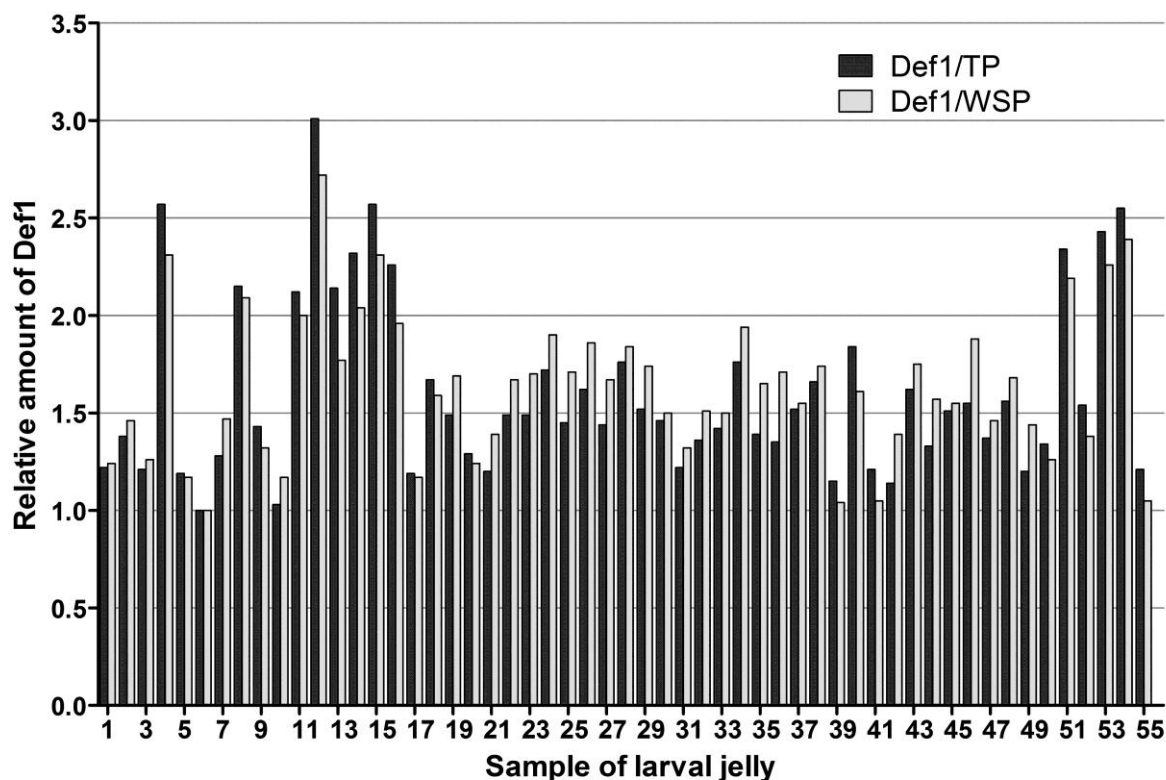


Fig. 1. Profile of relative defensin1 levels in analyzed LJs. The picture demonstrates the extent of variances in defensin1 levels in RJs and WJs and documents that both ways of normalization of defensin1 amounts in LJs either versus total protein (TP) or to water-soluble protein (WSP) make possible to identify the identical LJs containing higher defensin1 levels (relative Def1 amount higher than 1.9). WJs represented samples 28, 37, 38, 41, 50-55. Samples from distinct apiaries: (V) 1-5, 11-38; (L) 6-10, 39-41, 50-55; (S) 42-49. Samples of distinct honeybee breeding line: Dianiška 1-5, 11-38; Sklenárka 6, 10, 53; Vučko 7; Singer 8, 39-41, 54-55; Tatranka 9, 50-52; Hontianka 42-49. Note: Three LJs are depicted twice in the graph (samples: 4, 15; 5, 17 and 41, 55).

Acknowledgments

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for white-green biotechnology, ITMS 26220120054, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

References

- Bachanová K., Klaudiny J., Kopernický J. & Šimúth J. 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* **33**: 259-269.
- Bíliková K., Gusui W. & Šimúth J. 2001. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie* **32**: 275-283.
- Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T. & Kobayashi K. 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. *J. Biol. Chem.* **265**: 11333-11337.
- Genersch E. 2010. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* **103**: S10-S19.

Klaudiny, J., Bachanová, K., Kohútová, L., Dzúrová, M., Kopernický, J., Majtán, J. 2012. Expression of larval jelly antimicrobial peptide defensin1 in *Apis mellifera* colonies. *Biologia* 67, 200-211.

Sedmak J.J. & Grossberg S.E. 1977. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* **79**: 544-552.

Shimanuki H., Knox D.A., Furgala B., Caron D.M. & Williams J.L. 1992. Diseases and pests of honey bees, pp. 1083-1154. In: Graham J.M. (ed.) *The Hive and the Honey Bee*, Dadant & Sons, Hamilton, Illinois.

Syntéza sialových kyselín pomocou zosieťovaných inklúzných teliesok

Klaudia Talafová a Jozef Nahálka*

Chemický ústav SAV, Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

*nahalka@savba.sk

Kľúčové slová

enzýmové inžinierstvo; imobilizácia; lyáza kyseliny N-acetyl-D-neuramínovej; fyziologická agregácia; biosenzor; epimerizácia GlcNAc

Úvod

Sialové kyseliny (Sias), t. j. deriváty kyseliny neuramínovej, často zakončujú oligosacharidové reťazce nachádzajúce sa na povrchu buniek a tiež na glykoproteínoch a glykolipidoch. Typické sú pre stavovce a vyššie bezstavovce, avšak vyskytujú sa aj u niektorých mikroorganizmov. V ľudskom organizme plnia viaceré dôležité funkcie, z ktorých vyplýva aj ich praktické využitie najmä vo farmaceutickom priemysle a v medicíne (Schauer, 2009; Talafová a Nahálka, 2012). Pre priemyselnú prípravu Sias a ich analógov sa využíva enzým aldoláza kyseliny sialovej (SAA, EC 4.1.3.3.), ktorý katalyzuje kondenzačnú reakciu N-acetyl-D-manozamínu (ManNAc) a pyruvátu (Liese a kol., 2006). V prezentovanej práci bol enzým SAA fúzovaný na N-konci s doménou viažucou celulózu z baktérie *Clostridium cellulovorans* (CBD_{clos}) a exprimovaný v *Escherichia coli* za podmienok, v ktorých dochádzalo ku kontrolovanej precipitácii a agregácii enzýmu do formy aktívnych inklúzných teliesok (IBs). Tie boli následne imobilizované v alginátových časticiach, zosieťované glutaraldehydom a lyofilizované. Imobilizovaný enzým bol následne opakovane použitý ako biokatalyzátor kondenzačnej reakcie na prípravu kyseliny N-acetylneuramínovej (Neu5Ac) a zároveň slúžil aj ako biosenzor pri monitorovaní reakcie prietokovým kalorimetrom.

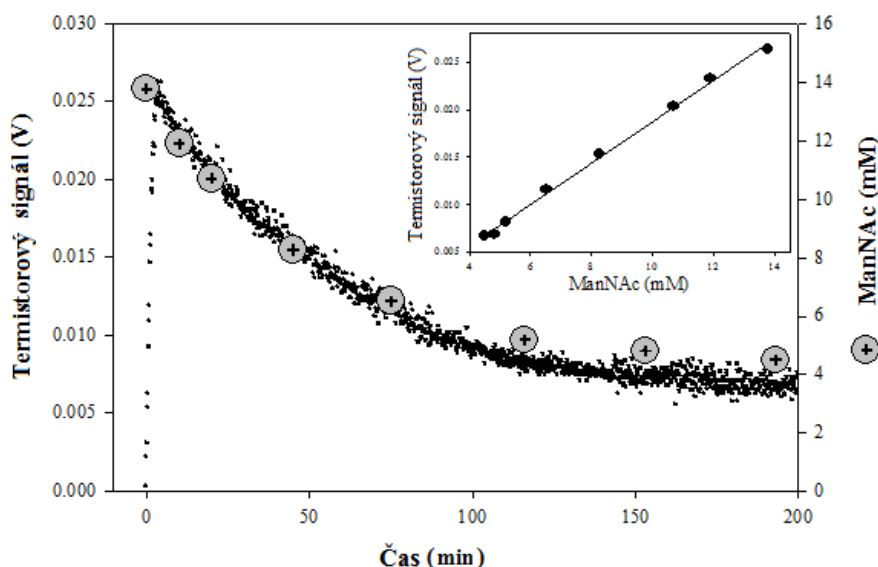
Materiál a metódy

Gén *nanA* (*E. coli* K-12) kódujúci SAA bol amplifikovaný z plazmidu pET15b-NII. Po PCR bol *nanA* purifikovaný a inkorporovaný do linearizovaného plazmidu pET-34b(+) použitím Ek/LIC kitu (Novagen). Vektory obsahujúce gén SAA fúzovaný s CBD_{clos} boli následne použité na transformáciu *E. coli* BL21(DE3). Podmienky kultivácie recipientných kmeňov a izolácie IBs už publikovali Nahálka a kol. (2008). Na imobilizáciu IBs bol použitý roztok 1,5% vysoko viskózneho alginátu sodného so 60% kyselinou D-manurónovou. Cez striekačku formované kvapky boli vnášané do 1%-ného vodného roztoku CaCl₂·2H₂O (w/v). Po inkubácii boli nerozpustné častice suspendované v 50 mM Tris tlmivého roztoku (pH 7,5) a zosieťované pridaním glutaraldehydu. Po premytí boli zrníčka lyofilizované (Nahálka a kol., 2008). Na monitorovanie reakcie bol použitý prietokový kalorimeter (3300 Thermal Assay Probe, Advanced Biosensor Technology, AB, Lund, Sweden). Imobilizované IBs boli súčasťou kolóny a taktiež boli pridané do mikoreaktora k zmesi 75 mM pyruvátu, 50 mM Tris a 50 mM CaCl₂, pH 7,8. Uvedená zmes cirkulovala cez kalorimeter až do dosiahnutia konštantnej ΔT . Reakcia bola potom iniciovaná pridaním ManNAc (400 mM ManNAc, 50 mM Tris, 50 mM CaCl₂, pH 7,8) do mikoreaktora (Nahálka a kol., 2008). Zároveň bola reakcia analyzovaná pomocou HPLC (Shimadzu System LC-10AD, SPD-10AV) pomocou kolóny TESSEK Separon SGX NH₂. Izokratický roztok pozostával z 50 mM H₃PO₄ a 10 mM MgCl₂ (pH 6,4; trietylamin) pri prietoku 0,5 ml.min⁻¹, UV detekcia pri 240 nm (Nahálka a kol., 2008). Izomerizácia GlcNAc na ManNAc prebiehala 48 h pri izbovej teplote vo vodnom metanolovom roztoku hydroxidu sodného (55 mM) pri rôznych koncentráciách metanolu

(0%, 25%, 50%, 75%, 85%, 95%, v/v). Sias boli z reakcie izolované kryštalizáciou 99% kyselinou octovou a následne vyzrážané a purifikované acetónom (Nahálka a kol., 2008).

Výsledky a diskusia

IBs vykazujú v prietokovom kalorimetri exotermický signál, čo umožňuje monitorovať prebiehajúcu reakciu. Štandardný prietokový kalorimeter bol adaptovaný na diferenciálny systém, pri ktorom dochádzalo k recirkularizácii substrátového roztoku. Každý konverzný cyklus bol iniciovaný pridaním ManNAc a koniec reakcie bol stanovený ako dosiahnutie ustáleného ΔT . Zároveň boli z každého cyklu odobrané vzorky a analyzované využitím HPLC. Výsledky získané oboma metódami zhodne potvrdili, že úmerne s predlžujúcim sa časom priebehu reakcie dochádzalo k znižovaniu koncentrácie ManNAc ako dôsledok jeho konverzie na Neu5Ac (Obr. 1). Koreláciu napätia a koncentrácie ManNAc už publikovali Gemeiner a kol. (1996).

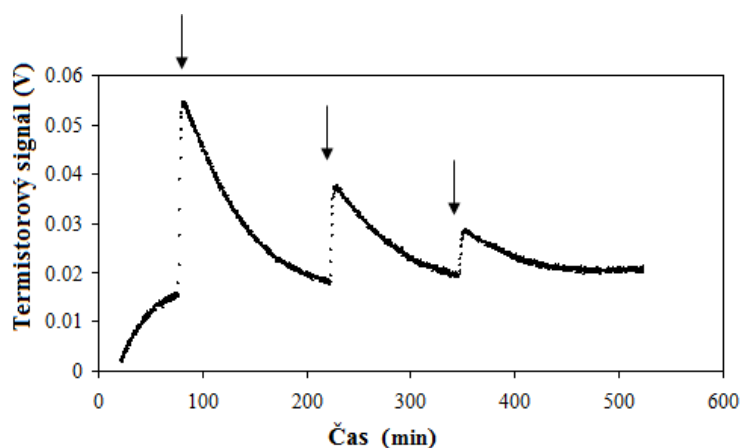


Obr. 1: Kalibrácia prietokového kalorimetra. Znáznorená je závislosť zmien napätia a koncentrácie ManNAc od času priebehu reakcie. Zvlášť je ešte znázornená lineárna závislosť napätia a koncentrácie ManNAc.

Po 20 konverzných cykloch bola dosiahnutá operačná stabilita reaktora a výťažok Neu5Ac dosahoval stále rovnakú úroveň, a to množstvo vytvorené konverziou 40% ManNAc. Z výsledkov, ktoré publikovali Maru a kol. (1998) vyplýva, že výťažok je možné zvýšiť prídavaním pyruvátu systémom „fed-batch“. Pridaním pyruvátu v troch dávkach sa podarilo zvýšiť podiel ManNAc premeneného na Neu5Ac na 60% (Obr. 2).

Ďalšie experimenty boli venované príprave ManNAc, ktorý je príliš drahým substrátom pre priemyselnú výrobu Neu5Ac. Preto sa pripravuje epimerizáciou GlcNAc na atóme C-2 buď enzymaticky (Marukin Shoyu Company, Ltd.; Forschungszentrum Jülich, GmbH) alebo chemicky (GlaxoSmithKline) (Liese a kol., 2006). My sme vyskúšali „one-pot“ alkalickú epimerizáciu suspenzie GlcNAc v metanole. Ako výhodnejšie sa ukázalo využitie refluxu, pričom optimálna koncentrácia metanolu bola 25-50%. Pri týchto koncentráciách boli získané výťažky nielen najväčšie, ale mali aj najvyššiu čistotu. Pri „fed-batch“ experimente popísanom vyššie bolo 55% takto pripraveného ManNAc (73% zmes) konvertovaného na Neu5Ac. Pokles o 5% v porovnaní s predošlými výsledkami pri použití čistého ManNAc zapríčinil GlcNAc, ktorý pôsobí ako inhibítor (Mahmoudian a kol., 1997).

Výsledný produkt (Neu5Ac) bol získaný kryštalizáciou použitím kyseliny octovej a purifikáciou vodným roztokom acetónu, pričom jeho výsledná čistota bola 99% (HPLC).



Obr. 2: Postupné pridávanie pyruvátu do reakcie monitorované prietokovým kalorimetrom. Reakčná zmes obsahovala 50 mM ManNAc, 50 mM CaCl₂, 10,8 g (čerstvá váha) IBs v reaktore a 0,4 g v kolóne kalorimetra. Výsledný objem bol 103 ml, pH 7,5. Pyruvát bol pridaný v troch dávkach (znázornené na obrázku šípkou), každá obsahovala 25 mM pyruvátu.

Uvedené výsledky dokazujú, že produkcia enzýmov fúzovaných s CBD_{clos} v *E. coli* vedie k agregácii a tvorbe aktívnych nerozpustných inklúzných teliesok, ktoré sa ľahko izolujú a zosieťované a viazané v algináte si zachovávajú dlhotrvajúcu operačnú stabilitu a procesné vlastnosti. Enzým SAA sa môže v tejto forme využiť ako biokatalyzátor a zároveň aj biosenzor pri príprave Neu5Ac kondenzáciou ManNAc a pyruvátu, pričom najvyšší výťažok je možné dosiahnuť tzv. „fed-batch“ pridávaním pyruvátu.

Podakovanie

Prezentované výsledky boli získané vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Gemeiner, P., Dočolomanský, P., Nahálka, J., Štefuca, V. & Danielsson, B. (1996). *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 26-35.
- Liese, A., Seelbach, K., Buchholz, A. & Haberland, J. (2006). In: Liese, A., Seelbach, K. & Wandrey, C. (Eds.) *Industrial Biotransformations*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 457–460.
- Mahmoudian, M., Noble, D., Drake, C.S., Middleton, R.R., Montgomery, D.S., Piercey, J.E., Ramlakhan, D., Todd, M. & Dawson, M.J. (1997). *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 393-400.
- Maru, I., Ohnishi, J., Ohta, Y. & Tsukada, Y. (1998). *Carbohydr. Res.*, 306, 575-578.
- Nahálka, J., Vikartovská, A. & Hrabárová, E. (2008). *J. Biotechnol.*, 134, 146-153.
- Schauer, R. (2009). *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 19, 507-514.
- Talafová, K. & Nahálka, J. (2012). *Cent. Eur. J. Biol.*, 7, 777-793.

Enzýmová syntéza substrátov pre sialylačné reakcie pomocou polyfosfátkinázy 3 (PPK3)

Klaudia Talafová a Jozef Nahálka*

Chemický ústav SAV, Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko
Chemický ústav SAV, Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

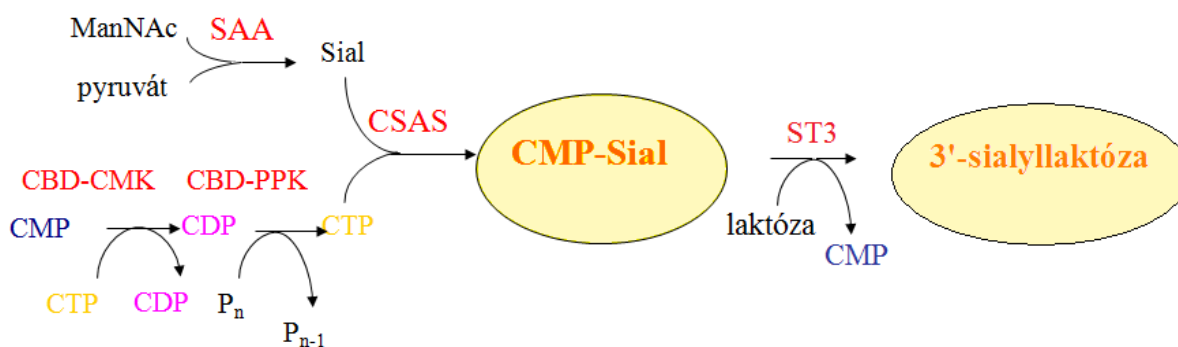
*nahalka@savba.sk

Kľúčové slová

inklúzne telieska PPK3; biokatalytická zmes; CMP-sialová kyselina; 3'-sialyllaktóza

Úvod

Sialové kyseliny (Sias) predstavujú skupinu monosacharidových jednotiek, ktorých molekula pozostáva z deviatich uhlíkov. Zvyčajne zakončujú oligosacharidy pripojené k povrchu buniek alebo k proteínom a lipidom stavovcov a vyšších bezstavovcov. Sprostredkujú a regulujú viaceré normálne, ale aj patologické procesy v ľudskom organizme (Schauer, 2009; Talafová a Nahálka, 2012). Vďaka svojim špecifickým vlastnostiam môžu byť Sias veľkým prínosom, najmä pre farmaceutický priemysel a medicínu (Talafová a Nahálka, 2012). Na sialyláciu substrátov sa môžu použiť bunkové línie, avšak úroveň sialylácie je variabilná a často nedostatočná. Preto sa pozornosť venuje najmä zvyšovaniu efektivity sialylácie *in vitro*. Uplatňujú sa dva typy enzýmových reakcií: sialyltransferáza využívajúca CMP-N-acetylneuramínovú kyselinu (CMP-NeuAc) a *trans*-sialidáza využívajúca ako substrát 3'-sialyllaktózu alebo fetuín (Marchal a kol., 2001). Keďže tieto substráty sú nákladné, predstavujeme metódu prípravy CMP-NeuAc a 3'-sialyllaktózy z lacného polyfosfátu. Ten je využívaný polyfosfátkinázou 3 (PPK3), ktorá v kombinácii s ďalšími enzýmami vytvára biokatalytickú zmes na syntézu uvedených substrátov (Obr. 1).



Obr. 1: Schéma syntézy CMP-NeuAc (CMP-Sial) a 3'-sialyllaktózy použitím biokatalytickej zmesi. CBD-CMK, CBD-PPK - cytidilátkináza (CMK) a polyfosfátkináza (PPK) agregované do formy inklúzných teliesok; SAA – aldoláza kyseliny sialovej; Sial – NeuAc; CSAS – syntetáza kyseliny CMP – sialovej; ST3 – α 2,3-sialyltransferáza.

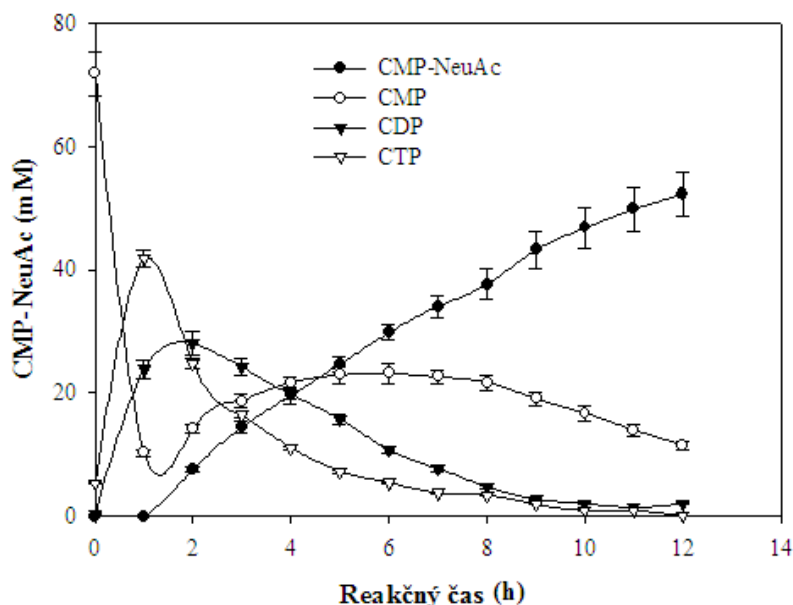
Materiál a metódy

Gén pre PPK3 z baktérie *Silicibacter pomeroyi* a gén *Hd0053* kódujúci α 2,3-sialyltransferázu z baktérie *Haemophilus ducreyi* (ATCC 700808D) boli purifikované a vložené do linearizovaného vektora pET-34b(+) použitím LIC kitu (Novagen). Výsledný proteín bol na N-konci fúzovaný s CBD_{clos}, čo spôsobilo

agregáciu proteínu do aktívnych inklúzných teliesok (Nahálka a kol., 2008). Rekombinantnými vektormi boli následne transformované bunky *E. coli* BL21(DE3). Podmienky kultivácie recipientných kmeňov a izolácie IBs publikovali Nahálka a Pätoprstý (2009). Enzymová aktivita a celkový priebeh reakcie boli sledované pomocou HPLC. Každých 20 minút bola z reakcie odobraná vzorka 10 μ l, zamrzala sa a neskôr sa použila na analýzu. HPLC prebiehala na zariadení Shimadzu System (LC-10AD, SPD-10AV, RID-10A), kolóna TESSEK Separon SGX NH₂. Izokratický roztok na monitorovanie syntézy CMP-NeuAc pozostával z 50 mM H₃PO₄ a 10 mM MgCl₂ (pH 6,4; trietylamin), prietok 0,5 ml.min⁻¹. Na sledovanie syntézy 3'-sialyllaktózy bol použitý roztok pozostávajúci zo 60% acetonitrilu a 40% kyslého vodného roztoku (50 mM H₃PO₄, 10 mM MgCl₂), prietok 0,5 ml.min⁻¹ (Nahálka a Pätoprstý, 2009).

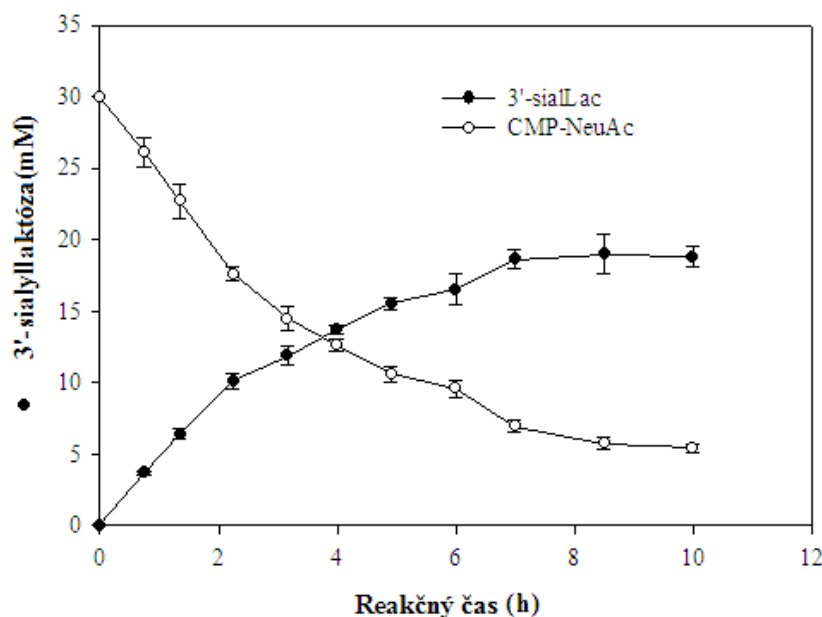
Výsledky a diskusia

CMP-NeuAc bola syntetizovaná použitím biokatalytickej zmesi. Tá pozostávala z cytidilátkinázy (CMK) a PPK3 vo forme aktívnych inklúzných teliesok a celých buniek produkujúcich aldolázu kyseliny sialovej (SAA) aj syntetázu kyseliny CMP-sialovej (CSAS) (Obr. 1). Príprava týchto buniek už bola predtým popísaná (Song a kol., 2003; Nahálka a kol., 2004). Výsledkom reakcie bolo 52 mM CMP-NeuAc, z čoho vyplýva, že výtťažok z reakčnej zmesi objemu 10 ml by mohol byť teoreticky 300 mg CMP-NeuAc (Obr. 2).



Obr. 2: Zmena koncentrácie CMP-NeuAc v závislosti od času priebehu reakcie. Reakčná zmes (10 ml) obsahovala 4,8 mg CMK a 9,2 mg PPK3 vo forme inklúzných teliesok, 150 mM polyfosfátu, 150 mM pyruvátu, 75 mM ManNAc, 75 mM CMP, 50 mM MgCl₂, 5 mM CTP, 50 mM Tris (pH 7,8), inkubované pri 30°C a po 1 hodine sa pridalo 50 mg (suchá váha) *E. coli* exprimujúcich SAA/CSAS.

Enzým α 2,3-sialyltransferáza (ST3) katalyzujúci syntézu 3'-sialyllaktózy mal však vo forme IBs výrazne zníženú aktivitu. Po opracovaní detergentom a izolácii IBs predstavovala aktivita ST3 v rozpustnej aj nerozpustnej forme iba 5% celobunkovej aktivity. Z tohto dôvodu boli pri našom experimente použité lyofilizované bunky *H. ducreyi* so zvýšenou expresiou ST3. Konverzia CMP-NeuAc na 3'-sialyllaktózu však nebola kompletná. Zvýšený výtťažok 3'-sialyllaktózy bol dosiahnutý oddelením syntézy CMP-NeuAc a 3'-sialyllaktózy (Obr. 3). Zatiaľ sa ale nedá jednoznačne určiť, či má na výsledný produkt reakcie rozhodujúci negatívny vplyv CMP, polyfosfát alebo PPi/Pi. Na zvýšenie efektivity uvedenej reakcie budú ešte potrebné ďalšie experimenty.



Obr. 3: Zmena koncentrácie 3'-sialyllaktózy (3'-sialLac) v závislosti od času priebehu reakcie. K 5,75 ml reakčnej zmesi na syntézu CMP-NeuAc bolo pridaných 4,25 ml zmesi obsahujúcej 100 mM laktózu a 50 mM Tris (pH 7,8 pri 30°C). Reakcia bola iniciovaná pridaním 50 mg (suchá váha) *E. coli* produkujúcich ST3.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že CMP-NeuAc a 3'-sialyllaktózu je možné efektívne syntetizovať tu prezentovaným spôsobom s využitím biokatalytickej zmesi. Obe látky sú dôležité substráty pre sialyláciu farmaceuticky významných glykoproteínov. Nami navrhovaná metóda umožňuje ich finančne nenáročnú syntézu vďaka využitiu PPK3.

PodĎakovanie

Prezentované výsledky boli získané vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Marchal, I., Cerutti, M., Mir, A.-M., Juliant, S., Devauchelle, G., Cacan, R. & Verbet, A. (2001). *Glycobiology*, 11, 593-603.
- Nahálka, J. & Pätöprstý, V. (2009). *Org. Biomol. Chem.*, 7, 1778-1780.
- Nahálka, J., Vikartovská, A. & Hrabárová, E. (2008). *J. Biotechnol.*, 134, 146-153.
- Nahálka, J., Wu, B., Shao, J., Gemeiner, P. & Wang, P.G. (2004). *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 40, 101-106.
- Schauer, R. (2009). *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 19, 507-514.
- Song, J., Zhang, H., Wu, B., Zhang, Y., Li, H., Xiao, M. & Wang, P.G. (2003). *Mar. Drugs*, 1, 34-45.
- Talafová, K. & Nahálka, J. (2012). *Cent. Eur. J. Biol.*, 7, 777-793.

¹H-NMR spektroskopia a dedičné poruchy metabolizmu - deficit guanidinoacetát metyltransferázy

Uhliariková I.¹, Matulová M.¹, Behúlová D.², Šalingová A.², Kolníková M.³, Šaligová J.⁴, Potočnáková L.⁴

¹Chemický ústav SAV, Bratislava

²Oddelenie laboratórnej medicíny, Detská fakultná nemocnica s poliklinikou, Bratislava

³Klinika detskej neurológie, Detská fakultná nemocnica s poliklinikou, Bratislava

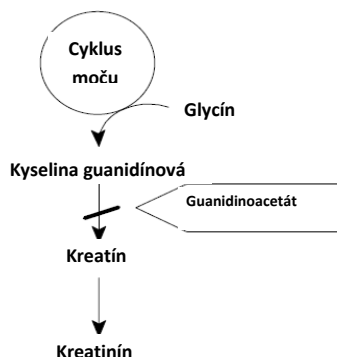
⁴Detská fakultná nemocnica, Košice

Kľúčové slová:

metabolizmus, NMR spektroskopia, guanidinoacetát metyltransferáza, moč

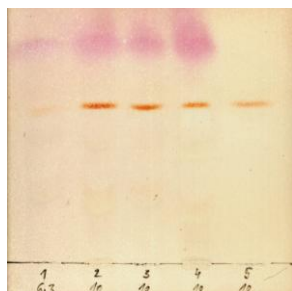
Úvod:

Dedičné poruchy metabolizmu (DPM) sú ochorenia, ktorých príčinou je geneticky podmienená porucha funkcie enzýmu či transportného proteínu. Deficit guanidinoacetát metyltransferázy (GAMT) je pomerne novou skupinou dedičných porúch spojených so syntézou a transportom kreatínu. Príčinou tohto ochorenia sú mutácie na GAMT gène, ktorý zodpovedá za tvorbu enzýmu GAMT, ktorý sa podieľa na dvojkrokovej syntéze kreatínu z aminokyselín, v dôsledku čoho dochádza k zvýšenej hladine kyseliny guanidínovej (GAA) v telových tekutinách. Toto metabolické ochorenie primárne ovplyvňuje nervový systém a svalstvo. Spoločným klinickým prejavom je mentálna retardácia, oneskorenie reči, epilepsia. Pacienti sú zachytávaní skriningovou HPTLC metódou z moču a kvantifikácia GAA sa vykonáva pomocou GC-MS/MS a najnovšie ¹H-NMR spektroskopiou. Cieľom práce bolo potvrdenie predpokladanej diagnózy deficitu guanidinoacetát metyltransferázy pomocou ¹H-NMR spektroskopie.



Materiál:

Vzorky moču pacientov u ktorých bolo skriningovou HPTLC metódou, s využitím Sakaguchiho činidla na dôkaz guanidínových zlúčenín v rannom a zbieranom moči. Obr.1 potvrdzuje extrémne zvýšené vylučovanie GAA.



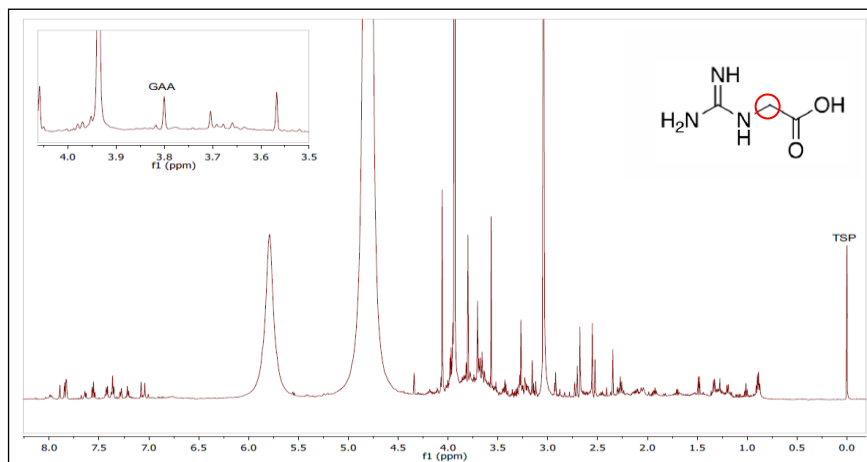
Obr.1 HPTLC chromatogram vzorky moču pacienta s fyziologickým (pozícia 1) a zvýšeným vylučovaním GAA (pozícia 2,3,4). Pozícia 5 je vodný roztok štandardu GAA 300umol/l.

Metóda:

Na analýzu vzoriek moču bola použitá nedeštruktívna metóda – ^1H -NMR spektroskopia. Vzorky sa merali pri 25°C na VNMRs 600MHz Varian spektrometri vybavenom triple HCN kryosondou so zvýšenou toleranciou na roztoky s vyšším obsahom solí, použitím sekvencie spinového echa na potlačenie signálu vody. Ako interný štandard bola pridaná sodná soľ 3-metylsilyl propánovej kyseliny (TSP, δ 0 ppm).

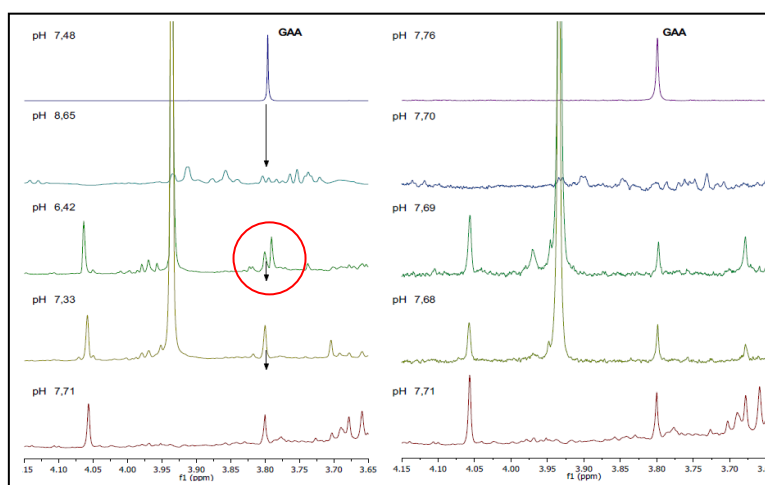
Výsledky a diskusia:

V ^1H -NMR spektrách moču bola potvrdená prítomnosť diagnostického signálu kyseliny guanidínovej (Obr.2) pri δ 3.80 ppm (singlet CH_2 skupiny).



Obr.2 ^1H -NMR spektrum moču pacienta s GAMT. Charakteristický signál GAA je označený v expandovanej časti.

V ^1H NMR spektre moču je poloha signálov (chemický posun δ) protónov v prítomných metabolitoch závislá od hodnoty pH roztoku. Hodnota pH meraných vzoriek moču pacientov bola rozličná. Pre jednoznačnú identifikáciu signálu GAA bolo nutné upraviť pH vzoriek moču a premerať spektrá (Obr. 3). Po identifikácii signálu GAA bol stanovený aj jeho obsah v moči.



Obr.3 Vybraná oblasť ^1H -NMR spektier štandardu kyseliny guanidínovej a série vzoriek moču pacientov pred a po úprave pH.

Na základe týchto výsledkov sme mohli potvrdiť predpokladanú diagnózu vrodenej poruchy metabolizmu - deficit guanidinoacetát metyltransferázy.

Pod'akovanie:

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra:

1. Sewell A. C., Murphy H. C., Iles R.A., 2002 *Clinical Chemistry*, 48, 357-359.
2. U.F.H. Engelke, S.H. Moolenaar, S.M.G.C. Hoenderop, E. Morava, M. van der Graaf, A. Heerschap and R.A. Wevers, *Handbook of 1H-NMR spectroscopy in inborn errors of metabolism: body fluid NMR spectroscopy and in vivo MR spectroscopy*, 2007.

Postgenomická analýza adaptácie ľanu siateho v černobyľskej oblasti využitím gélovej proteomiky

Daša Gábrišová, Martin Hajduch

Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra, Slovensko

Kľúčové slová

Černobyľ, ľan siaty, proteomika, 2-DE

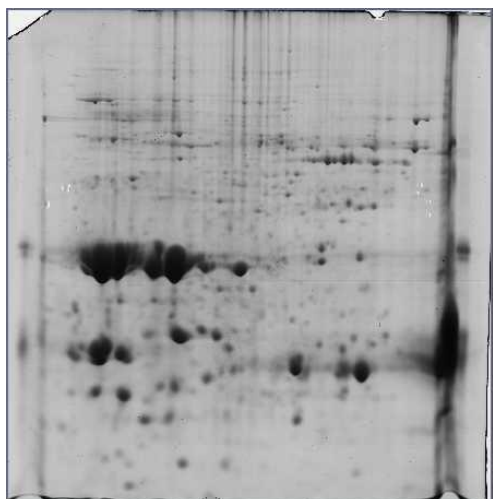
Úvod

26. apríla 1986 došlo k explózii jedného zo štyroch reaktorov v Atómovej elektrárni Černobyľ (Anspaugh *et al.*, 1988), následkom čoho sa do prostredia uvoľnilo obrovské množstvo rádionuklidov a došlo k zamoreniu veľkej časti Európy. Väčšina rádionuklidov sa rozložila v priebehu niekoľkých dní, ale rádionuklidy s dlhým polčasom rozpadu ako napríklad ^{137}Cs a ^{90}Sr sú v prostredí stále prítomné (Møller and Mousseau, 2006). Organizmy, ktorých prirodzeným životným prostredím je okolie Černobyľu, boli po výbuchu vystavené vysokým dávkam ionizujúceho žiarenia (Syomov *et al.*, 1992). Za obzvlášť citlivé môžeme považovať rastliny, keďže sú to organizmy nehybné a neschopné opustiť kontaminované prostredie, čím by sa vyhli jeho škodlivému vplyvu. Preto ak chcú prežiť, musia sa prispôbiť životu v týchto podmienkach (Dmitrieva, 1996). Nakoľko rastliny rastúce v oblasti Černobyľu vykazujú známky adaptácie, cieľom práce je odhaliť možný molekulový mechanizmus tohto procesu na úrovni proteínov s využitím proteomických metód.

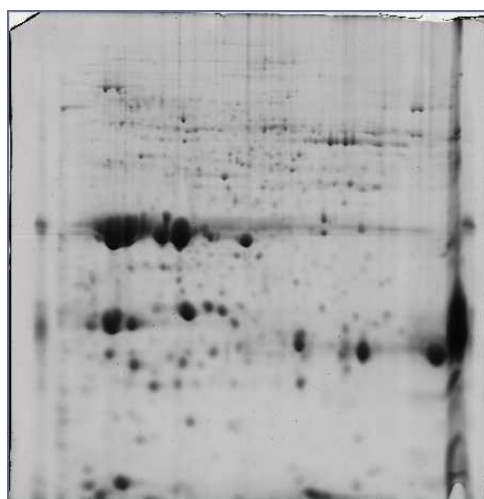
Materiál a metódy

Rastliny ľanu siateho (*Linum usitatissimum*, L., var. Kyivskyi) boli pestované na dvoch typoch výskumných plôch. Experimentálna výskumná plocha bola umiestnená 5 km od Jadrovej elektrárne Černobyľ v blízkosti mesta Chystogalivka, kontrolná 10 km od Jadrovej elektrárne Černobyľ priamo v meste Černobyľ. Rastliny boli označené v deň kvitnutia a semená sa zbierali v intervaloch 14, 21, 28 dní po kvitnutí a zrelé semená. Na izoláciu proteínov sme použili protokol navrhnutý Hurkmanom a Tanakom (1986). Proteíny sme rozpustili v IEF extrakčnom roztoku v zložení 8 M močovina, 2 M tiomočovina, 2% CHAPS, 2% Triton X-100, 50 mM ditiotreitol a koncentráciu sme stanovili fotokolorimetricky metódou podľa Bradforda (1976). Následne sme ich podrobili dvojrozmernej gélovej elektroforéze. Ku vzorke obsahujúcej 700 µg proteínov sme pridali 2 µl IPG pufru pH 3-10, roztok sme napipetovali do rehydratačnej nanášky a prekryli IPG prúžkom (17 cm, pH 5-8). Izoelektrická fokusácia prebiehala za nasledujúcich podmienok: aktívna rehydratácia (10 hod pri 50 V), 100 V pri 100 Vh, 500 V pri 500 Vh, 8000 V pri 99 kVh. Po jej ukončení sme IPG prúžky inkubovali v SDS ekvilibračnom pufru v zložení 1,5 M Tris-HCl pH 6.8, 6 M močovina, 30% glycerol, 5% SDS 15 minút s 2% ditiotreitolom, následne 15 minút s 2,5 % jódoacetamidom. IPG prúžky sme naniesli na gél a uskutočnili sme separáciu proteínov za prítomnosti SDS pri 2W/gél počas 16 hodín. Následne sme gély premyli 3 krát destilovanou vodou a farbili koloidným roztokom Coomassie v zložení 20% etanol; 1,6% kyselina fosforečná; 8% síran amónny; 0,08% Coomassie Brilliant Blue G-250 po dobu 12 hodín. Gély boli oskenované na skeneri GS-800 Calibrated Densitometer s rozlíšením 63,5×63,5 pixelov.

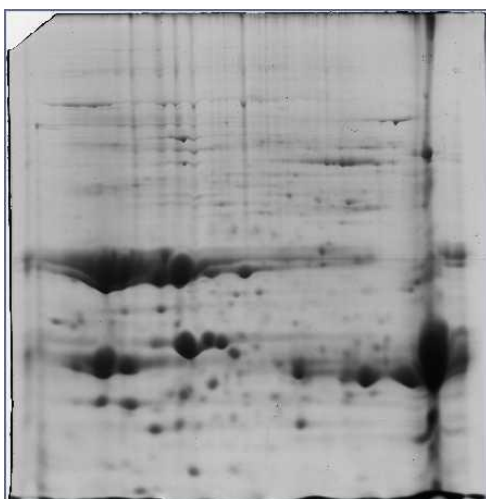
Výsledky



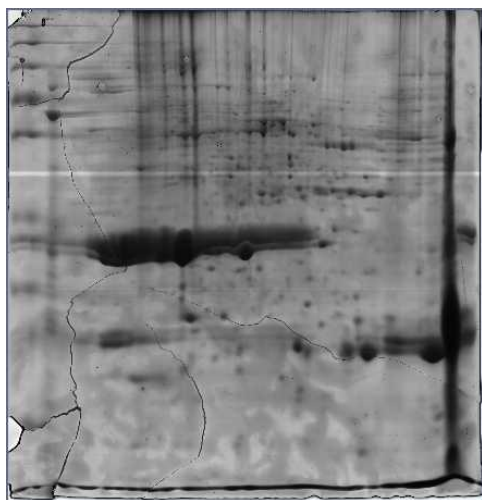
2.vývinové štádium,
experimentálna výskumná plocha



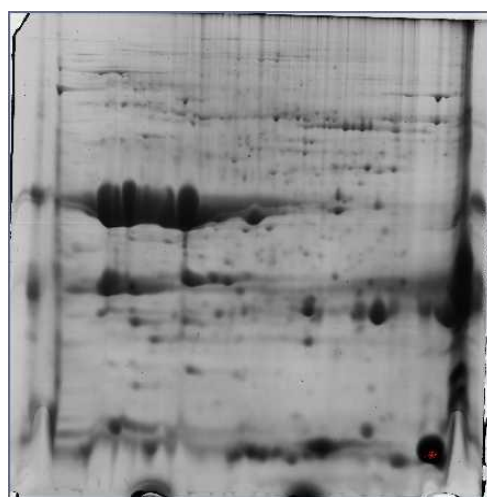
3.vývinové štádium,
experimentálna výskumná plocha



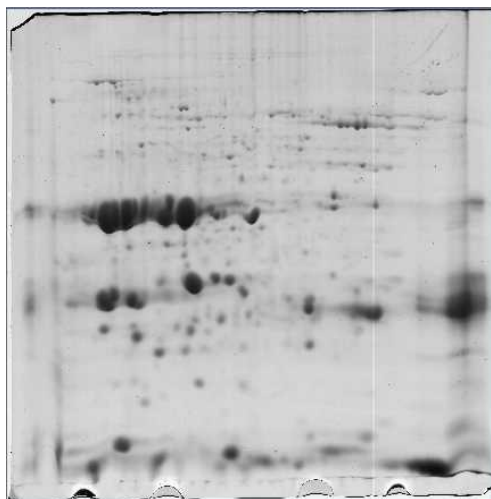
4.vývinové štádium,
experimentálna výskumná plocha



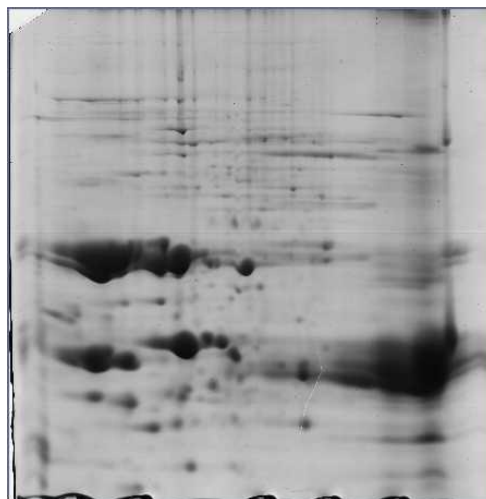
1.vývinové štádium, kontrolná
výskumná plocha



2.vývinové štádium, kontrolná
výskumná plocha



3.vývinové štádium, kontrolná
výskumná plocha



4.vývinové štádium, kontrolná
výskumná plocha

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaného zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Anspaugh, L.R. – Catlin, R.J. – Goldman, M. 1988. The global impact of Chernobyl reactor accident. In *Science*. ISSN 0036-8075, 1988, vol. 242, 1513–1519 p.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In *Analytical Biochemistry*. ISSN 0003-2697, 1976, vol. 72, 248–254 p.
- Dmitrieva, S.A. 1996. The adaptation of natural plant populations to chronic irradiation due to the accident at the Chernobyl Atomic Electric Power Station. In *Tsitologiya i genetika*. ISSN 0095-4527, 1996, vol. 30, 3–8 p.
- Hurkman W.J. – Tanaka, C.K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. In *Plant Physiology*. ISSN 0032-0889, 1986, vol. 81, 802–806 p.
- Møller, A. P – Mousseau, T. A. 2006. Biological consequences of Chernobyl: 20 years on. In *Trends in Ecology & Evolution*. ISSN 0169-5347, 2006, vol. 21, 200–207 p.
- Syomov, A.B – Ptitsyna, S.N. – Sergeeva, S.A. 1992. Analysis of DNA strand break induction and repair in plants from the vicinity of Chernobyl. In *Science of the Total Environment*. ISSN 0048-9697, 1992, vol. 112, 1–8 p.

Možné problémy súvisiace s 2-DE gélmi v proteomickom výskume

Michal Berčák, Martin Hajduch

Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra, Slovensko

Kľúčové slová

Elektroforéza, 2-DE gél, proteomika

Úvod

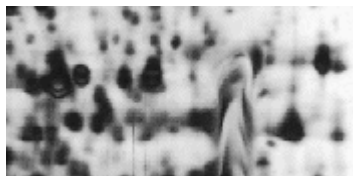
Kľúčovou technikou proteomiky je vysokorozlišovacia dvojrozmerná elektroforéza, jedinečná metóda schopná účinne separovať komplexnú zmes bielkovín. Bola popísaná O'Farellom (O'Farell, 1975) a Klosom (Klose, 1975) v roku 1975. Širokého rozšírenia dosiahla až s rozvojom proteomiky v posledných rokoch. Ide o inštrumentálne náročnú techniku, ktorá pri použití špičkových komerčných aparátov vyžaduje precíznu laboratórnu prácu a čisté chemikálie. Celý proces pozostáva zo špeciálneho postupu prípravy vzorky, izoelektrickej fokusácii, polyakrylamidovej elektroforézy v prítomnosti dodecyl-sulfátu sodného a vizualizácie obrazu separovaných bielkovín (proteínovej mapy) (Rabilloud, 1996).

Píprava vzorky pre 2-DE elektroforézu

Tento krok je kvôli svojmu zásadnému vplyvu na obraz proteínovej mapy jednou z najdôležitejších ale i najproblematickejšou časťou proteomiky a môže sa veľmi líšiť podľa typu vzorky. Stratégia je daná snahou o solubilizáciu (prevedenie do rozpustného stavu) a disagregáciou (obmedzenie vzájomných interakcií) čo najväčšieho množstva proteínov vo vzorke (Link, 1999). Je nutné minimalizovať prípadné interferencie činidiel, ktoré zostali vo vzorke z predchádzajúcich krokov (soli, SDS, inhibítory proteáz). Vzorka buniek alebo tkaniva by mala byť centrifugačne premytá v pufri nie príliš s veľkou iónovou silou a potom fyzikálne alebo chemický rozbitá (rozštiepená). V závislosti na druhu vzorky možno zvoliť „french press“, sonikáciu, osmotickú lýzu a mechanickú homogenizáciu (Link, 1999; Berkelman a Stenstedt, 1998). Súčasne je nevyhnutné enzýmovo odstrániť zvyšky DNA a RNA. Pri rozbiťaní a v následných krokoch je treba eliminovať účinky proteolytických enzýmov. Ich pôsobenie môže mať značný vplyv na obraz proteínovej mapy. Ponúka sa

aplikácia inhibítorov proteáz (PMSF, Pefabloc[†], EDTA), voľba alkalického prostredia, krátkodobá práca pri zvýšenej teplote. V každom prípade sa odporúča proces čo najviac skrátiť. Pre štúdium iba určitej skupiny proteínov (membránové, ribozomálne) sa realizuje prefrakcionácia, obvykle za použitia ultracentrifugácie. Ak nie je vzorka dostatočne koncentrovaná, je možné zahustiť ju lyofilizáciou (Rabilloud, 2000; Molloy a kol., 1998) alebo precipitáciou acetónom alebo kyselinou trichlóroctovou. Účinkom vzorkového pufru, s ktorým je vzorka zmiešaná pred nanesením na IEF gél, by mali byť proteíny solubilizované a desagregované. Prítomnosť vysokej koncentrácie chaotropných činidiel (močovina, tiomočovina) (Rabilloud, 1997), bránia asociácii proteínov vodíkovými mostíkmi. Zwitterionové či neionové detergenty (CHAPS, NONIDET NP-40, TRITON X-100, Tween 20, oktyglukozid, ASB 14) zaisťujú rozpustnosť hydrofóbných častí bielkovín. Redukčné činidlá ditiotritol, ditierytritol, tributylfosfin) zamedzujú vzniku disulfidových mostíkov. Pre proteomiku je dosiaľ v značnej miere nevyriešením problémom analýza funkčne dôležitých membránových proteínov (Molloy, 2000; Santoni a kol., 2000) a analýza proteínov vyskytujúcich sa v bunke v malom počte kópii. Kvôli svojej hydrofóbnosti sa membránové proteíny zle rozpúšťajú (solubilizujú) a obmedzene vstupujú do IEF gélu. V dôsledku toho sú ich škvrny na proteínovej mape pod limitom detekcie 2-DE často i v prípade, že ich množstvo v bunke je značné a preto je treba voliť čo najúčinnějšíe solubilizačné postupy a detergenty. Dlhो užívaným postupom je vloženie presolubilizačného kroku s použitím anionového detergentu SDS. Tento detergent sa vyznačuje značnou solubilizačnou silou, ale interferuje pri IEF. Tento fakt možno ale obísť zriedeným vzorky vzorkovým pufrom obsahujúci neionový či zwitterionový detergent (Ames a Nikaido, 1976; Harder a kol., 1999). Rozpustnosť proteínov v priebehu 2-DE analýzy zlepšuje dvojkroková ekvilibrácia IEF gélu s použitím jódacetamidu (Görg a kol., 1987), uplatnením redukčného činidla tributylfosfinu (Herbert a kol., 1998) a aplikácia vzorky pred rehydratáciou IPG prúžkov (Rabilloud a kol., 1994). Bežná dvojrozmerná gélová elektroforéza je schopná sledovať približne 1200 proteínov. Preto je veľmi dôležité pri plánovaní 2-DE experimentu zvoliť také podmienky, ktoré poskytnú čo najlepšie rozdelenie proteínov, ale nebudú na úkor ich detekovateľnosti. Jednou z možností je prepufrikácia či obohatenie vzorky. To však nie je bezstratové a v mnohých prípadoch môže časová náročnosť viesť i k strate menej stabilných post-translačných modifikácii alebo rozpadu niektorých proteínov. Druhá cesta je modifikácia parametrov samotnej 2-DE elektroforézy. Voľba rozsahu pI a hustota gélu v druhom rozmere dramaticky ovplyvní kvalitu výsledného obrazu proteómu (Hafiz, 2005).

Skreslenie 2-DE obrazu



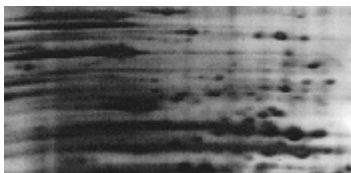
Možná príčina

Nerovnomerná polymerizácia gélu alebo príliš rýchla polymerizácia

Odstránenie problému

Polymerizácia sa môže urýchliť zvýšením 50% množstva síranu amónneho a TEMEDU.

Horizontálne pruhy



Možná príčina

Vzorka nie je kompletne solubilizovaná.

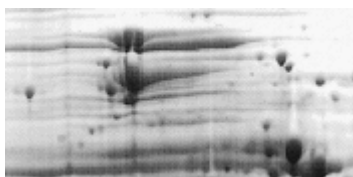
Vzorka je málo rozpustná v rehydratačnom roztoku.

Odstránenie problému

Uistite sa, či vzorka je úplne a stabilne solubilizovaná.

Zvýšiť koncentráciu rozpúšťacích zložiek v rehydratačnom roztoku.

Zvýšiť koncentráciu IPG pufra.



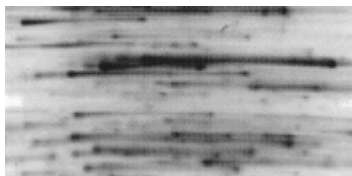
Možná příčina

Vysoká nanáška vzorky.

Odstránenie problému

Separácia vyžaduje čisté vzorky.

Predĺžiť fokusačný čas.



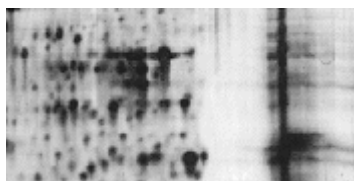
Možná příčina

Fokusačný čas nebol dost' dlhý, aby sa dosiahol rovnovážny stav.

Odstránenie problému

Predĺžiť fokusačný čas.

Vertikálna medzera v 2-DE vzorke

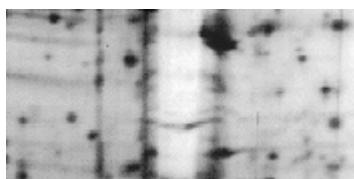


Možná příčina

Nečistota vo vzorke.

Odstránenie problému

Upraviť prípravu vzorky.

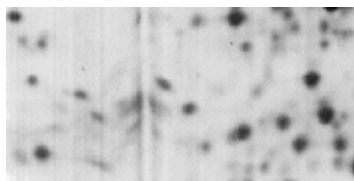


Možná příčina

Nečistoty v rehydratačnom roztoku

Odstránenie problému

Použitie vysoko kvalitných činidiel



Možná příčina

Bublina medzi IPG stripom a horným povrchom gélu

Odstránenie problému

Uistiť sa, či žiadne bubliny nie sú zachytené medzi IPG stripom a horným povrchom gélu (Simpson, 2001).

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Bielo-zelenú biotechnológiu ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja

Literatúra

AMES, G.F.L. – NIKAIDO, K. 1976. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. In *Biochemistry*. ISSN 1756-2651, 1976, vol. 15, p. 616-623

BERKELMAN, T. – STENSTEDT, T. 2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradients: Principles & Methods. 1 st edn. Amersham Pharmacia Biotech Inc. Press; 1998. p. 36.

GÖRG, A. a kol. 1987. Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer. In *Electrophoresis*. ISSN 1522-2683, 1987, vol. 8, p. 122-124

HAFIZ, A. 2005. Principles and reactions of protein extraction, purification and characterization. In *CRC Press*, 2005, p. 410, ISBN 9780849320347.

HARDER, A. a kol. 1999. Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis. In *Electrophoresis*. ISSN 1522-2683, 1999, vol. 20, p. 826-829.

HERBERT, B.R. a kol. 1998. Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. In *Electrophoresis*. ISSN 1522-2683, 1998, vol. 19, p. 845-851.

KLOSE, J. – 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. In *Humangenetik*. ISSN 0018-7348, 1975, vol. 26, p. 231-234.

LINK, A.J. 2-D Proteome Analysis Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, sv. 112. Humana Press, Totowa 1999

MOLLOY, M.P. 2000. Two-dimensional electrophoresis on membrane proteins using immobilized pH gradients. In *Analytical Biochemistry*. ISSN 0003-2697, 2000, vol. 280, p. 1-10.

MOLLOY, M.P. a kol. 1998. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. In *Electrophoresis*. ISSN 1522-2683, 1998, vol. 19, p. 837-844.

O'FARELL, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. In *The Journal of biological chemistry*. ISSN 0021-0258, 1975, vol. 250, p. 4007-4021.

RABILLOUD, T. 1996. Solubilization of proteins for electrophoresis analyses. In *Electrophoresis*. ISSN 1522-2683, 1996, vol.17, p. 813-829.

RABILLOUD, T. 1997. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. In *Electrophoresis*. ISSN 1522-2683, 1997, vol. 18, p. 307-316.

RABILLOUD, T. 2000. Proteome Research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods. Springer, Berlin 2000. ISBN 3-540-65792-4.

RABILLOUD, T. a kol. 1994. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. In *Molecular Cell Biology*. ISSN 1471-0072, 1994, vol. 40, p. 57-75.

SANTONI, V. – MOLLOY, M. – RABILLOUD, T. 2000. Membrane proteins and proteomics. In *Electrophoresis*. ISSN 1522-2683, 2000, vol. 21, p. 1054-1070.

SIMPSON, R.J. 2001. Proteins and Proteomics: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab Press. ISBN 0879695544, p. 200.

Kvantifikácia pšeničných proteínov rozpustných v alkohole bezgélovou proteomikou s využitím MS^E prístupu

Lubica Uváčková*, Ľudovít Škultéty, Martin Hajduch

Ústav genetiky a biotechnológií rastlín, Akademická 2, SK-950 07 Nitra, Slovensko

Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

*nrgruva@pribina.savba.sk

Kľúčové slová

pšeničné zrnó, proteomika, bezgélová proteomika, MS^E, kvantifikácia, gliadíny, gluteníny

Úvod

Pšenica (*Triticum aestivum*) je najdôležitejšia obilnina pre produkciu pekárenských výrobkov. Unikátne vlastnosti pšeničnej múky závisia od proteínového zloženia pšeničného zrna. Ale na druhej strane sú pšeničné proteíny pôvodcami rôznych alergií a intolerancií. Na základe rozpustnosti môžeme pšeničné proteíny rozdeliť na štyri skupiny i) vo vode rozpustné albumíny, ii) v zriedených roztokoch solí rozpustné globulíny, iii) v alkohole rozpustné gliadíny a iv) v alkohole rozpustné proteíny v prítomnosti redukčného činidla – gluteníny.

MS^E spolu s (data dependent) MS/MS poskytujú spoľahlivú identifikáciu cytosolických ribozomálnych proteínov z modelovej rastliny arábkovky (*Arabidopsis thaliana*) (Hummel a kol. 2012).

Materiál a metódy

Gliadíny (Glia) a gluteníny (Glu) sme extrahovali dvojkrokovou metódou podľa Broeck a kol. (2009). Glia sme získali extrakciou zhomogenizovaných zŕn s 50% propanolom po 30 min kontinuálnom trepaní pri 1000 rpm a následnou 15 min centrifugáciou pri izbovej teplote (RT) pri 2500g. Supernatant sme odobrali. Zvyšok sme reextrahovali s 50% propanolom s 50 mM Tris-HCL (pH 7,5) obsahujúcim 1% DTT 30 min pri 60°C a následnou centrifugáciou pri 10000g 10 min pri RT a získali sme Glu frakciu.

Sto mikrolitrov z oboch frakcií sme redukovali s DTT (koncentrácia 10mM) a alkylovali s IAA (koncentrácia 40mM) v tme pri RT 45 min. Do roztokov proteínov sme pridali roztok trypsínu (Promega, Madison, WI, USA), premiešali a inkubovali 16-20 h pri 37°C (cez noc). Štiepiacu reakciu sme zastavili kyselinou mravčou (koncentrácia 5%). Zmes peptidov sme prečistili pomocou Peptide CleanUp C18 spin tubes (Agilent Technologies) podľa inštrukcií výrobcu a prečistené peptidy sme uskladnili v mrazničke pri -80°C.

Do každej vzorky sme pridali interný štandard - hovädzí hemoglobín (Waters 186002327, UK), 1 pmol na 5 ul nástreku. Vzorky sme analyzovali pomocou nanoAcquity ultravysokoúčinným kvapalinovým chromatografom (UPLC) spojeným s Q-TOF Premier hmotnostným spektrometrom (Waters, UK).

Na identifikáciu proteínov sme MS^E prístupom zberali dáta striedavo pri nízkej kolíznej energii (MS) a pri zvýšenej kolíznej energii (elevated energy, MS^E) (Plumb a kol. 2006; Li a kol. 2009). Kvantifikáciu proteínov vyjadrujeme emPAI indexom, ktorý je priamoúmerný obsahu proteínov v zmesi proteínov (Ishihama a kol. 2005).

MS^E dáta boli spracované pomocou ProteinLynx Global Server v. 2.4 (PLGS 2.4; Waters, UK). Každý súbor dát bol prehľadávaný oproti neredundantnej *Triticeae* UniProt databáze obsahujúcej 11764 záznamov a dodatočne dodanú sekvenciu interného štandardu hovädzieho hemoglobínu (Hemoglobin subunit alpha sequence, NCBI: P01966).

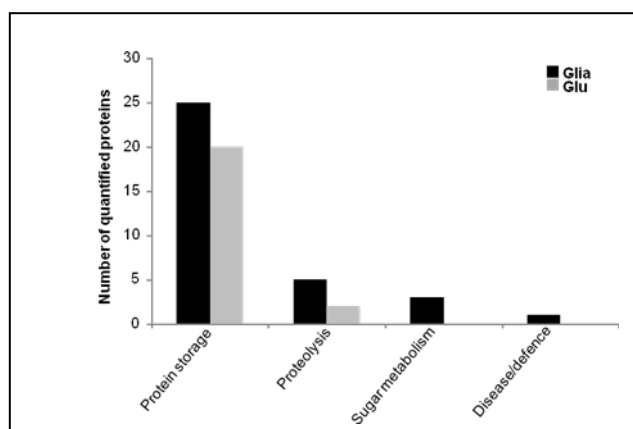
Výsledky a diskusia

Glia a Glu proteíny boli identifikované a kvantifikované minimálne v troch nezávislých vzorkách. Kvantifikovali sme 34 proteínov v Glia frakcii a 22 v Glu frakcii. Tieto proteíny sme zatriedili do funkčných skupín podľa klasifikácie Bevana a kol. (1998) (Obr. 1). Do skupiny Zásobné proteíny sme zatriedili 25 Glia a 20 Glu proteínov. Druhou najzastúpenejšou funkčnou skupinou bola Proteolýza. Taktiež sme v Glia extrakte kvantifikovali tri beta-amylyázy, ktoré majú funkciu v metabolizme cukrov a jeden 15kDa grain softness protein, ktorý má obrannú funkciu.

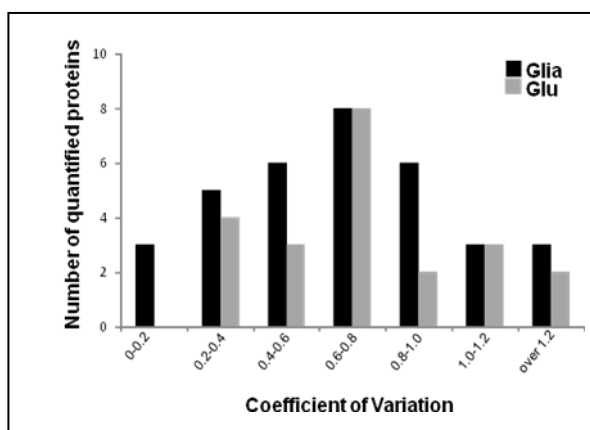
Pre každý proteín sme počítali koeficient variance (CV) na zistenie opakovateľnosti kvantifikácie v jednotlivých vzorkách. CV sa pohyboval v rozmedzí 0.12 až 1.39 (Obr. 2), čo naznačuje vyhovujúci stupeň reprodukovateľnosti pre komplexnú vzorku. Užšie rozmedzie CV dosiahli s MS^E kvantitatívnou proteomikou len Levin a kol. (0.1 - 0.3) (Levin a kol. 2011), ale len pre zmes 4 proteínov vo vzorke.

Hlavnou zložkou zásobných proteínov pšenice je glutén, zložený hlavne z glutamínu a prolínu (Shewry a kol. 1997). Glutén je hlavným spúšťačom celiakie (Shan a kol. 2002) pre citlivých jedincov. Hlavnou zložkou pšeničného gluténu, zodpovedného za celiakiu, sú gliadínové proteíny (Battais a kol. 2006; Pastorello a kol. 2007; Mittag a kol. 2004; Takizawa a kol. 2001; Armentia a kol. 2002). Najzastúpenejším proteínom v našich analýzach bol v Glia frakcii gama-gliadín s 12 kvantifikovanými sekvenciami.

Proteíny alfa-amylyázy/trypsín inhibítory sú spájané s respiračnou alergiou (Baker's asthma) na pšeničnú múku (Salcedo a kol 2011). Identifikovali sme nízku koncentráciu alfa-amylyase trypsin inhibitors v Glia a tiež v Glu frakcii.



Obr. 1 Zatriedenie proteínov z gliadínovej (Glia) a glutenínovej (Glu) frakcie do funkčných skupín podľa Bevana a kol. (1998).



Obr. 2 Koeficient variance (CV), pomer štandardnej odchýlky a priemeru medzi kvantifikáciami jednotlivých proteínov

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Výskum bol podporený firmou Syngenta.

Literatúra

- Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., et al. (1998). *Nature*, 391, 485–8.
- Hummel, M., Cordewener, J.H., de Groot, J.C., Smeekens, S., America, A.H., & Hanson, J. (2012). *Proteomics* 12, 1024-38.
- Van den Broeck, H.C., America, A.H., Smulders, M.J., Bosch, D., Hamer, R.J., Gilissen, L.J., & van der Meer, I.M. (2009). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 877, 975-82.
- Levin, Y., Hradetzky, E. & Bahn, S. (2011) *Proteomics*, 11:3273-3287.
- Shewry, P.R., Tatham, A.S. & Lazzeri, P. (1997). *J Sci Food Agric*, 73:397-406.
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M., & Khosla, C. (2002). *Science*, 297:2275-2279
- Battais, F., Richard, C., Szustakowski, G., Denery-Papini, S., Moneret-Vautrin, D.A., Leduc, V., & Guérin, L. (2006). *Allerg Immunol*, 38: 59-61.
- Pastorello, E.A., Farioli, L., Conti, A., Pravettoni, V., Bonomi, S., Iametti, S., Fortunato, D., Scibiliaa, J., Bindslev-Jensene, C., Ballmer-Weberf, B., & Robinoa, A.M. (2007). *Int Arch Allergy Immunol*, 144: 10-22.
- Mittag, D., Niggemann, B., Sander, I., Reese, I., Fiedler, E.M., Worm, M., Vieths, S., & Reese, G. (2004). *Mol Nutr Food Res*, 48: 380-9.
- Takizawa, T., Arakawa, H., Tokuyama, K., & Morikawa, A. (2001). *Int Arch Allergy Immunol*, 125: 51-56.
- Armentia, A., Rodriguez, R., Callejo, A., Martín-Esteban, M., Martín-Santos, J.-M., Salcedo, G., Pascual, C., Sánchez-Monge, R., & Pardo M. (2002). *Clin Exp Allergy*, 32: 1216-22.
- Salcedo, G., Quirce, S., & Diaz-Perales, A. (2011). *J Investig Allergol Clin Immunol.*, 21:81-92
- Plumb, R.S., Johnson, K.A., Rainville, P., Smith, B.W., Wilson, I.D., Castro-Perez, J.M., & Nicholson, J.K. (2006). *Rapid Commun.*, 20: 1989-1994.
- Li, G.Z., Vissers, J.P., Silva, J.C., Golick, D., Gorenstein, M.V., & Geromanos, S.J. (2009) *Proteomics*, 9:1696-1719.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., & Mann, M. (2005). *Mol. Cell. Proteomics* 2005, 4: 1265–1272.

Využitie dvojrozmernej elektroforézy pri porovnávaní proteínových máp pšeničného zrna rôznych odrôd

Soňa Fekečsová, Martin Hajduch

Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, Akademická 2, P.O. BOX 39A, 950 07 Nitra
sona.fekecsova@savba.sk

Kľúčové slová

Dvojrozmerná elektroforéza, proteomika, *Triticum aestivum* L.

Úvod

Proteíny pšeničného zrna predstavujú pomerne veľkú skupinu proteínov. Do popredia vedeckého ale i laického záujmu sa dostávajú hlavne v súvislosti s ochoreniami ako alergie alebo intolerancie. V súvislosti s týmito ochoreniami je často spomínaný lepok. Lepok (glutén) pozostáva najmä z proteínov nazývaných gliadíny a glutelíny, ktoré sú viazané na polysacharid škrob v endosperme zrna obilnín (Mamone a kol., 2011). Lepkové (gluténové) proteíny tvoria najväčšiu frakciu proteínov v zreých semenách a zohrávajú významnú úlohu na rozvoji ochorení súvisiacich s potravinovou intoleranciou. Hlavnú skupinu tvoria prolaminové frakcie pšeničných bielkovín nazývaných u pšenice gliadíny. Gliadíny sa nachádzajú v aleurónovej vrstve zrna a sú zastúpené predovšetkým vysokým obsahom aminokyselín glutamínu (36–45 %) a prolínu (14–30 %). Na detekciu jednotlivých pšeničných frakcií sa používajú rôzne elektroforetické, chromatografické a imunologické metódy. Avšak najviac používaná metóda na analýzu cereálnych bielkovín je elektroforéza (Hulín a kol., 2008).

Materiál a metódy

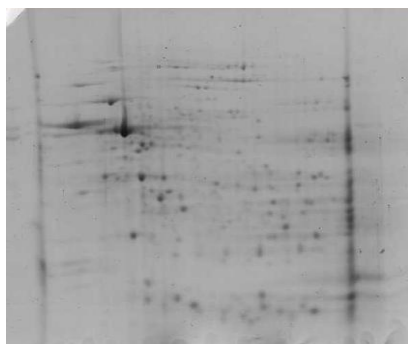
Proteínové frakcie boli extrahované z mechanicky homogenizovaných zreých semien pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) slovenskej odrody Venistar, Košútka a holandskej Ilias podľa Yan a kol. 2011 s menšími úpravami. 100mg semien z každej odrody bolo inkubovaných a mixovaných (550RPM) v 1000μl 25 mM roztoku fosforečnanu sodného pH 7.5 pri 4°C počas 60 minút. Následne centrifugované pri 20 800g 10minút 4°C. Supernatant s frakciou obsahujúcou albumíny bol odobratý do čistej skúmavky. Zvyšný pelet bol rozsuspendovaný a mixovaný (550RPM) 1000μl roztoku (0.1 M NaCl, 20mM DDT) pri 4°C 60 minút. Následne centrifugovaný pri 20 800g 10minút 4°C. Čím sme získali globulínovú frakciu pšeničných proteínov. Opätovne bol pelet rozsuspendovaný v 1000μl 50% propanolu a mixovaný pri 1000RPM pri 21°C 30minút. Po centrifugácii (20 800g 10 minút, 21°C) sme supernatant odobrali do čistej skúmavky a získali sme gliadínovú frakciu. Postup pre získanie gliadínovej frakcie sme zopakovali trikrát. Pre získanie glutenínovej frakcie sme zvyšný pelet rozsuspendovali roztokom (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1% DDT) mixovali pri 1000RPM pri 60°C počas 30minút, pričom každých 5minút sme mixovanie prerušili na dobu 30s. Následne sme vzorku centrifugovali pri 10 000g 10minút pri 21°C a supernatant preniesli do čistej skúmavky. Všetky odobraté frakcie boli zrážané 5násobným objemom octanu amónneho v metanole pri 4 °C cez noc. Na ďalší deň sme všetky získané frakcie premývali dvakrát v 0,1M octane amónnom v metanole, dvakrát v 80% acetóne a 70% etanole a určili sme koncentráciu proteínov vo vzorke. Následne sme proteíny separovali pomocou proteínovej 2 rozmernej elektroforézy, ktorá zahŕňa izoelektrickú fokusáciu (IEF) a separáciu proteínov v polyakrylovom géli v prítomnosti dodecylsírany sodného (SDS- PAGE). Proteíny sme vizualizovali po farbení s Coomassie Brilliant Blue.

Výsledky a diskusia

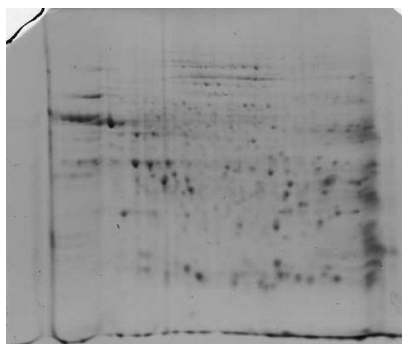
Po izoelektrickej fokusácii s pH rozhraním 5-8 sme získali proteínové mapy vyizolovaných proteínov zo semien pšenice (obr. 1). Proteínové mapy jednotlivých frakcií rôznych odrôd pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum* L.) boli porovnané, ale podrobnejšie výsledky budú známe až po analýze pomocou hmotnostnej spektrometrie a bioinformatických prístupov.

Albumínová frakcia

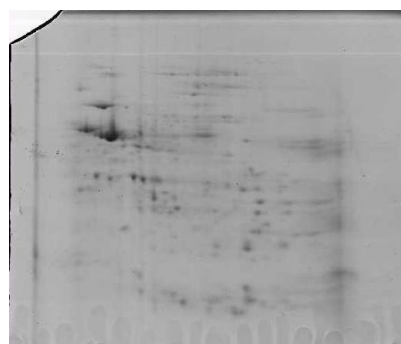
Venistar



Košútka

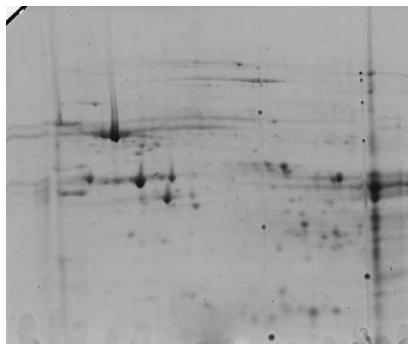


Ilias

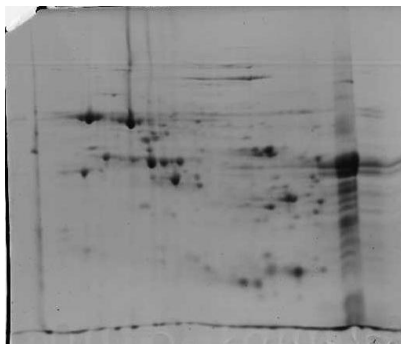


Globulínová frakcia

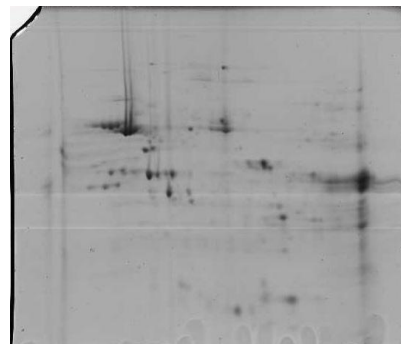
Venistar



Košútka

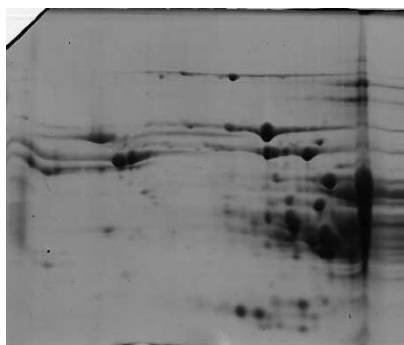


Ilias

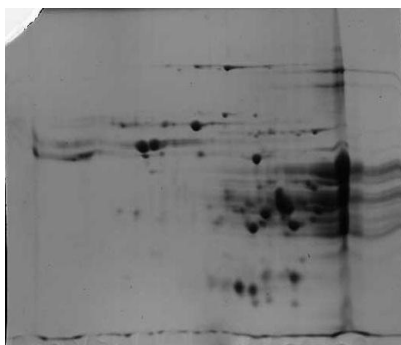


Gliadínová frakcia

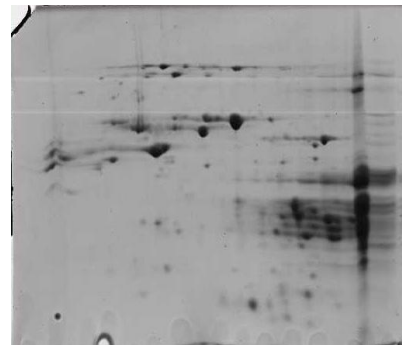
Venistar



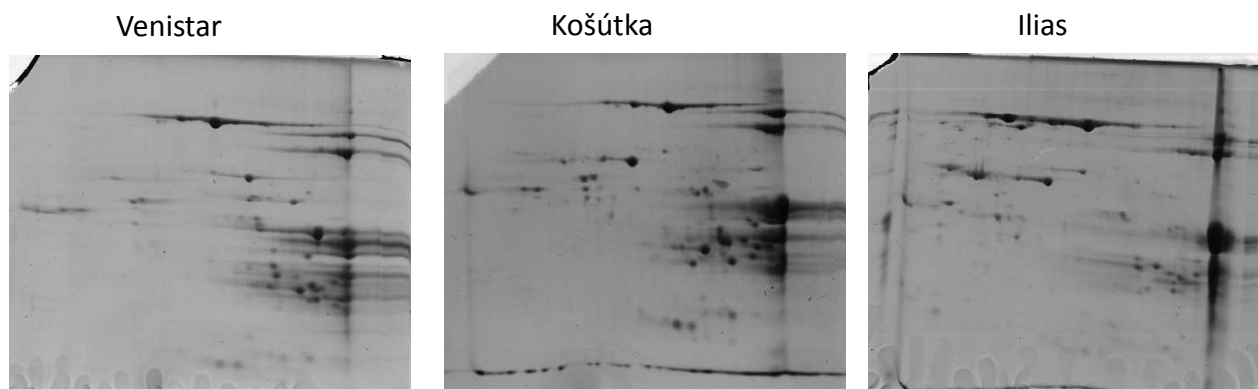
Košútka



Ilias



Glutenínová frakcia



Obr. 1: Dvojrozmerná mapa frakcií pšeničných proteínov pH 5-8

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

Mamone, G, Picariello, G, Addeo, F, Ferranti, P., (2011). *Expert Rev Proteomics*, 95-115.
Hulín, P., Dostálek, P., Hochem I. (2008). *Chem. listy*, 102, 327–337
Yang, F., Jørgensen, A., Li, H, Søndergaard, I., Finnie, Ch., Svensson, B., Jiang, D., Wollenweber, B., Jacobsen, S., (2011) *Proteomics*, 11, 1684-1695

AUREOBASIDIUM PULLULANS – A YEAST-LIKE MICROORGANISM WITH DIVERSE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL

Peter Biely (chempbsa@savba.sk), Mária Vršanská

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

Aureobasidium pullulans, known as black yeast, is a wide-spread yeast-like microorganism. Strains of this species are known to produce extracellular film-forming polysaccharide pullulan [1], have potential to be used as biocontrol agents against plant pathogens [2] and belong to excellent producers of β -fructofuranosidase that can be used for the production of prebiotic fructooligosaccharides [3,4]. Recently considerable attention received packaging materials based on pullulan films with incorporated antimicrobial agents [5].

The strains of *A. pullulans* have also the ability to utilize the major hardwood and softwood hemicelluloses, glucuronoxylan and galactoglucomannan. On selected strains it has been confirmed that the species produces enzyme systems required for complete hydrolysis of the mentioned polysaccharides [6,7]. The ability to utilize plant hemicelluloses as a carbon source is compatible with the deteriorating effect of *A. pullulans* on painted or unpainted wood, known as the black grow [8]. In eighties, *A. pullulans* was recognized as one of the best naturally occurring producers of cellulose-free endo- β -1,4-xylanase, an industrial enzyme used for pulp bleaching [1]. Studies of the regulation of the synthesis of the hemicellulolytic systems showed that the synthesis of most enzymes is under inducible type of control and repressed by glucose. Interesting, the genome of this important yeast still has not been sequenced [8], however, the task appears to be on the table (http://fungalignomics.ca/wiki/Fungal_Genomes).

[1] T.D. Leathers, Appl. Microbiol. Biotechnol. 62:468-473, 2003

[2] G.H. Fleet, Int. J. Food Microbiol. 86:11-22, 2003; M. Kordowska-Wiater, Postepy Mikrobiol. 50:107-119, 2011.

[3] J.W. Yun, Enzyme Microbiol. Technol. 19:107-117, 1996.

[4] Antošová M., Illeová V., Vandáková M., Družkovská A., Polakovič M. J. Biotechnol. 135:58-63, 2008.

[5] V. Trinetta, J.D. Flores, C.N. Cutter, J. Food Safety 30:366-381, 2010.

[6] J. Myburgh et al., J. Ferment. Technol. 72:135-137, 1991; K. Rumbold et al., AEM 69:5622-5626, 2003

[7] P. Biely, L. Kremnický, Food Technol. Biotechnol. 36:305-312, 1998

[8] M.S. Deshpande et al., Enzyme Microbiol. Technol. 14: 514-527, 1992

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for white-green biotechnology, ITMS 26220120054, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Vývin semien ľanu v remediovej oblasti v blízkosti Černobyľu

Katarína Klubíková, Maksym Danchenko, Ľudovít Škultéty, Namik Rashydov, Martin Hajduch

Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, P.O.Box 39 A, Akademická 2, 950 07 Nitra, Slovenská republika

Ústav bunkovej biológie a génového inžinierstva, 148 Acad. Zabolotnoho St., 03680, Kyjev, Ukrajina
Virologický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava, Slovenská republika

Kľúčové slová

rádioaktívne žiarenie, remediácia, proteomika, ľan, vývin semien,

Úvod

Od výbuchu jedného z reaktorov atómovej elektrárne v Černobyľe uplynulo už viac ako 20 rokov. Počas havárie bolo do prostredia uvoľnené veľké množstvo rádioaktívnych prvkov (Ansoagh a kol. 1988, Møller a Mousseau 1986). Takmer ihneď po havárii sa začalo s remediáciou kontaminovaných oblastí rôznymi spôsobmi: (a) dekontaminácia budov a ciest dekontaminačným roztokom; (b) aplikácia a následné odstránenie polymérneho filmu, ktorý absorbuje rádionuklidy; (c) utesnenie povrchov pomocou asfaltu; a (d) navezenie čistej pôdy do kontaminovanej oblasti. S postupom času dochádza aj k prirodzenej remediácii, a to postupným rozpadom rádioizotopov ale aj ich difúzií do hlbších vrstiev pôdy. Molekulárna charakterizácia vývinu rastlín v remediovej, pôvodne rádioaktívne kontaminovanej pôde umožňuje vytvárať predpoklady k využitiu týchto oblastí na poľnohospodárske účely v budúcnosti.

Materiál a metódy

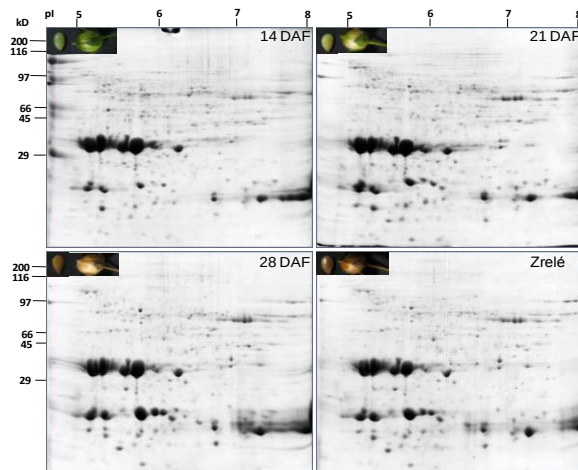
Rastliny ľanu úžitkového (*Linum ussitatissimum* L.) sme pestovali na dvoch lokalitách v blízkosti atómovej elektrárne v Černobyľe. Rádioaktívne kontaminovaná výskumná plocha sa nachádzala neďaleko dediny Chistogalovka (5 km od elektrárne). Kontrolná nekontaminovaná výskumná plocha sa nachádzala v blízkosti mesta Černobyľ (10 km). Zbierali sme semená ľanu 14, 21 a 28 dní po kvitnutí a tiež zrelé semená. Proteíny zo semien sme extrahovali fenolovou metódou podľa Hurkmana a Tanaku (1986), koncentráciu sme stanovili pomocou Bradfordovej metódy (1976) a analyzovali 2-rozmernou elektroforézou (O' Farrell, 1975) s použitím gélových prúžkov s imobilizovaným pH gradientom s rozsahom pH 5-8. Získané gély sme analyzovali pomocou softvéru ImageMaster Platinum 4.9. Proteínové škvrny sme vyrezali z gélu a štiepili trypsinom. Proteíny sme identifikovali metódami hmotnostnej spektrometrie a bioinformatiky. Na identifikovanie proteínov sme použili databázy proteínových sekvencií stiahnuté z UniProtu (databáza z januára 2010, ktorá obsahuje sekvencie z *Arabidopsis thaliana* a linaceae (53 302 sekvencií) a databáza Viridiplantae z januára 2010 (685 293 sekvencií)). Identifikované proteíny sme zatriedili do funkčných skupín podľa Bevana a kol. 1998 s modifikáciou podľa Miernyka a kol. (2011).

Výsledky a diskusia

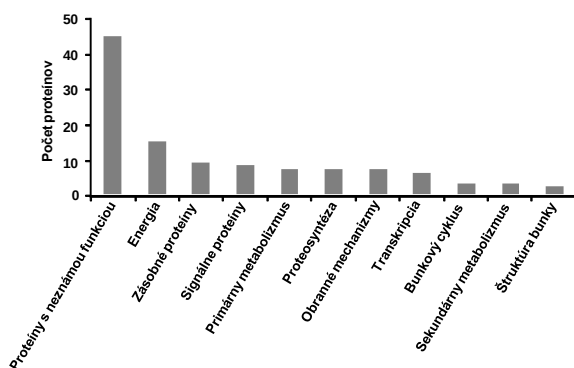
Proteíny extrahované zo semien sme analyzovali pomocou 2D-elektroforézy v troch biologických opakovaniach, kvantifikovali s použitím ImageMaster 4.9 softvéru (obr.1). Kvantifikovali sme 379 proteínových škvŕn v aspoň troch vývinových štádiách. Identifikované proteíny (102) sme zatriedili do 11 funkčných skupín (obr. 2) podľa Bevana a kol. (1998) s modifikáciou podľa Miernyka a kol. (2011).

Relatívny objem identifikovaných proteínov zoradených v spoločnej funkčnej skupine sme sčítali a vytvorili súhrnné grafy pre jednotlivé funkčné skupiny (Hajduch a kol. 2005).

Súhrnné grafy ukázali, že proteíny, ktoré sú zahrnuté pri energetickom metabolizme bunky, sa najviac akumulujú vo vývinovom štádiu 14 dní po kvitnutí a postupne sa ich množstvo znižuje. Podobné výsledky získali aj Hajduch a kol. (2006), ktorí sledovali proteóm vyvíjajúcich sa semenami repky a tiež Houston a kol. (2009), ktorí sledovali vývin semien ricínu obyčajného. Semená ľanu obsahujú 10 až 37% zásobných proteínov (Oomah a kol. 1993). V našej štúdii sme identifikovali len málo proteínových škvŕn patriacich so skupiny zásobných proteínov. Napriek tomu, že proteíny, ktoré zrejme patria medzi zásobné proteíny sú prítomné vo veľkom množstve. Tieto údaje naznačujú, že je potrebná detailnejšia charakterizácia zásobných proteínov ľanu, najmä linínu (Klubicová a kol. 2011).

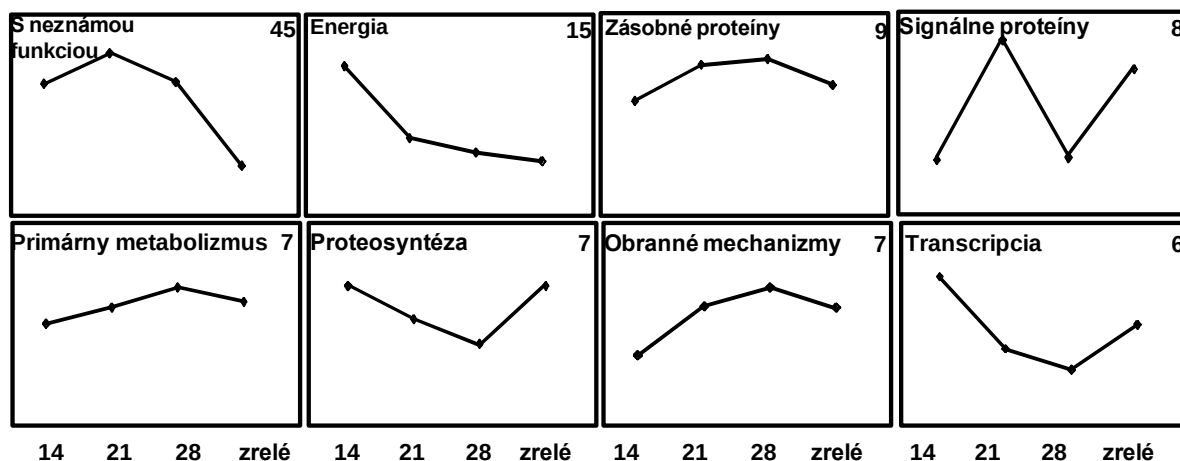


Obr.1 Proteomická analýza proteínov (500 µg) izolovaných z vyvíjajúcich sa semien (14, 21, 28 DAF) a zreých semien ľanu pestovaných v remediovej oblasti v blízkosti Černobyľu. Analýzu sme robili s použitím gélových prúžkov s imobilizovaným pH gradientom 5-8 a farbili pomocou koloidnej kumazínovej modrej.



Obr.2 Funkčné zatriedenie identifikovaných proteínov (102) podľa Bevana a kol. (1998) s modifikáciou podľa Mierny a kol. (2011).

Počet dní po kvitnutí



Obr. 3 Súhrnné expresné grafy pre proteíny zatriedené v jednotlivých funkčných skupinách. Sčítali sme relatívny objem jednotlivých proteínov v každej skupine v každom vývinovom štádiu (14, 21, 28 dní po kvitnutí a zrelé semená).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248–54.
- O' Farrell, P.H., (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250, 4007– 4021.
- Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., et al. (1998) Analysis of 19 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 391, 485–8.
- Miernyk, J.A., Preťová, A., Olmedilla, A., Klubicová, K., Obert, B. & Hajduch M. (2011) Using proteomics to study sexual reproduction in angiosperms. *Sex Plant Reprod.*, 24, 9–22.
- Ansoangh, L.R., Catlin, R.J., Goldman, M. (1988) The global impact of the Chernobyl reactor accident. *Science*, 240, 1512–9.
- Møller, A.P. & Mousseau, T.A. (2006) Biological consequences of Chernobyl: 20 years on. *Trends Ecol Evol*, 21, 200–7.
- Hurkman, W.J. & Tanaka, C.K. (1986) Solubilization of Plant Membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 81, 802-806.
- Hajduch, M., Ganapathy, A., Stein, J.W. & Thelen, J.J. (2005) A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiol*, 137, 1397–419.
- Hajduch, M., Casteel, J.E., Hurrelmeyer, K.E., Song, Z., Agrawal, G.K. & Thelen, J.J. (2006) Proteomic analysis of seed filling in *Brassica napus*. Developmental characterization of metabolic isozymes using high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol*, 141, 32–46.
- Houston, N.L., Hajduch, M. & Thelen, J.J. (2009) Quantitative proteomics of seed filling in castor: comparison with soybean and rapeseed reveals differences between photosynthetic and non-photosynthetic seed metabolism. *Plant Physiol*, 151, 857–68.
- Oomah, B.D. & Mazza, G. (1993) Flaxseed proteins—a review. *Food Chem*, 48, 109–14.
- Klubicová, K., Berčák, M., Danchenko, M., Skultety, L., Rashydov, N.M., Berezhna, V.V., Miernyk J.A. & Hajduch, M. (2011) Agricultural recovery of a formerly radioactive area: I. Establishment of

high-resolution quantitative protein map of mature flax seeds harvested from the remediated Chernobyl area. *Phytochemistry*, 72, 1308–15.

DIAGNOSTIKA VÍRUSOVÉHO FYTOPATOGENA OVOCNÝCH DREVÍN PRUNUS NECROTIC RINGSPOT VIRUS

DIAGNOSTIC OF VIRUS PHYTOPATHOGENS FRUIT TREES PRUNUS NECROTIC RINGSPOT VIRUS

Július Rozák¹, Zdenka Gálová^{2,3}

¹Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky, oddelenie všeobecnej a karanténnej diagnostiky, pracovisko Haniska pri Košiciach, Slovensko

²Katedra biochémie a biotechnológie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra

³Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo – zelenú biotechnológiu, Trieda A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra

Abstrakt: Cieľom práce bolo zistiť výskyt vírusového fytopatogéna *Prunus necrotic ringspot virus* vo vybraných lokalitách Slovenska a diagnostikovať ho pomocou molekulárnych a biologických metód. Analyzovaných bolo 40 vzoriek z ovocných stromov rodu *Prunus*, pričom 20 vzoriek bolo z intenzívnych výsadiieb a 20 vzoriek bolo odobratých z divorastúcich jedincov. Uskutočnená bola biologická diagnostika s použitím indikátora *Prunus serrulata* cv. *Schirofugen* a molekulárna diagnostika RT-PCR. Z testovaných vzoriek boli štyri infikované vírusom *Prunus necrotic ringspot virus*.

Kľúčové slová: *Prunus necrotic ringspot virus*, biologická diagnostika, molekulárna diagnostika, RT-PCR

Abstract: The aim of this study was to determine the incidence of viral phytopathogen *Prunus necrotic ringspot virus* in selected localities of Slovakia and diagnosed this phytopathogen with a molecular and biological methods. Were analyzed 40 samples of fruit trees of the genus *Prunus*, 20 samples were from intensive plantings and 20 samples were taken from wild subject. Biological diagnostic was made using the indicator *Prunus serrulata* cv. *Schirofugen* and molecular diagnostic RT-PCR. From tested samples were four samples infected with *Prunus necrotic ringspot virus*.

Keywords: *Prunus necrotic ringspot virus*, biology diagnostic, molecular diagnostic, RT-PCR

ÚVOD

Ovocinárstvo je dôležitou súčasťou poľnohospodárskej výroby. Najrozšírenejšie ovocné druhy ako slivka domáca, marhuľa obyčajná, broskyňa obyčajná, čerešňa vtáčia a višňa systematicky patria do rodu *Prunus*, pričom ich pestovanie má na Slovensku dlhú tradíciu a vďaka všestrannému využitiu plodov je ekonomicky veľmi atraktívne. Tieto ovocné dreviny sú napádané mnohými vírusovými chorobami.

Medzi najzávažnejšie vírusy napádajúce ovocné dreviny rodu *Prunus* patrí *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), ktorý spôsobuje ochorenie nazývané nekrotická krúžkovitosť čerešne. Systematicky sa zaraďuje medzi ilarvírusy čeľade *Bromovidae*. *Prunus necrotic ringspot virus* je prenosný pri vegetatívnom rozmnožovaní ovocných drevín a rôznymi vektormi, najčastejšie voškami. Pri čerešni, višni a mahalebke je častý prenos peľom a semenom, pričom šírením peľom môže vysoké percento semien obsahovať *Prunus necrotic ringspot virus* (Hluchý et al., 1997). Polák (2006) uvádza, že ochorenie postihuje najmä čerešne a višne, ale môže napadnúť aj broskyne, slivky a marhule.

Symptomatika infekcie vírusom PNRSV sa prejavuje svetlozelenými až jasnožltými ostro ohraničenými škvrnami krúžky, prúžkami a kresbami na čepeliach listov. Prúžky môžu lemovať hlavnú nervatúru listov a vytvárajú kresby v tvare dubového listu. V mnohých prípadoch sú príznaky pozorované len v prvom a druhom roku po infekcii a v ďalších rokoch sa strácajú až miznú. Németh (1986) uvádza, že v ovocných sadoch môže dôjsť k zníženiu úrody aj o viac ako 30 %.

Hlavným cieľom práce bolo optimalizovať metodiky molekulárnej a biologickej diagnostiky PNRSV a monitoring výskytu tohto vírusu v množiteľských porastoch vybraných ovocných škôlok a prirodzených lokalitách nachádzajúcich sa v oblastiach intenzívneho pestovania ovocných drevín. Najdôležitejším spôsobom boja proti vírusovým chorobám je pestovanie bezvírálneho rozmnožovacieho materiálu (očky, vrúbky, podpníky), ktorý sa používa vo výrobnom procese ovocných výpestkov. Prínosom diagnostiky je testovanie východiskového genetického zdroja, či už domáceho alebo importovaného zo zahraničia, ktorým sa zabezpečí dostatok bezvírálneho rozmnožovacieho materiálu pre pestovateľskú prax a eliminuje sa hlavný zdroj infekcie výpestkov z materských rastlín.

MATERIÁL A METÓDY

V roku 2012 bolo odobratých 40 vzoriek z ovocných druhov rodu *Prunus*, pričom 20 vzoriek bolo odobraných z ovocných škôlok a 20 vzoriek z divorastúcich ovocných stromov. V rámci biologickej diagnostiky boli vzorky očkované na jednorôčné výhony indikátora *Prunus serrulata* cv. *Schirofugen*, ktoré výrazne reagujú po inokulácii očkami získaných z infikovaných rastlín vírusom PNRSV. Z každej testovanej vzorky sa očkovalo 5 očiek. Indikátori boli pravidelne hodnotené a na základe symptomatiky boli vyhodnotené pozitívne vzorky. Vzorky boli následne pretestované molekulárnou diagnostikou pomocou protokolu RNzol: Total RNA Izolation Reagent (od firmy Ecoli s.r.o.), pomocou ktorého sa izolovala RNA z rastlinných pletív. Samotná PCR reakcia bola vykonaná podľa Metodiky molekulárnej detekcie vírusov kôstkovín pomocou RT-PCR a multiplex-RT-PCR (Jarošova, Polák, Kumar, 2008).

Izolácia RNA bola realizovaná z 50 mg pozitívnych vzoriek symptomatických listov, ku ktorým bol pridaný 1 ml trizolu a sterilnými mikropiestikmi boli listy homogenizované na ľade. Vzorky boli umiestnené do termobloku pri 30 °C po dobu 5 minút. Po uplynutí času bolo k vzorkám pridaných 200 µl chloroformu a následne boli vzorky premiešané, inkubované 3 minúty pri 30 °C v termobloku a odstredované po dobu 15 minút pri 4 °C a 12000 otáčok.min⁻¹. Zo supernatantu sa odpipetovalo 700 µl do nových mikroskúmaviiek, pridaný bol isopropylalkohol, roztok sa premiešal a vzorky boli inkubované v termobloku 1 minút pri teplote 30 °C. Následne boli vzorky odstredované 10 minút pri 4 °C a 12000 otáčkach.min⁻¹. Supernatant bol odpipetovaný a k sedimentu bolo pridaných 500 µl 70 % etanolu. Následne boli vzorky premiešané, odstredené a k sedimentu bolo pridaných 50 µl H₂O RNase free. V ďalšom kroku boli vzorky inkubované 10 minút pri 60 °C v termobloku. Z takto izolovanej RNA bolo napipetovaných 50 µl do premixu, 3 µl primerov a 12 µl DEPC vody. Následne boli vzorky umiestnené do termocyklera a nastavený program pre PCR. Podmienky samotnej PCR reakcie boli nasledovné: 45 °C po dobu 30 minút (reverzná transkripcia), 94 °C po dobu 5 minút (aktivácia HotStarTaq polymerázy), 40 cyklov v troch krokoch: 94 °C po 20 sekúnd (denaturácia), 51 °C po 30 sekúnd (hybridizácia) a 72 °C po dobu 1 minúty (polymerizácia), 72 °C po dobu 10 minút (záverečná fáza) a 12 °C uchovávanie. Vizualizácia PCR produktu prebiehala pomocou elektroforetického delenia fragmentov v 1,5 % agarózovom géli s označením DNA ethidiumbromidom. Pre detekciu veľkosti PCR produktov bol použitý 100 bp DNA dĺžkový marker.

Zoznam použitých primerov:

Primer	Sekvencia 5'-3'	T _m	Vírus
PNcpR	CTTTCCATTCGGAGAAATTCG	54 °C	PNRSV
PNcpinF	GAGTATTGACTTCACGACCAC	57 °C	PNRSV

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vírusy patria k najnebezpečnejším patogénom ovocných drevín, nakoľko proti nim neexistujú účinné chemické ochranné prostriedky na ich likvidáciu. Často sa vyskytujú v latentnej forme, t.j. napadnuté dreviny nevykazujú žiadnu symptomatiku. Takéto infikované jedince sa stávajú nebezpečným zdrojom vírusov vo výrobnom procese rozmnožovania ovocných drevín.

Hlavným významom diagnostiky je zachytiť infikované jedince v materských porastoch množiarň vrúbľov a podpníkov a po ich likvidácii eliminovať zdroje infekcií vírusmi. V neposlednom rade je dôležitý aj monitoring výskytu vírusov v okolí ovocných škôlok a intenzívnych výsadiieb, čím sa po likvidácii infikovaných jedincov zamedzí prenosu vírusu z divorastúcich ovocných druhov na tieto porasty.

V našej práci sme testovali 40 vzoriek ovocných drevín rodu *Prunus* odobraných z ovocných škôlok a voľnej prírody na prítomnosť PNRSV. Podľa vyššie uvedených postupov biologickej a molekulárnej diagnostiky sa podarilo identifikovať štyri vzorky infikované vírusom *Prunus necrotic ringspot virus*. Všetky štyri infikované vzorky boli odobrané z divorastúcich ovocných drevín rodu *Prunus*.

Molekulárnou analýzou použitím primerov PNcpR a PNcpinF boli pozitívne vzorky identifikované viditeľným pruhom o veľkosti 425 bp. Na diagnostiku PNRSV bola použitá pozitívna kontrola, pričom dĺžka PCR produktu sa zhodovala s infikovanými vzorkami. Kawasaki (1990) uvádza metódu RT-PCR ako veľmi senzitívnu pre detekciu vírusov drevín aj počas leta, kedy je vplyvom vysokých teplôt koncentrácia vírusov v drevinách nízka.

Na biologickú diagnostiku bol použitý indikátor *Prunus serrulata* cv. *Schirofugen*, pričom indikátori boli pravidelne kontrolované a bola sledovaná symptomatika vírusovej infekcie. Na základe symptomatiky boli určené aj biologickou diagnostikou štyri pozitívne vzorky. Výsledky biologickej a molekulárnej diagnostiky boli navzájom konfrontované. Na základe porovnania oboch diagnostických postupov boli stanovené pozitívne vzorky, ktoré boli odobrané z prirodzených lokalít. Vo vzorkách odobraných z ovocných škôlok nebola zistená prítomnosť analyzovaného vírusu. Polák (2006) uvádza, že najvýznamnejšími zdrojmi vírusov sú staré stromoradia sliviek, kry a stromy myrobalanu rastúce pozdĺž ciest a vo voľnej prírode.

Shors (2009) uvádza ako dôležitú ochranu pred infikovaním rastlinného materiálu v ovocných škôlkach alebo ovocných sadoch dodržiavanie izolačných vzdialeností od potenciálnych zdrojov nákazy. Je preto rozhodujúce likvidovať zdroje vírusových infekcií z okolia intenzívnych výsadiieb ovocných drevín.

ZÁVER

Cieľom práce bolo optimalizovať podmienky molekulárnej a biologickej diagnostiky vírusu *Prunus necrotic ringspot virus* a zmapovať jeho výskyt v sledovanej lokalite pestovania. Z výsledkov možno konštatovať, že ani jedna vzorka odobraná z ovocných škôlok alebo z intenzívnych výsadiieb nebola infikovaná týmto vírusom. Detegované však boli tri pozitívne vzorky z divorastúcich ovocných drevín rodu *Prunus* v lokalite obce Sedliská v okrese Vranov nad Topľou a jedna z okolia mesta Sabinov.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

- HLUCHÝ, Milan a kol. 1997. *Obrazový atlas chorôb a škodcu ovocných drevín a révy vinné*. 1. vyd. Brno : Biocont Laboratory, 1997. 428 s. ISBN 80-901874-2-1.
- JAROŠOVÁ, Jana – POLÁK, Jaroslav – KUMAR, Jiban. 2008. *Metodika molekulárnej detekcie viru peckovín pomoci RT-PCR a multiplex – RT-PCR*. 1. vyd. (CD). Praha : Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., 2008. 26 s. ISBN 978-80-87011-86-7.
- KAWASAKI, E.S. 1990. Amplification of RNA. In *PCR Protocols, a guide to methods and applications*, Innis, M.A., Gefland, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds). New York : Academic Press, s. 21-27.
- NÉMETH, Mária. 1986. *Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. 1. vyd. Budapest : Akadémiai Kiadó, 1986. 841 s. ISBN 963 05 4193 9.
- POLÁK, Jaroslav. 2006. Host and symptoms of Plum pox virus: woody species other than fruit and ornamental species of Prunus. In *EPPO Bulletin*, zväzok 36, č. 2. Paris : EPPO, 2006, s. 225-226.
- SHORS, Teti. 2009. Understanding viruses. [online]. B. m. : b. v., 2009 [cit. 2010-11-24]. 639 s. Dostupné na internete: <http://books.google.sk/books?id=VQeamKFwyvgC&printsec=frontcover&dq=Understanding+viruses&hl=sk&ei=qxwuTY6PO5D1sgaP2onuBw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCYQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>. ISBN 978-443-5000.

Kontaktná adresa:

Ing. Július Rozák, Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky, oddelenie všeobecnej a karanténnej diagnostiky, pracovisko Haniska pri Košiciach. Tel. 0907 249 952. E-mail: julius.rozak@gmail.com

Instantná káva z hl'adiska polysacharidov

Peter Capek^{a*}, Mária Matulová^a, Danica Mislovičová^a, Vlasta Sasinková^a, Luciano Navarini^b, Furio Suggi-Liverani^b

^a Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-94976 Nitra, Slovensko, *chemcape@savba.sk

^b Illycaffè s.p.a., Výskum & Inovácia, via Flavio 110, I-34147 Trieste, Taliansko

Kľúčové slová: Plody *Coffea arabica*, Instantná káva, Arabinogalaktán-proteín, DEAE-chromatografia, HPLC, FTIR, NMR

Úvod

Plody kávovníka sú využívané mnoho storočí na prípravu obľúbených nápojov kávy najmä kvôli stimulačnému účinku na organizmus a príjemnej vôni. Za stimulujúci efekt je zodpovedný alkaloid kofeín, ako návyková látka a karbohydráty dodávajú káve príjemnú arómu po pražení zelených plodov kávovníka. Bolo zistené, že polysacharidy ako celulóza, (galakto)manán resp. arabinogalaktán-proteínový komplex predstavujú asi 50-60% suchej hmotnosti zelených plodov (Wolf from a kol., 1961, 1964 a 1965). Pražením zelených plodov kávy sa získava jej charakteristická vôňa a chuť. Proces prípravy instantných káv však zahŕňa ďalšie stupne, ktoré výrazne ovplyvňujú obsah a štruktúrny charakter polysacharidov ako i chuť a vôňu finálnych produktov. Prvé zmienky o existencii polysacharidov a to (galakto)manánu a arabinogalaktánu v instantnej káve pochádzajú od Wolf froma and Andersona (1967), ktorí zistili veľmi nízky obsah arabinózy v arabinogalaktáne z instantnej kávy v porovnaní s arabinogalaktánom izolovaným zo zelených natívnych plodov. Detailná štruktúrna charakterizácia arabinogalaktánu z instantnej kávy plodov *Coffea arabica* poukázala, že pôvodný polymér majúci 500-1500 kDa sa v dôsledku drastických priemyselných postupov pri spracovaní zdegradoval až na molekulovú hmotnosť 5-6000 a jeho obsah v instantnej káve klesol až na 3% (Capek a kol., 2009, 2010 a 2011). Za účelom zistenia ďalších informácií o charaktere arabinogalaktán-proteínu i instantnej kávy, polysacharid bol podrobený ióno-výmennej chromatografii a jednotlivé izolované komponenty boli analyzované chemickými spektroskopickými metódami.

Materiál a metódy

Komerčná instantná káva na výskumné účely bola získaná od firmy Illycaffè s.p.a., Taliansko. Bola pripravená klasickým priemyselným postupom z plodov *C. arabica*, t.j. pražením pri vyššej teplote (200–220 °C), mletím na veľkosť asi 2.3 mm, následnou extrakciou vodnou parou (150–180 °C), koncentráciou za vákua (do 50 °C) a lyofilizáciou. Arabinogalaktán-proteín bol izolovaný z instantnej kávy podľa Wolf froma and Andersona (1967) s menšími modifikáciami (Capek a kol., 2009).

Vodné roztoky boli koncentrované za zníženého tlaku do 45 °C. Polysacharidy boli hydrolyzované 2 M TFA at 120 °C for 1 h. Kvantitatívne stanovenie monosacharidov bolo uskutočnené plynovou chromatografiou (Hewlett–Packard 5890 Series II) vo forme trifluoroacetátov. Obsah sacharidov sa stanovil podľa Dubois a kol. (1956). Dusík sa stanovil na prístroji FISON Instruments, model EA 1108. Obsah proteínov sa vypočítal z obsahu dusíka (%N x 6.25). Molekulová hmotnosť bola stanovená na HPLC prístroji Shimadzu s RID-6A a UV-vis detektormi na kolóne HEMA-BIO 40 (8 mm x 250 mm), použitím dextranových štandardov. Infráčervená spektroskopia (FT-IR) vzoriek sa merala na prístroji

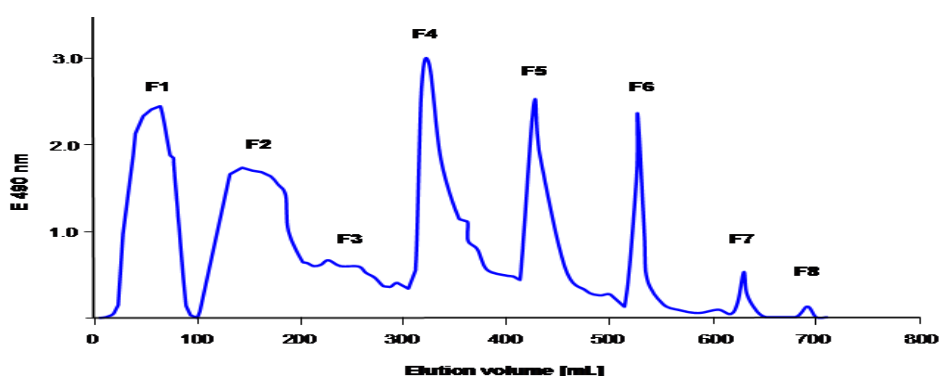
NICOLET 6700 spektrometer s DTGS detektorom a OMNIC 8.1 softvérom, 128 skénov bolo zaznamenané s rozlíšením 4 cm^{-1} . Vzorky boli merané metódou KBr tablietiek. NMR spektrá boli merané v D_2O pri 25°C na prístroji Bruker 300 MHz Avance DPX a Varian 600 MHz UNITY INOVA NB.

Izolácia arabinogalaktán-proteínu (AGP) bola uskutočnená podľa Wolfroma a Andersona (1967) s menšími modifikáciami (Capek a kol., 2009). Ióno-výmenná chromatografia arabinogalaktán-proteínu (AGP) sa uskutočnila na DEAE-Sepharose v chloridovej forme. Kolóna bola postupne eluovaná vodou a roztokmi 0.008 M, 0.016 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.25 M, 0.5 M a 1.0 M NaCl a nakoniec s 1 M roztokom NaOH. Frakcie (6 mL) boli zbierané a obsah karbohydrátov bol analyzovaný metódou fenol-kyselina sírová. Podľa elučného profilu (Obr. 1) bol polysacharid rozdelený na osem frakcií: **F1** (voda), **F2** (0.008 M), **F3** (0.016 M), **F4** (0.05 M), **F5** (0.1 M), **F6** (0.25 M), **F7** (0.5 M) a **F8** (1 M) NaCl. S 1 M roztokom NaOH už nebol eluovaný žiaden karbohydrátový materiál. Skúmvky jednotlivých frakcií boli spojené, dialyzované (MWCO 500) a lyofilizované.

Výsledky a diskusia

V predchádzajúcich našich prácach bola opísaná izolácia a štrukturálna charakterizácia arabinogalaktán-proteínu (AGP) z komerčnej instantnej kávy. AGP sa získal vo výťažku 3% na hmotnosť práškovej instantnej kávy, obsahoval asi 2% proteínov a jeho molekulová hmotnosť bola medzi 5-6000. Bol zložený z galaktózy (85%) a arabinózy (8.2%), s nízkym obsahom ďalších sacharidov ako sú manóza, glukóza, xylóza a rhamnóza. Jeho hlavný reťazec pozostával z β -(1,3)-viazaných jednotiek galaktózy, pričom niektoré z nich boli vetvené v polohe O-6 krátkymi bočnými reťazcami zloženými z arabinózy a galaktózy (Capek a kol., 2009, 2010 a 2011). Káva, ako obľúbený každodenný nápoj, obsahuje stovky rôznych prírodných látok, z ktorých mnohé ešte nie sú identifikované a ďalšie sú len čiastočne charakterizované.

Za účelom zistenia informácií o povahe arabinogalactan-proteínu (AGP) v komerčnej instantnej káve z hľadiska homogenity, bol frakcionovaný ióno-výmennou chromatografiou na osem frakcií (F1–F8) postupnou elúciou vodou a roztokmi NaCl so zvyšujúcou sa iónovou silou (obr. 1).



Obr. 1. DEAE-chromatografia AGP.

Monosacharidové zloženie, výťažok, obsah proteínov resp. molekulová hmotnosť jednotlivých frakcií je uvedené v Tab 1. Z nej je evidentné, že všetky frakcie obsahovali sacharidy a proteíny, čo nasvedčuje, že všetky komponenty AGP sú glykokonjugáty líšiace sa okrem molekulovej hmotnosti aj vzájomným pomerom sacharidov a proteínov.

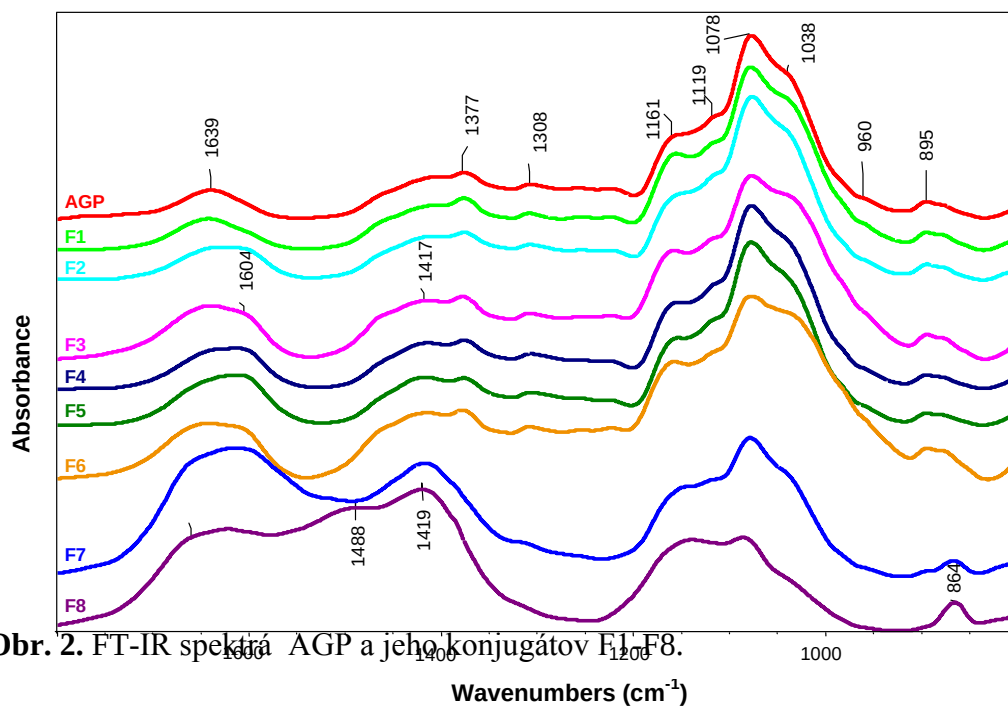
Tab. 1. Charakteristiky F1-F8 frakcií získaných ióno-výmenneou chromatografiou AGP.

Frakcia	Eluent	Výťažok (wt %)	Obsah proteínov (wt %)	Monosacharidy (wt %)						
				Ara	Gal	Xyl	Rha	Glc	Man	M _p
AGP		100.0	1.6	8.4	87.4	^a	^a	1.4	2.8	5400
F1	H ₂ O	20.8	0.9	6.4	85.3	2.1	1.4	2.0	2.9	4600
F2	0.008 M NaCl	12.8	1.3	6.0	85.4	1.4	0.7	2.5	4.1	2700
F3	0.016 M NaCl	7.6	4.9	7.5	88.0	1.0	1.2	0.9	1.5	6600
F4	0.05 M NaCl	17.5	5.8	7.4	89.5	0.5	0.9	0.4	1.3	4200
F5	0.1 M NaCl	12.1	8.6	9.9	90.1	^b	^b	^b	^b	6600
F6	0.25 M NaCl	6.2	15.8	11.9	83.3	0.5	1.0	2.0	1.3	5100
F7	0.5 M NaCl	3.0	18.2	10.3	76.2	1.1	2.1	1.6	9.1	6000
F8	1 M NaCl	1.6	^c	13.1	78.2	2.1	2.0	3.5	7.3	5600

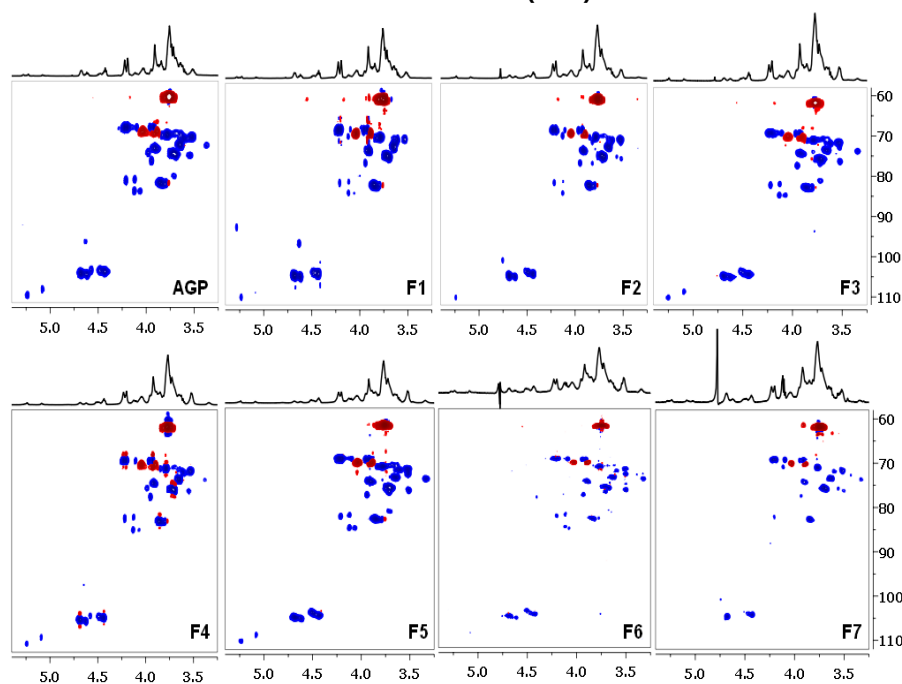
^a Stopy, ^b Nezistené, ^c Neboli analyzované pre nízky výťažok

FT-IR spektrá AGP a jeho DEAE frakcií F1-F8 sú prezentované na obr. 2 v oblasti 1800-800 cm⁻¹, v ktorej sa nachádzajú najcharakteristickejšie vibračné pásy pre polysacharidy. Ako je vidieť z obr. 2, spektrá AGP a konjugáty F1-F6 vykazujú podobné spektrálne profily, líšia sa však len v intenzite pásov v oblasti 1700-1600 cm⁻¹. Intenzita pásov v oblasti 1660-1640 cm⁻¹ sa zvyšuje od F1 po F6 konjugát v dôsledku prítomnosti proteínov, ktoré indikujú vibrácie karbonylovej skupiny $\nu(\text{C=O})$ peptidických väzieb, ktoré sú označované ako Amid I. Vibračné pásy $\delta(\text{N-H})$ vibrácií peptidickej väzby (okolo 1560 cm⁻¹), označované ako Amid II, sú v spektrách prekryté. V tejto oblasti sa nachádzajú aj deformačné vibrácie vody, ktorej pás je okolo 1645 cm⁻¹, ale ten je relatívne malý a je pre každú vzorku rovnaký, nakoľko sa jedná o lyofilizáty. Intenzívne pásy v oblasti 1000-1200 cm⁻¹ v AGP a jeho konjugátoch F1-F6 sú charakteristické pre 3,6-arabinogalaktán. FT-IR spektrá DEAE frakcií F7 a F8 sa výrazne líšili od AGP a F1-F6 konjugátov. Zo spektier je evidentné, že majú vyššie obsahy proteínov ako pôvodný AGP a frakcie F1-F6, čo dokazujú intenzívne pásy v oblasti 1660-1640 cm⁻¹, ktoré sú charakteristické pre vibrácie $\nu(\text{C=O})$ pochádzajúce z peptidickej väzby proteínov.

HSQC spektrá AGP a jeho DEAE-frakcií F1-F7 sú na obr. 3. Analýza NMR spektier ukázala len malé rozdiely v ich spektrách, ktoré nasvedčujú na rozdielny stupeň substitúcie bočných reťazcov v jednotlivých DEAE-frakciách. Z HSQC spektier sa nezistil efekt vyššieho obsahu proteínov na chemické posuny karbohydrátov v konjugátoch.



Obr. 2. FT-IR spektrá AGP a jeho konjugátov F1-F8.



Obr. 3. HSQC spektrá AGP a jeho konjugátov F1-F7.

Výsledky chemických a spektroskopických analýz F1-F8 frakcií poukázali na nové informácie o povahe AGP v instantnej káve. Zistilo sa, že AGP predstavuje komplex glykokonjugátov rôznej molekulovej hmotnosti, rozdielného obsahu proteínov a karbohydrátov, pričom boli zistené aj rozdiely v monosacharidovom zložení jednotlivých konjugátov.

Pod'akovanie

Práca vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Wolf from, M. L., Laver, M. L., Patin, D. L. (1961). *J. Organic Chem.* 26, 4533–4535.
- Wolf from, M. L., Patin, D. L. (1964). *J. Agricul. Food Chem.* 12, 376–377.
- Wolf from, M. L., Patin D. L. (1965). *J. Agricul. Food Chem.* 30, 4060–4063.
- Wolf from, M.L., Anderson, L.E. (1967). *J. Agric. Food Chem.* 15, 685–687.
- Capek, P., Matulova, M., Navarini, L., S.-Liverani, F. (2009). *J. Food Nutr. Res.* 48, 80–86.
- Capek, P., Matulova, M., Navarini, L., S.-Liverani, F. (2010). *Carbohydr. Polym.* 80, 180–185.
- Matulová, M., Capek, P., Kaneko, S., Navarini, L., S.-Liverani, F. (2011). *Carb. Res.* 346, 1029–1036.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). *Anal. Chem.* 28, 350–356.

Porovnanie výskytu PAU v tuhej a plynnej fáze

Marián Schwarz

Fakulta ekológie a environmentalistiky, Technická univerzita vo Zvolene, T. G. Masaryka 24, SK-96053 Zvolen, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

schwarz@vsld.tuzvo.sk

Kľúčové slová

PAU, tuhá a kvapalná fáza, personálny odber

Úvod

V ovzduší sa PAU môžu vyskytovať súbežne vo forme dymov a pár, teda ako v plynnom, tak aj v tuhom skupenstve, pretože patria do skupiny poloprchavých organických látok (SVOC = Semi Volatile Organic Compounds). Majoritný podiel PAU je sorbovaný na povrchu tuhých častíc, ktoré môžu byť podľa dĺžky zotrvania v atmosfére fotochemicky v priebehu niekoľkých týždňov degradované za vzniku rôzne reaktívnych a teda aj rôzne toxických produktov, z ktorých mnohé sú karcinogénne a mutagénne (Boffetta, et al., 1997; Satcher, et al., 1995).

Do organizmu sa PAU dostávajú najmä inhaláciou kontaminovaného vzduchu počas výroby (profesionálne expozície), cez gastrointestinálny trakt (pitná voda, konzumácia predovšetkým tepelne spracovanej potravy – pečením, pražením, grilovaním, údením atď.) a čiastočne aj cez kožu (hlavne pri práci – asfaltári, kominári). Pri hodnotení celkovej expozície PAU z pracovného prostredia (suma PAU) je nutné sledovať aj mimopracovné expozície (napr. formou dotazníka) u respondentov, teda stravovacie zvyklosti a spôsob života (fajčenie, pitie kávy, konzumácia potravy s nevhodným tepelným spracovaním a pod.).

Ako zástupca celej skupiny PAU, ktorý vykazuje najvýznamnejšie karcinogénne účinky a slúži ako marker, bol zvolený benzo[a]pyrén. Typické hodnoty benzo[a]pyrénu v prevádzkach tohto typu sa pohybujú v rozmedzí 1-10 mg.m⁻³, pričom pri profesionálnej expozícii boli zistené u vystavených pracovníkov 10 až 1000 násobne vyššie hodnoty v porovnaní s neexponovanou kontrolnou vzorkou (Grainger, et al., 2004). Je zrejmé, že pri riešení environmentálnych problémov v súvislosti s expozíciou PAU, sa budú v budúcnosti podieľať aj výsledky moderných tzv. zelených biotechnológií, kde cieľným výskumom nových rastlinných druhov alebo mikroorganizmov možno získať účinné biosorbenty, ktoré sa môžu spolupodieľať na sanácii znečisteného prostredia.

Materiál a metódy

Odber vzoriek ovzdušia v pracovnom ovzduší za účelom zachytenia PAU v plynnej a tuhej fáze bol uskutočnený štandardnou odberovou aparátúrou na PTFE filtri s priemerom pórov 2 µm a na adsorbente XAD-2 (trubička firmy SKC 226-30-04) v sériovom zapojení prietokovou rýchlosťou 2,0 l.min⁻¹ podľa metódy NIOSH 5506 a STN ISO 11338-2, kde sú uvedené aj podmienky extrakcie vzorky, gradientovej elúcie a vlnové dĺžky pre detekciu na fluorescenčnom detektore a detektore diódového poľa.

Bolo sledovaných 16 reprezentantov tejto kategórie látok (zmesný štandard Supelco QTM test mixture: naftalén (Naf), acenaftylén (ACN), fluorén (Flu), fenantrén (Fen), antracén (Ant), fluorantén (Fln), pyrén (Pyr), benzo[a]antracén (BaA), chryzén (Chr), benzo[a]pyrén

(BaP), benzo[b]fluorantén (BbF), benzo[k]fluorantén (BkF), dibenzo[a,h]antracén (DaA), benzo-[g,h,i]perylén (BP), indeno[1,2,3-c,d]pyrén (IP)).

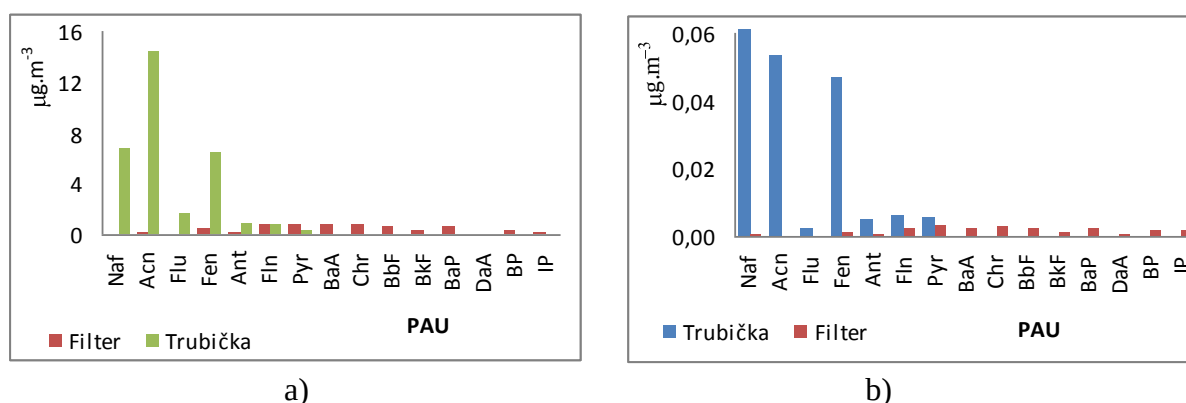
Po prepočte odobraného objemu vzorky na štandardné podmienky boli získané výsledky vyhodnocované zvlášť pre trubičku a zvlášť pre filter. Limit detekcie (LOD) a kvantifikácie (LOQ) prepočítaný na benzo(a)pyrén pre použitú metódu a zistený objem vzorky pri štandardných podmienkach je platný pre všetky PAU: LOD = 0,0035 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ a LOQ = 0,011 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$.

Vzorky pracovného ovzdušia boli odoberané vo viacerých prevádzkach podnikov s expozíciou pracovníkov PAU ako aktívnym stacionárnym, tak aj personálnym odberom po dobu najmenej 360 min a vzorky voľného ovzdušia boli odoberané stacionárnym odberom po dobu 24 hod vo viacerých mestách na Slovensku v letnom aj zimnom období (Banská Bystrica, Zvolen, Žiar nad Hronom).

Výsledky a diskusia

Z nameraných hodnôt PAU ako v pracovnom, tak aj vo voľnom ovzduší vyplýva, že prevládajúci podiel z ich celkového množstva bol zachytený na trubičke (56-94%), na ktorej sa zachytávajú predovšetkým PAU v plynnom skupenstve. Zvyšná časť PAU absorbovaných na tuhých časticiach sa zachytávala na filtri a vo všetkých prípadoch predstavovala iba minoritný podiel (6-44%). Keďže filter v odberovej aparátúre je predradený pred trubičkou, možno konštatovať, že majoritná časť PAU v ovzduší sa vyskytuje v plynnom skupenstve. Vyplýva to aj zo zastúpenia prchavejších PAU v celkovej zmesi, ktoré je dokumentované na obr. 1., kde je znázornené zastúpenie jednotlivých PAU v pracovnom ovzduší (obr. 1a) a vo voľnom ovzduší (obr. 1b) zachytených ako v plynnom skupenstve (trubička), tak aj v tuhom skupenstve (filter).

V pracovnom prostredí sa koncentrácie sumy PAU na jednotlivých odberových miestach menili najmä v závislosti od zdroja PAU a vnútorných mikroklimatických podmienok (účinnosť odsávania a rýchlosť prúdenia vzduchu) a dosahovali priemerné hodnoty 1,3-71,2 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. Vo voľnom ovzduší boli priemerné hodnoty nižšie až o 3 poriadky v porovnaní s pracovným prostredím a pohybovali sa v intervale 0,17-1,31 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$.



Obr 1: Porovnanie PAU zachytených v plynnej (trubička) a tuhej fáze (filter) a) v pracovnom prostredí; b) vo voľnom ovzduší

Aj keď je zastúpenie jednotlivých PAU medzi odberovými miestami premenlivé, vo všetkých prípadoch prevláda v plynnej fáze v pracovnom prostredí prvých päť ukazovateľov (naftalén, acenaftylén, fluorén, fenantrén a antracén) a vo voľnom ovzduší aj fluorantén a pyrén. Zo stúpajúcou molekulovou hmotnosťou klesá výskyt prchavejších PAU a od benzo[a]antracénu sa vyskytujú takmer výhradne iba v tuhom skupenstve, pričom podiel týchto nízkoпрchavých PAU je v zmesi menší ako 12,5 % , čo je v súhlase aj s literárnymi údajmi

(Back, et al. 1992). Koncentrácie samotného benzo[a]pyrénu neprekročili v pracovnom prostredí technickú smernú hodnotu ani v jednom prípade a pohybujú sa v rozmedzí od 0,02 do 1,81 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$.

Záver

V práci sú diskutované výskyt a pôsobenie PAU v tuhej a plynnej fáze v pracovnom a životnom prostredí, pričom bolo zistené, že v oboch prípadoch je majoritný podiel PAU zachytený v plynnej fáze najmä u ľahších PAU (Naf, Acn, Flu, Fen a Ant), zatiaľčo u vyšších PAU (od pyrénu vyššie) prevládal záchyt tuhej fázy na filter. Nižšie zastúpenie menej prchavých PAU viazaných na tuhé častice môže byť dôsledkom účinného odsávania a z toho vyplývajúcej nižšej prašnosti na pracovisku. Uvedené výsledky dokumentujú skutočnosť, že odber vzoriek ovzdušia pre stanovenie PAU nemôže byť zameraný iba na záchyt prachových častíc, pre ktoré sa predpokladá, že práve na ne je naadsorbovaná prevažná časť PAU, ale súčasťou odberu musí byť aj paralelný záchyt plynnej fázy PAU na trubičku, ktorá je zapojená v odberovej aparátúre v sérii s filtrom.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Back, S. O., Goldstone, M. E., Kirk, P. W., Lester, J. N., Perry, R.: Concentrations of particulate and gaseous polycyclic aromatic hydrocarbons in London air following a reduction in the lead content of petrol in the United Kingdom. *Sci Total Environ.* 1992 Jan 15;111(2-3):169-99.
- Boffetta, P., Jourenkova, N., Gustavsson, P.: Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes and Control*, 8, pp. 444-472 (1997).
- Grainger, J., Huang, W., Li, Z., Selvin, E., Walcott, C., Smith, C., Turner, W. E., Wang, R., Patterson, D. G. Jr.: PAH reference range levels in the U.S. population by measurement of urinary monohydroxy metabolites. *Polycyclic Aromatic Comp.*, 24, pp. 385–404 (2004).
- Satcher, D. (Administrator) (1995): Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1995.

Vplyv troposférického ozónu na hladinu celkového cholesterolu v krvi

Marián Schwarz¹, Juraj Miššík²

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

¹ *Fakulta ekológie a environmentalistiky, Technická univerzita vo Zvolene, T. G. Masaryka 24, SK-96053 Zvolen, Slovensko schwarz@vsld.tuzvo.sk*

² *Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, SK-94976 Nitra, Slovensko*

Kľúčové slová

Troposférický ozón, HDL/LDL cholesterol

Úvod

Ozón patrí medzi najvýznamnejšie skleníkové plyny v troposfére a rast jeho koncentrácie významne prispieva k zintenzívňovaniu skleníkového efektu. Vďaka vysokej reaktivite ozónu, ktorá nachádza svoj odraz aj v jeho toxikologických vlastnostiach, patrí podľa letálnych dávok k najtoxickjším plynom vôbec. Jeho škodlivý účinok sa prejavuje prakticky vo všetkých ekosystémoch (mikroorganizmy, rastlinstvo, živočíšstvo, materiály). Paradoxom súčasnosti je skutočnosť, že ochranného ozónu v stratosfére ubúda a koncentrácie škodlivého ozónu sa v prízemných vrstvách zvyšujú. Preto je nevyhnutné, aby sa na tento problém sústredila pozornosť nielen v rámci ekologických vied, ktoré skúmajú vzťahy medzi organizmami v ich životnom prostredí, ale aj v moderných, predovšetkým tzv. zelených biotechnológiách, ktoré cieľovým výskumom nových rastlinných druhov výrazne prispievajú k zlepšeniu kvality života obyvateľov Zeme.

Zvýšené hladiny cholesterolu (CHL) zvyšujú riziko srdcovo-cievnych ochorení (srdcový infarkt, mozgová porážka a i.). Štatistika príčin úmrtí na Slovensku potvrdzuje že ochorenia srdcovo-cievneho systému sú v rebríčku úmrtí na najvyššej priečke (Zdravotnícka ročenka SR, 2006). Na druhej strane bolo zistené, že ozón v terapeutických dávkach môže hladiny CHL znižovať. V predkladanom príspevku sme sa pokúsili korelovať hladiny celkového cholesterolu ako rizikovej látky so zistenými koncentraciami prízemného ozónu.

Materiál a metódy

Odbery biologických vzoriek a vyšetrenia boli vykonávané na analyzátore Reflotron® Plus (INTES Slovakia). Počítačom riadený prístroj požíva málo invazívnu metódu vyšetrenia z kvapky kapilárnej krvi odobratej z prsta pacienta. Kontrola kvality výsledkov získaných na Reflotrone bola opakovane overená paralelným vyšetrením tých istých ukazovateľov použitím štandardnej laboratórnej metodiky na oddelení klinickej biochémie. Pacienti boli vyšetrení nalačno a od popoludnia dňa predchádzajúceho vyšetreniu vylúčili zo stravy jedlá a nápoje s obsahom cukru.

Súbor pacientov bol vyšetrený podľa metodiky ČMS Záťaž obyvateľstva faktormi prostredia: z celkového počtu 25 393 obyvateľov okresu Žiar nad Hronom (čo predstavuje 12 363 mužov a 13 030 žien) bolo vybraných 79 probandov z určených 5 obcí Žiarskej kotliny. Ženská populácia pozostávala zo 7 dievčat vo veku 10 – 14 rokov, 10 dievčat vo veku 15 – 19 rokov a 21 žien vo veku 40 – 50 rokov. Mužská populácia pozostávala z 9 chlapcov vo veku 10 – 14 rokov, 13 chlapcov vo veku 15 – 19 rokov a 19 mužov vo veku 40 – 50 rokov (Turčanová, 1998).

Kritériami výberu probandov boli vek, pohlavie, minimálne 5 ročný nepretržitý pobyt v sledovanej oblasti pred dňom vyšetrenia, absencia priameho príbuzenského vzťahu a spoločnej

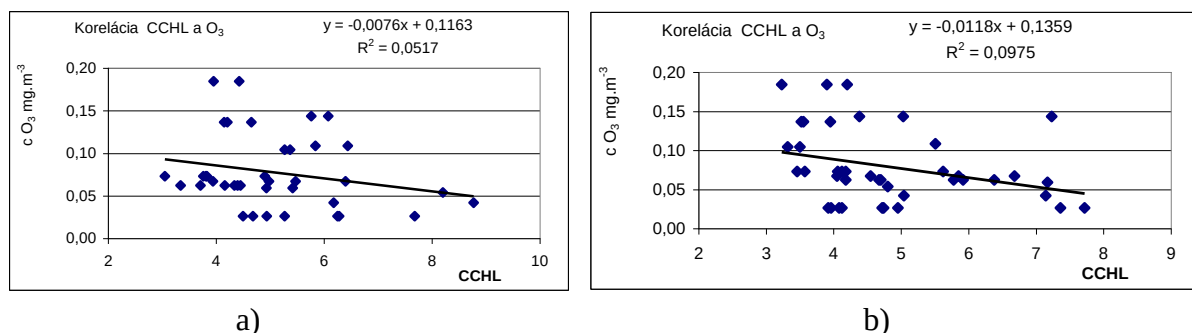
domácnosti probandov a dobrovoľná účasť na vyšetrení. Osoby žijúce v jednej domácnosti s vyšetrovanou osobou boli vylúčené preto, že u nich možno predpokladať zhodu, resp. veľkú podobnosť v stravovacích návykoch a životnom štýle, u príbuzných zasa genetickú determináciu prípadných zistených odchýliek, ochorení alebo somatických defektov. Ich zaradenie do súboru by mohlo skresliť výsledky analýzy sledovaných závislostí.

Výsledky a diskusia

V Slovenskej republike je úmrtnosť na kardiovaskulárne ochorenia dlhodobo najvyššia v porovnaní s krajinami strednej Európy (Ginter, E, 1998). Medzi včasnou úmrtnosťou na kardiovaskulárne choroby a strednou dĺžkou života existuje tesná nepriama korelácia v európskych krajinách (Hrnčiar, J. 1991). Vplyv ozónu na hladiny cholesterolu (ale aj iné biochemické ukazovatele) je známy z literatúry (Hernández, et al., 1995) a používa sa dokonca k terapeutickým účelom. Preto bola sledovaná ich korelácia s 24-hodinovými priemernými ozónovými koncentráciami zodpovedajúcimi dňu, ktorý predchádzal dňu odberu.

Z celkového počtu 79 probandov prekračuje fyziologické hodnoty celkového cholesterolu 35,44 %. Grafy závislosti hodnôt celkového cholesterolu (CCHL) od zodpovedajúcich priemerných 24-hodinových koncentrácií prízemného ozónu sú uvedené na obr. 1 (u ženského pohlavia obr. 1a) a u mužského pohlavia obr. 1b)).

Z vypočítaných korelácií bol zistený trend závislosti so zápornou smernicou regresnej priamky, čo znamená, že so zvyšujúcimi sa koncentráciami ozónu sa koncentrácie celkového cholesterolu znižujú, aj keď treba poznamenať, že koeficienty determinácie majú hodnoty nižšie ako 0,1 a štatistická významnosť uskutočnených korelácií je nízka. Predmetom ďalšieho štúdia sú korelácie s ďalšími biochemickými ukazovateľmi, ako sú triacylglyceridy, HDL a LDL cholesterol, rizikové indexy I, (index aterosklerózy LDL/HDL), r_1 (pomer CCHL/HDL) a r_2 (pomer TG/HDL). Najvyšší korelačný koeficient bol zaznamenaný pri závislosti s celkovým cholesterolom u mužov, pričom u mužov vo všeobecnosti boli pozorované omnoho silnejšie korelácie ako u žien, čo je v súhlase s literárnymi údajmi (Stewart C.R a kol, 2007).



Obr. 1 Graf závislosti hodnôt CCHL od priemerných 24-hodinových koncentrácií prízemného ozónu a) ženské pohlavie, b) mužské pohlavie

Záver

U obyvateľstva Žiarskej kotliny boli v rámci monitorovacieho systému záťaž obyvateľstva faktormi prostredia sledované prevalenčné charakteristiky výskytu kardiovaskulárnych ochorení. Hodnoty celkového cholesterolu (CCHL) stanovené v kapilárnej krvi 79 vyšetrených osôb boli korelované s 24-hodinovými priemernými koncentráciami ozónu v uvedenej oblasti. Vo všetkých prípadoch bola zistená záporná korelácia s hodnotami koeficientu determinácie R^2 v intervale 0,05 - 0,098.

Aterosklerózu dnes pokladáme za chronické zápalové ochorenie vyvolané opakovaným alebo trvalým pôsobením rôznorodých škodlivín na cievnu stenu. Toto ochorenie vzniká nadmerným ukladaním cholesterolu spolu s fosfolipidmi na vnútornej stene artérií. Z nami

uskutočnenej štúdie vyplýva pozitívny účinok troposférického ozónu v prevalencii tohto ochorenia.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Egnerová, A., Bezecná, A. (1997): Trendy predčasnej úmrtnosti na kardiovaskulárne choroby na Slovensku v rokoch 1971 - 1995. *Lek. Obzor*, 1997, 46: 1 - 2, s. 4 – 5
- Ginter, E. (1998): Vývoj včasnej kardiovaskulárnej mortality v strednej Európe v poslednom desaťročí. *Cardiology*, 1998, 7, 3, s. 119 - 122
- Hernández, F., Menéndez, S. & Wong, R. (1995). Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 19, (1), 115-119.
- Hrnčiar, J.: Kardiovaskulárny program - program boja so srdcovo-cievnyimi ochoreniami. Zdravotná výchova v kardiovaskulárnom programe, Osveta Martin, 1991, s. 5 - 14
- Rovný, I. (1996): Nové úlohy ŠZÚ v nadväznosti na aktualizáciu NPZ. Životné podmienky a zdravie, Bratislava, SLS, ÚH LF UK, 1996, s. 6 - 8
- Stewart C.R a kol.: Oxidized Cholesterol Metabolites Found in human Atherosclerotic Lesions Promote Apolipoprotein C-II Amyloid fibril Formation. *Biochem.* 46 (18), 5552-5561 (2007).
- Turčanová E. (1998): Variabilita a vzťah niektorých biochemických ukazovateľov a somatických charakteristík. Dizertačná práca. PrF UK Bratislava, Katedra antropológie, Bratislava 1998
- Zdravotnícka ročenka SR 2006, Národné centrum zdravotníckych informácií, Bratislava 2007, ISBN 978-80-89292-07-3

Využitie liehovarníckych kvasiniek rodu *Saccharomyces* sp. na produkciu mikrobiálnej biomasy

Dana Urminská*, Silvia Šillerová, Anežka Poláková, Eva Szabová,

Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

[*dana.urminska@uniag.sk](mailto:dana.urminska@uniag.sk)

Kľúčové slová

Saccharomyces sp., kvasinková biomasa, submerzná kultivácia

Úvod

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* majú významné uplatnenie v biotechnologickej praxi predovšetkým ako mikroorganizmy vo fermentačnom priemysle pri výrobe piva, vína, liehu a droždia, v potravinárskom priemysle pri výrobe pekárskeho produktu, ale majú aj negatívny význam ako nevhodné kontaminanty surovín a potravín (Görner a Valík, 2004). Výskumu tohto mikroorganizmu sa venuje neustála pozornosť, pretože genóm *Saccharomyces cerevisiae* bol vôbec prvým eukaryotickým genómom, ktorý bol kompletne sekvenovaný (Goffeau a kol., 1996). Využitie týchto kvasiniek na produkciu biomasy, ktorá môže byť zdrojom esenciálnych látok – vitamínov a aminokyselín ich predurčuje schopnosť za aeróbných podmienok produkovať vysoké množstvo biomasy a nemetabolizovať sacharidy na etanol (Görner a Valík, 2004).

Materiál a metódy

Kultivované mikroorganizmy: *Saccharomyces cerevisiae*, kmeň 1 (tzv. Kolín), kmeň 2 (tzv. Gyöng) a kmeň 3 (tzv. 612).

Submerzná kultivácia vyžaduje kultivácie kvalitné uhlíkaté zdroje, napr. sacharidy, alkoholy, organické kyseliny, alkány (Rebroš a kol., 2005; Mikola a kol., 2007). Pre základnú kultiváciu kvasiniek bolo použité nasledovné YPD médium: 10 g.dm⁻³ kvasničného autolyzáta (yeast extract), 20 g.dm⁻³ peptónu pre bakteriológiu (ImunnaPharm), 20 g.dm⁻³ glukózy (Hahn-Hägerdal a kol., 2005, Jinping a kol., 2008).

Úprava zloženia kultivačného média s cieľom dosiahnuť čo najvyššiu produkciu biomasy sa uskutočnila zmenou koncentrácie základnej živiny - glukózy v koncentráciách 20 g.dm⁻³ až 45 g.dm⁻³. Kultivácia bola realizovaná za aeróbných podmienok pri teplote 30 °C s premiešavaním (280 ot.min⁻¹) počas 48, 72 a 96 hodín.

Získaná biomasa bola po separácii zo živného média premývaná destilovanou vodou a bunky boli stabilizované mrazovou sublimáciou, čím si pripravené biologické preparáty zachovávajú biologické vlastnosti a môžu sa skladovať bez straty biologickej aktivity (Káš a kol., 2006). Podľa viacerých autorov (Jones a Kompala, 1999; Kompala, 1999; Stanbury a kol., 2000) je pre produkciu kvasinkovej biomasy vhodným kultivačným postupom submerzná kultivácia.

Výsledky a diskusia

V potravinárskej praxi môžu byť využívané celé kvasinkové bunky alebo len biologicky významné a aktívne časti buniek v podobe kvasinkových extraktov, proteínových izolátov, esenciálnych aminokyselínny, glukánov bunkovej steny, vitamínov skupiny B (Abbas, 2006). *Saccharomyces cerevisiae* má dlhodobé využitie v potravinárstve predovšetkým v kvasnom priemysle, ktorého cieľom je produkciou etanolu a ale aj ako zdroj biomasy a biochemikálií (Zigová a Šturdík, 1999). Za aeróbnych podmienok a nízkej koncentracii glukózy v médiu (menej ako 5 mmol.dm^{-3}) bunka metabolizuje glukózu nižšou rýchlosťou než v anaeróbných podmienkach, čo sa označuje ako Pasteurov efekt. Anaeróbne dehydrogenácie sú nahradené aeróbnom metabolizmom, ktorý je sprevádzaný intenzívnou tvorbou biomasy. Fermentačné procesy sú inhibované, pretože substrát je oxidovaný až na CO_2 a H_2O (Walker, 1998), čo má rozhodujúci vplyv na produkciu kvasničnej biomasy (Rebroš a kol., 2005).

Tri kmene *Saccharomyces cerevisiae* boli kultivované v aeróbných podmienkach v živnom médiu so zvyšujúcou sa koncentráciou glukózy, ktorej štartujúca koncentrácia bola 20 g.dm^{-3} (Kuranda a Robbins, 1991, Zyracka a kol., 2005, Jinping a kol., 2008). Najvyššiu produkcia biomasy dosiahol kmeň 1 (Tab. 1), a to už po 48 hodinách kultivácie v médiu s 30 g.dm^{-3} glukózy. Predĺžením kultivačnej doby množstvo biomasy klesalo (počas 96 hodín pokles až o 39 %). Kmeň 2 produkoval najvyššie množstvo biomasy za 72 hodín v médiu s množstvom glukózy 40 g.dm^{-3} a 45 g.dm^{-3} , avšak v porovnaní s produkciou kmeňa 1 bolo dosiahnutých len 72 % výťažku. Kmeň 3 nie je vhodným producentom kvasničnej biomasy, pretože najväčšie množstvo bunkovej hmoty bolo získané až pri koncentrácii glukózy 45 g.dm^{-3} po 72 hodinách kultivácie, čo je z pohľadu možného praktického využitia v potravinových doplnok ekonomicky veľmi náročné.

Tabuľka 1

Produkcia biomasy *Saccharomyces cerevisiae*

Koncentrácia glukózy, g.dm^{-3}	Kultivačná doba, hod.	Výťažok biomasy kmeň 1, g zo 100 ml média	Výťažok biomasy kmeň 2, g zo 100 ml média	Výťažok biomasy kmeň 3, g zo 100ml média
20	48	1,20	1,27	1,31
20	72	1,15	1,22	1,24
20	96	1,14	1,23	1,23
25	48	1,40	1,49	1,45
25	72	1,10	1,41	1,37
25	96	1,30	1,39	1,43
30	48	2,47	1,59	1,46
30	72	2,00	1,53	1,56
30	96	1,50	1,49	1,48
35	48	2,37	1,58	1,50
35	72	2,08	1,61	1,68
35	96	1,60	1,60	1,64
40	48	1,50	1,65	1,55
40	72	1,57	1,78	1,70
40	96	1,69	1,67	1,68
45	48	1,42	1,63	1,55
45	72	1,54	1,78	1,83
45	96	1,72	1,64	1,73

Analýzou základných biologicky aktívnych a významných látok bolo zistené, že bielkoviny tvoria 49 % suchej, stabilizovanej biomasy, lipidy 6 %, sacharidy 0,04 % a z vitamínov skupiny B mal najvyššie zastúpenie riboflavín (vitamín B₂), a to 2 mg v 100 g suchej kvasinkovej biomasy (Tab. 2). Z výživového hľadiska sú veľmi významnými sírne aminokyseliny. V 100 mg biomasy kvasiniek bolo 0,69 g cysteínu a 0,65 g metionínu.

Submerzným kultivačným postupom *Saccharomyces cerevisiae* kmeň 1 je možné za aeróbných podmienok pripraviť potravinový suplement – kvasinkovú biomasu, ktorá obsahuje výživovo významné množstvo biologicky hodnotných bielkovín.

Tabuľka 2

Obsah biologicky významných látok v biomase *Saccharomyces cerevisiae* kmeň 1

Látka	Obsah, g.kg ⁻¹	Látka	Obsah, mg.kg ⁻¹
bielkoviny	489,7	vitamín B1	1,8
lipidy	58,8	vitamín B6	< 1
glukóza	0,4	vitamín B2	20,6
fruktóza	< 0,1	Se	< 0,1
cysteín	6,9	Zn	304,0
metionín	6,5	Fe	52,5

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

ABBAS, CH. A. 2006. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours and vitamins by yeast. In: The yeast handbook. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006, 453 s., ISBN 3-540-28388-9

GOFFEAU, A. - BARRELL, B.G. - BUSSEY, H. - DAVIS, R.W. - DUJON, B. - FELDMANN, H. - GALIBERT, F. - HOHEISEL, J. D. - JACQ, C. - JOHNSTON, M. - LOUIS, E. J. - MEWES, H. W. - MURAKAMI, Y. - PHILIPSEN, P. - TETTELIN, H. - OLIVER, S. G. 1996. **Life with 6000 genes.** In: *Science* 274, 1996, p. 563-567

GÖRNER, F., VALÍK, Ľ. 2004. Aplikovaná biológia potravín. 1. vyd. Malé centrum, Bratislava, 528 s., ISBN 80-967064-9-7

HAHN-HÄGERDAL, B., KARHUMAA, K., LARSSON, U.C., GORWA-GRAUSLUND, M., GÖRGES, J., VAN ZYL, W.H. 2005. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. In: *Microb. Cell Fact.* 4, 2005

http 1: <<http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/tradtech.pdf>> (2008-10-6)

JINPING, L., QINGHAI, L., ERZHENG, S., DONGZHI, W., SHENGLI, Y. 2008. Application of comparative proteome analysis to reveal influence of cultivation conditions on asymmetric bioreduction of β -keto ester by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Appl Microbiol. Biotechnol.* 80, 2008, p. 831-839

JONES, K.D., KOMPALA, D.S. 1999. Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures. In: *J. Biotechnol.* 71, 1999, 105-131

KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. 2006. Laboratorní techniky biochemie. 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technická v Praze, Praha, 2004, ISBN 80-7080-586-2

KIRK, P.M., CANNON, P.F., DAVID, J.C., STAPLERS, J.A. 2001. Dictionary of the Fungi. 9. vyd. Wallingford: CAB INTERNATIONAL, 2001, 655 s. ISBN 085199377 X

KOMPALA, D.S. 1999. Cybernetic modeling of spontaneous oscillations in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J. Biotechnol.* 71, 1999, p. 267-274

- KURANDA, M.J., ROBBINS, P.W. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J. Biol. Chem.* 29, 1991, p. 19758-19767
- MIKOLA, M., SETO, J., AMANULLAH, A. 2007. Evaluation of a novel Wave Bioreactor_ cellbag for aerobic yeast Cultivation Bioprocess. In: *Biosyst. Eng.* 30, 2007, p. 231-241
- REBROŠ, M., ROSENBERG, M., KRIŠTOFÍKOVÁ, L., STLOUKAL, R. 2005. Mikrobiálna produkcia palivového etanolu: Baktérie alebo kvasinky? In: *Chem. Listy* 99, 2005, p. 402-409
- STANBURY, P.F., WHITAKER, A., HALL, S.J. 2000. Principles of Fermentation Technology. BH, Oxford, 2000
- WALKER, G.M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. Wiley, Chichester 1998
- ZIGOVÁ, J., ŠTURDÍK, E. 1999. Bioinžinierske aspekty produkcie biomasy *Saccharomyces cerevisiae* ako zdroja špeciálnych proteínov. In: *Biologické listy* 64, 1999, p. 33-51
- ZYRACKA, E., ZADRAĞ, R., KOZIOŁ, S., KRZEPIŁKO, A., BARTOSZ, G., BILIŃSKI, T. 2005. Yeast as a biosensor for antioxidants: simple growth tests employing a *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in superoxide dismutase. In: *Acta Biochim. Pol.* 52, 2005, p. 679-684

Príprava zinkom fortifikovanej kvasničnej biomasy ako možného potravinového doplnku

Silvia Šillerová, Blažena Lavová, Dana Urminská*, Anežka Poláková

Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

[*dana.urminska@uniag.sk](mailto:dana.urminska@uniag.sk)

Kľúčové slová

Saccharomyces sp., fortifikovaná kvasinková biomasa, zinok vo výžive

Úvod

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sa vyznačujú schopnosťou biosoprcie minerálnych látok z prostredia (Wang a Chen, 2006). Wysocki a Tamás (2010) uvádzajú, že kvasinky sú schopné akumulovať aj toxické prvky ako sú arzén, cadmium, antimony, ortuť, chróm a selén a v podobe rôznych ligandov viazať do svojich štruktúr olovo, železo, kobalt, nikel, meď a zinok (Summers 2009). Pre všetky živé organizmy sú kovové mikroelementy neoddeliteľnou súčasťou pepteínov, stavebných, ale aj katalytických (Waldron *et al.* 2009). Jedným z takto významných prvkov je zinok, ktorý je síce vo vysokých koncentráciách toxickým prvkom, ale v mikromnožstvách je esenciálnym prvkom napr. antioxidačných enzýmových systémov buniek (Bhagavan 2002; Sekler *et al.* 2007, De Nicola *et al.*, 2009). Jedným z najvýznamnejších enzýmov je superoxiddismutáza (McCord a Fridovich, 1969).

Bioremediácia a biosorpcia, ktorej sú schopné mikroorganizmy – baktéria, mikroskopické huby, kvasinky a riasy, je významným procesom, ktorým je možné v rámci tzv. zelenej biotechnológie zlepšiť životné prostredie a súčasne produkovať napr. využiteľné potravinové doplnky s významným obsahom mikroelementov.

Chen a Wang (2007) zistili, že bunky *Saccharomyces cerevisiae* sú schopné z vodných roztokov akumulovať zinok, ktorým sa ich biomasa obohacuje a je možné ju potom využívať napr. v živočíšnej výrobe ako biopreparát fortifikovaný týmto významným mikroelementom (Fernandes *et al.* 1998, Swanson a Fahey 2004).

Materiál a metódy

Kultivácia kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen bola realizovaná submerzným spôsobom v YPD médiu, ktoré obsahovalo 10 g.dm⁻³ kvasničného extraktu (Imuna Pharm, Slovakia), 20 g.dm⁻³ peptónu (Imuna Pharm, Slovakia) a 35 g.dm⁻³ glukózy pri pH 6,6, teplote 30 °C, aeróbne s premiešavaním.

Ako zdroje zinku boli použité anorganické soli dusičnan zinočnatý, síran zinočnatý a chlorid zinočnatý (Lachema, Czech Republic). Zásobné roztoky s koncentráciou 10 % (hm.) mali nasledovné pH: dusičnan zinočnatý pH 5,4, síran zinočnatý pH 4,6 a chlorid zinočnatý pH 2,1 a boli pridávané sterilné do sterilného média v množstvách 25, 50, 100, 200 and 300 mg do 100 ml média.

Počiatočná koncentrácia buniek bola 0.5 x 10⁶ buniek v 1 ml media a počas kultivácie bola koncentrácia kvasničných buniek stanovená pomocou hemocytometra. Po kultivácii boli bunky separované a premývané a následne stabilizované mrazovou sublimáciou (LYOVAC GT 2, AMSCO/FINN-AQUA, Germany).

Koncentrácia zinku bola v kvasničnej biomase stanovená metódou AAS (Varian FS240, plameň acetylén–vzduch, OD = 213,9 nm, intenzita prúdu zinkovej lampy 8 mA).

Výsledky a diskusia

Prídavkom dusičnanu zinočnatého do živného média sa postupne znižovala výťažnosť biomasy, ale významne sa zvyšovala koncentrácia Zn v kvasničných bunkách (Tab. 1). Najvýraznejší inhibičný vplyv na rozmnožovanie buniek sa prejavil po prídavku 200 mg zinočnatej soli do média, na druhej strane však takto kultivované bunky obsahovali až 18,5 g Zn v 1 kg biomasy.

Tabuľka 1

Biosorpcia zinku z dusičnanu zinočnatého bunkami *Saccharomyces cerevisiae*

Koncentrácia dusičnanu zinočnatého, mg v 100 ml média	Výťažok biomasy, mg zo 100 ml média	Nárast koncentrácie Zn v biomase kvasiniek, mg Zn v 1 kg suchej biomasy
0	1.18 _a ± 0.47	320.0 _a ± 16
25	1.13 _a ± 0.23	2400.0 _b ± 120
50	1.16 _a ± 0.25	4440.0 _c ± 222
100	1.04 _a ± 0.25	8100.0 _d ± 405
200	0.14 _c ± 0.48	18500.0 _e ± 925
300	0.01 _b ± 0.01	-

P < 0.05, údaj ± smer. odchýlka, n = 6.

Podobné výsledky boli získané aj v prostredí so síranom zinočnatým (Tab. 2). Zvyšovanie koncentrácie soli viedlo k zníženiu rastu a rozmnožovania kvasiniek, ale obsah Zn v bunkách nedosiahol takých vysokých koncentrácií ako v prípade dusičnanu zinočnatého.

Tabuľka 2

Biosorpcia zinku zo síranu zinočnatého bunkami *Saccharomyces cerevisiae*

Koncentrácia síranu zinočnatého, mg v 100 ml média	Výťažok biomasy, mg zo 100 ml média	Nárast koncentrácie Zn v biomase kvasiniek, mg Zn v 1 kg suchej biomasy
0	1.18 _a ± 0.47	320.0 _a ± 16
25	1.17 _a ± 0.16	3820.0 _b ± 191
50	1.13 _a ± 0.19	5800.0 _c ± 290
100	0.99 _a ± 0.14	9440.0 _d ± 472
200	0.006 _b ± 0.01	-
300	0.01 _b ± 0.01	-

P < 0.05, údaj ± smer. odchýlka, n = 6.

Koncentrácie ZnSO₄ 200 a 300 mg v 100 ml YPD media boli pre bunky letálne. Maximálna absorpcia Zn bola z media, ktoré obsahovalo 100 mg Zn v 100 ml, pri vyššej koncentrácii bunky neboli schopné zinok viazať do svojich štruktúr.

Aj chlorid zinočnatý mal pri koncentráciách vyšších ako 100 mg v 100 ml média letálne účinky na kvasničné bunky (Tab. 3).

Tabuľka 3

Biosorpcia zinku z chloridu zinočnatého bunkami *Saccharomyces cerevisiae*

Koncentrácia chloridu zinočnatého, mg v 100 ml média	Výťažok biomasy, mg zo 100 ml média	Nárast koncentrácie Zn v biomase kvasiniek, mg Zn v 1 kg suchej biomasy
0	1.18 _a ± 0.47	320.0 _a ± 16
25	1.19 _a ± 0.69	3280.0 _b ± 164
50	1.17 _a ± 0.05	5540.0 _c ± 277
100	0.99 _a ± 0.15	10380.0 _d ± 519
200	0.03 _b ± 0.03	-
300	0.04 _b ± 0.01	-

P < 0.05, údaj ± smer. odchýlka, n = 6.

Chen a Wang (2007) uvádzajú, že optimálnym pH pre biosopciu zinku je hodnota 5,8. Je to v súlade so získanými výsledkami, kedy najlepšie tolerovaným bol roztok dusičnanu zinočnatého. Stehlik-Tomas *et al.* (2004) pripravili fortifikované kvasinky s obsahom 700 µg Zn v 1 g biomasy anaeróbnou kultiváciou. Poreda *et al.* (2009) však prišli k záveru, že nie je takto možné pripraviť biomasu s obsahom Zn vyšším ako 0,6 mg v 1 g suchej biomasy. V našom pokuse boli submerznou kultiváciou pripravené kvasinky s obsahom 185 µg v 1 mg suchej biomasy.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Bhagavan N.V. (2002): Medical biochemistry. Harcourt Academic Press, Canada: 897.
- De Nicola R., Hall N., Bollag T., Thermogiannis G., Walker G.M. (2009): Zinc accumulation and utilization by wine yeasts. *International Journal of Wine Research*, **1**: 85-94.
- De Nicola R., Walker G.M. (2009): Accumulation and cellular distribution of zinc by brewing yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, **44**: 210-216.
- Fernandes E.A.N., Nepomuceno N., Trevizam A.B., Amorim H.V. (1998): From potential to reality: Yeast derived from ethanol production for animal nutrition. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **234**: 113-118.
- Chen C., Wang, J. (2007): Characteristics of Zn²⁺ biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomedical and Environmental Sciences*, **20**: 478-482.
- McCord J.M., Fridovich I. (1969): Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, **244**: 6049-6055.
- Poreda A., Antkiewicz P., Tuszyński T., Małgorzata M. (2009): Accumulation and release of metal ions by brewer's yeast during successive fermentations. *The Journal of the Institute of Brewing and Distilling*, **115**: 78-83.
- Sekler I., Sense S.L., Hershinkel M., Silverman W.F. (2007): Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Molecular Medicine*, **13**: 337-343.
- Stehlik-Tomas V., Zetić V.G., Stanzer D., Grba S., Vahčić N. (2004): Zinc, Copper and Manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, **42**: 115-120.
- Summers A.O. (2009): Damage control: regulating defences against toxic metals and metalloids. *Current Opinion in Microbiology*, **12**: 138-144.

Swanson K.S., Fahey G.C. (2004): The role of yeast in companion animal nutrition. Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium. Kentucky, USA. 475-484.

Waldron K.J., Rutherford J.C., Ford D., Robinson N.J. (2009): Metalloproteins and metal sensing. *Nature*, **460**: 823-830.

Wang J., Chen C. (2006): Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology advances*, **24**: 427-451.

Wysocki R., Tamás J.T. (2010): How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiol Rev*, **34**: 925-951

Bezpečnosť pôdy a poľnohospodárskej produkcie z pohľadu obsahu rizikových kovov v blízkosti priemyselných podnikov stredného povazia

Alena Vollmannová, Dana Urminská, Peter Ježo, Július Árvay, Ľuboš Harangozo

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, SR
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-949 76 Nitra, Slovensko*

Abstrakt

Vo vybranej lokalite regiónu Stredné Považie sme hodnotili hygienu pôdy a poľnohospodárskej produkcie z pohľadu obsahu Cd, Pb, Ni, Zn, Cu, Cr, Co, Fe a Mn. Zvolená lokalita Vrchy sa nachádza v blízkosti troch významných priemyselných podnikov tohto regiónu (Matador Púchov, Považská cementáreň Ladce a sklárne RONA v Lednických Rovniach). Hodnoty pôdnej reakcie pH/KCl v sledovanej lokalite potvrdili, že pôda bola extrémne kyslá až neutrálna. Obsahy Cd v pôdnom extrakte lúčavkou kráľovskou boli o 5% - 40% a 8% - 63% vyššie ako je hygienický limit daný Zákonom 220/2004 platným v SR. Znamená to, že pôdna kontaminácia Cd a Co bola analyticky potvrdená. Legislatívne určená kritická hodnota vo vzťahu pôda – rastlina stanovená v pôdnom extrakte NH_4NO_3 bola prekročená iba pre pôdny obsah Pb (o 20% - 200%). Semená ľanu pestovaného na pôde sledovanej lokality obsahovali vyššie množstvá Cd, Pb, Cr a Ni (o 68% - 100%, 30% - 130%, 100% - 240% a 85% - 105%) v porovnaní s hygienickými limitmi určenými Potravinovým kódexom SR. Uvedené výsledky potvrdzujú potrebu neustáleho monitoringu obsahu rizikových kovov tak v pôdach, ako aj poľnohospodárskej produkcii v blízkosti ich potenciálnych zdrojov s cieľom zachovania bezpečnosti potravinového reťazca.

Kľúčové slová : pôdna hygiena, ťažké kovy, bezpečnosť potravinového reťazca

Úvod

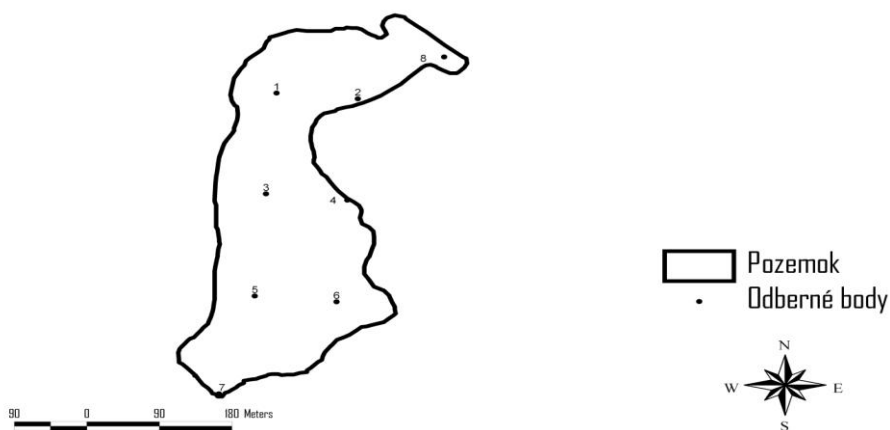
Atmosféra severnej pologule bola a stále je kontaminovaná exhalátmi z energetických, dopravných, poľnohospodárskych a najmä priemyselných zdrojov. Zmena pôdnej reakcie spôsobená chemickými reakciami kyslých komponentov týchto exhalátov s ďalšími zložkami atmosféry predstavuje v súčasnosti jeden z globálnych environmentálnych problémov. Pôdna acidifikácia je v našej krajine podmienená deštrukciou organických a minerálnych pôdnych komponentov, znižovaním koncentrácie bázičných kationov, imobilizáciou nutrientov, znižovaním pôdnej sorpčnej kapacity a mobilizáciou toxických prvkov. Z celkovej rozlohy SR 49 037,17 km² predstavuje poľnohospodárska pôda 49,3 % a lesná pôda 40,97%, pričom imisiami zaťažené územia predstavujú asi 13% z celkovej rozlohy SR. Pôda ako štartovacie miesto vstupu rizikových látok do potravinového reťazca je v našej krajine neustále sledovaná (Hegedüsová 1999, Tóth et al. 2004, Hronec et al. 2006 a i.). Zvlášť je potrebné sledovať obsah pôdnych kontaminantov v blízkosti priemyselných podnikov z dôvodu zachovania kvality a bezpečnosti potravinových surovín dopestovaných v týchto oblastiach. Cieľom práce bolo zhodnotiť pôdnu hygienu a bezpečnosť dopestovanej poľnohospodárskej produkcie z pohľadu obsahov Cd, Pb, Ni, Zn, Cu, Cr, Co, Fe a Mn vo vybranej lokalite regiónu Stredné Považie v blízkosti troch významných priemyselných podnikov: Matador Púchov, Považská cementáreň Ladce a sklárne RONA v Lednických Rovniach.

Materiál and metódy

Vzdialenosť pozemku Vrchy od závodu Matador je 7 km a od Považskej cementárne Ladce 16 km a približne 7 km vzdušnou čiarou od sklárskeho závodu RONA.

Pôda v sledovanej lokalite bola ílovito hlinitá, pôdny druh stredne ťažká až ťažká, pôdny typ fluvizem glejová a kambizem typická. Výmera pozemku 9,4 ha, priemerná svahovitosť 8,88 °, 15,62 %. Na uvedenom pozemku sa pestoval ľan siaty.

Za pomoci satelitnej navigácie GPS MAP 60 Cx GARMIN (GPS) sme vytvorili digitálne rastrové mapy, na ktorých sme určili odberné miesta (obr. 1)



Obr. 1 Znáznornenie plošného rozmiestnenia odberných bodov na sledovanom pozemku Vrchy

Odbery pôdnych vzoriek sa realizovali z vopred určených miest. Vykonali sa za pomoci pedologickej sondy z horizontu A (0-0,2 m) s použitím GeoSampler fy. Fisher. Pseudototálne obsahy Cd, Pb, Ni, Zn, Cu, Cr, Co, Fe a Mn boli stanovené v pôdnom extrakte lúčavkou kráľovskou *aqua regia* a obsahy mobilných foriem vybraných ťažkých kovov v pôdnom extrakte NH_4NO_3 ($c = 1 \text{ mol.dm}^{-3}$). Získané výsledky boli vyhodnotené podľa Zákona 220/2004. Analytickou koncovkou bola plameňová AAS (AAS Varian AA Spectr DUO 240 FS/240Z/UltrAA).

Vzorky semien ľanu boli odobrané z tých istých miest ako pôdne vzorky. Po vysušení a homogenizácii boli vzorky mineralizované s použitím HNO_3 v mikrovlnnej piecke MARRS X-PRESS. Roztoky boli následne analyzované plameňovou AAS (AAS Varian AA Spectr DUO 240 FS/240Z/UltrAA). Získané výsledky boli vyhodnotené podľa Potravinového kódexu SR.

Výsledky a diskusia

V tab. 1 sú uvedené stanovené hodnoty pôdnej reakcie a obsahov sledovaných ťažkých kovov v A horizonte. Stanovené obsahy ťažkých kovov v pôdnom extrakte lúčavkou kráľovskou predstavujú hodnoty celkových obsahov kovov s výnimkou ich reziduálnej frakcie viazanej v silikátoch.

Tabuľka 1 Pôdna reakcia a obsahy ťažkých kovov (mg.kg^{-1}) v A horizonte (pôdny extrakt lúčavkou kráľovskou)

Č.	Odberné miesto	pH (KCl)	Pôdny extrakt lúčavkou kráľovskou (mg.kg^{-1})								
			Cd	Pb	Ni	Zn	Cu	Cr	Co	Fe	Mn
1.	1A	4,23	0,68	27,4	27,4	72,6	0,68	27,2	17,8	759,6	45,4
2.	2A	3,80	0,86	19,2	26,8	58,2	0,86	30,0	13,4	786,6	36,4
3.	3A	3,92	0,60	21,6	32,8	68,4	0,60	36,4	16,2	1111	42,4
4.	4A	3,70	0,74	26,4	25,4	55,5	0,74	30,0	18,0	815,8	54,4
5.	5A	3,65	0,76	31,4	30,8	68,8	0,76	30,4	24,0	1047	68,6

6.	6A	3,64	0,86	27,8	27,6	70,0	0,86	28,8	21,4	905,4	68,6
7.	7A	6,74	0,94	29,6	91,6	71,2	0,94	46,6	24,4	1447	63,6
8.	8A	4,01	0,98	25,4	28,2	72,2	0,98	31,2	18,8	905,6	44,4
Priemer		4,21	0,80	26,10	36,33	67,11	0,80	32,58	19,25	972,2	53,0
Min		3,64	0,60	19,20	25,40	55,50	0,60	27,20	13,40	759,6	36,4
Max		6,74	0,98	31,4	91,60	72,6	0,98	46,60	24,40	1446,6	68,6
SD		1,04	0,13	4,02	22,46	6,54	0,13	6,26	3,80	227,7	12,7
Hygienický limit*		-	0,7	70,0	50,0	150,0	60,0	70,0	15,0	-	-

* Zákon 220/2004

Pôdna reakcia pH/KCl v sledovanej lokalite bola extrémne kyslá až neutrálna. Hodnoty pôdnej reakcie majú významný vplyv na príjem ťažkých kovov rastlinami. V pôdach s nízkymi hodnotami pH nastáva deštrukcia humusu a zvyšovanie mobility a bioprístupnosti rizikových kovov (Blume et al, 1990; Torma, 1998). Vo väčšine vzoriek prekročovali obsahy Cd a Co v pôdnom extrakte lúčavkou kráľovskou hygienický limit daný Zákomom 220/2004 platným v SR (o 5% - 40% a 8% - 63%). Znamená to, že pôdna kontaminácia Cd a Co bola analyticky potvrdená. Kadmium patrí k rizikovým kovom s najvyššou toxicitou v životnom prostredí (Das et al., 1997). Kumulácia Cd v pôdach je súčasne aj objektom potrebného monitoringu z pohľadu potravinovej bezpečnosti dopestovanej produkcie (Rahmanian et al., 2011). Preukázal sa tiež toxický účinok Cd na rastliny (Osman et al., 2004). Li et al. (2009) vo svojich prácach potvrdili negatívny vplyv vyšších množstiev Co na rajčiny, repku a jačmeň pestované v pôdach s rôznymi chemickými a fyzikálnymi vlastnosťami, pričom hlavným kritériom toxicity Co bola rozdielna rozpustnosť jeho zlúčenín, ktoré boli v rôznych pôdach zastúpené v odlišných pomeroch.

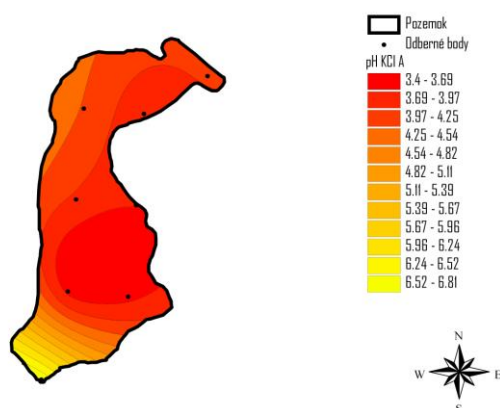
Tabuľka 2 Obsah ťažkých kovov (mg.kg⁻¹) v A horizonte (pôdny extrakt NH₄NO₃, c = 1 mol.dm⁻³)

Č.	Odberné miesto	Pôdny extrakt NH ₄ NO ₃ , c = 1 mol.dm ⁻³ (mg.kg ⁻¹)								
		Cd	Pb	Ni	Zn	Cu	Cr	Co	Fe	Mn
1.	1A	0,03	0,12	0,30	0,46	0,08	0,03	0,10	0,90	28,25
2.	2A	0,06	0,15	0,52	0,38	0,08	0,03	0,12	0,34	25,35
3.	3A	0,05	0,15	0,38	0,23	0,08	0,03	0,14	0,70	29,05
4.	4A	0,07	0,18	0,82	0,50	0,09	0,03	0,26	0,54	16,75
5.	5A	0,07	0,20	0,96	0,65	0,11	0,05	0,22	0,52	51,35
6.	6A	0,07	0,18	0,92	0,25	0,11	0,04	0,17	0,53	52,95
7.	7A	0,04	0,30	0,18	0,59	0,12	0,07	0,16	0,96	37,80
8.	8A	0,04	0,17	0,61	0,65	0,09	0,06	0,13	0,62	1,05
Priemer		0,05	0,18	0,59	0,46	0,09	0,04	0,16	0,64	30,32
Min		0,03	0,12	0,18	0,23	0,08	0,03	0,10	0,34	1,05
Max		0,07	0,30	0,96	0,65	0,12	0,07	0,26	0,96	52,95
SD		0,02	0,06	0,29	0,17	0,02	0,02	0,05	0,21	17,25
Hygienický limit*		0,1	0,1	1,5	2,0	1,0	-	-	-	-

* Zákon 220/2004

V tab. 2 sú uvedené hodnoty obsahov sledovaných ťažkých kovov v pôdnom extrakte NH₄NO₃ (c = 1 mol.dm⁻³). Limitné hodnoty dané Zákomom 220/2004 predstavujú kritické

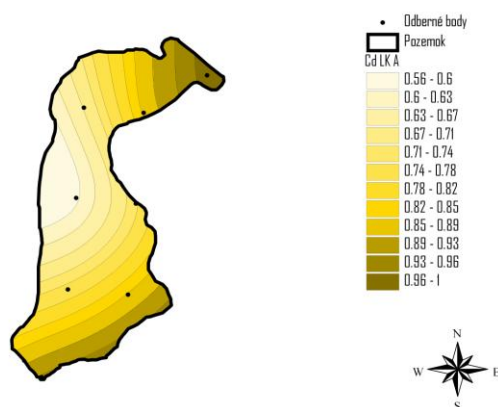
hodnoty pre poľnohospodárske pôdy vo vzťahu k pestovanej rastline. Vo všetkých odberných miestach bola prekročená limitná hodnota pre obsah mobilných foriem Pb o 20% - 200%. Hodnoty pôdnej reakcie pH/KCl v sledovanej lokalite znázorňuje obr. 2.



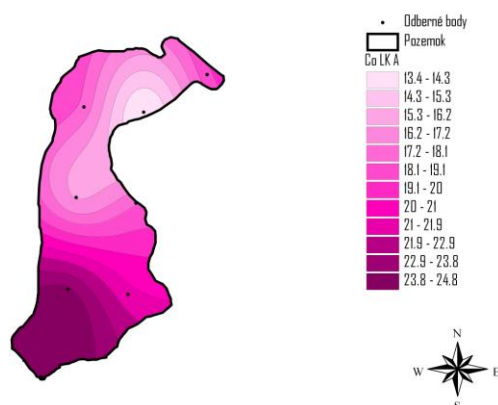
Obr. 2 Hodnoty pôdnej reakcie pH/KCl v lokalite Vrchy (A horizont)

Obsah Cd v pôdnom extrakte lúčavkou kráľovskou bol v 6 odberových miestach vyšší ako je maximálne prípustné množstvo určené Zákonom 220/2004 (Obr. 3). Podobne, obsah Co bol v 7 odberových miestach vyšší ako je legislatívne stanovený hygienický limit (Obr. 4). Vysoké koncentrácie ťažkých kovov v pôde zvyčajne zapríčiňujú aj ich následnú kumuláciu v rastlinách a v konečnom dôsledku aj v ľudskom organizme (Buszewski et al., 2000). Pôdne vlastnosti patria k dôležitým faktorom modifikujúcim bioprístupnosť kovov a ich toxicitu a preto patria nevyhnutne k monitorovaným parametrom pri určovaní miery rizika kovov (Bradham et al., 2006)..

Hodnoty obsahov Pb, Ni, Zn, Cu a Cr v A horizonte stanovené v pôdnom extrakte lúčavkou kráľovskou boli pod hygienickými limitmi.

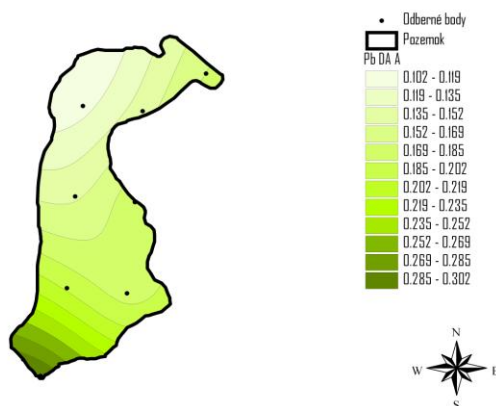


Obr. 3 Obsah Cd v pôdnom extrakte lúčavkou kráľovskou v lokalite Vrchy (A horizont)



Obr. 4 Obsah Co v pôdnom extrakte lúčavkou kráľovskou v lokalite Vrchy (A horizont)

Legislatívne určený hygienický limit pre pôdny extrakt NH_4NO_3 bol prekročený vo všetkých odberných bodoch sledovanej lokality v horizonte A len pre obsah Pb (Obr. 5).



Obr. 5 Obsah Pb v pôdnom extrakte NH_4NO_3 v lokalite Vrchy (A horizont)

Vysoké hodnoty obsahu ťažkých kovov v pôde predstavujú potenciálne riziko pre ľudské zdravie. Treba mať na pamäti, že účinok rôznych ťažkých kovov môže byť nielen antagonistický, ale aj synergický (Bystrická et al., 2008), pričom bolo potvrdené aj vzájomné ovplyvňovanie ťažkých kovov a nutričných zložiek rastlinných potravín (Vollmannová et al. 2007, Musilová et al. 2009a, 2009b etc.).

Ľan siaty (*Linum usitatissimum* L.) je dôležitou plodinou využívanou najmä v severnej a severozápadnej Číne. Široké využitie ľanu okrem technologického účelu (textilný a papierenský priemysel) zahŕňa aj využívanie jeho semien a oleja v oblasti starostlivosti o ľudské zdravie, ako aj vo výžive zvierat. Vysoký obsah alfa linolénovej kyseliny predurčuje využitie ľanových semien pri príprave moderných potravín. Konzumáciou ľanových semien možno pomôcť k zníženiu celkového obsahu cholesterolu a LDL cholesterolu a tiež redukovaniu rizika srdcovocievnych ochorení. Podľa Rubilar et al. (2010) je ľan považovaný za funkčnú potravinu alebo zdroj funkčných zložiek s pozitívnym efektom v prevencii proti viacerým civilizačným chorobám. V r. 2010 sa v SR ľan pestoval na ploche 2101 ha (Tibenska, 2010). Na pestovanie tejto plodiny sa využívala aj sledovaná lokalita Vrchy.

Vzorky semien ľanu boli odobrané z tých istých miest ako pôdne vzorky. Na základe prezentovaných výsledkov možno potvrdiť schopnosť semien ľanu kumulovať vysoké množstvá rizikových kovov, ako sú Cd, Pb, Cr a Ni (tab. 3). Aj napriek nízkemu obsahu Cr a

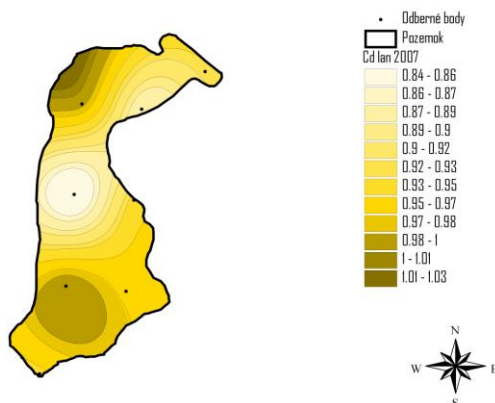
Ni v analyzovaných pôdnych vzorkách, v semenách ľanu sme zaznamenali zvýšenú kumuláciu aj týchto kovov.

Legislatívne stanovený hygienický limit pre Cd v Potravinovom kódexe SR bol o 68% - 100% prekročený vo vzorkách semien ľanu vo všetkých odberných bodoch (obr. 6). Aj Angelova et al. (2004) potvrdili, že ľan patrí k plodinám s výraznou schopnosťou kumulovať ťažké kovy z pôdy.

Tabuľka 3. Obsahy ťažkých kovov (mg.kg^{-1}) v semenách ľanu siateho (*Linum usitatissimum* L.)

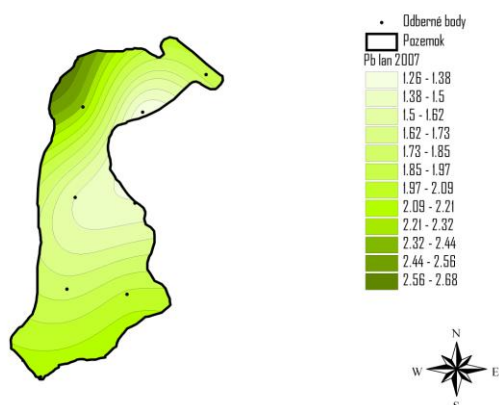
Č.	Odberné miesto	Obsah ťažkých kovov (mg.kg^{-1})						
		Cd	Pb	Zn	Cu	Cr	Ni	Co
1.	1	0,99	2,30	44,10	13,70	1,40	3,90	1,30
2.	2	0,88	1,30	45,80	15,50	1,60	3,70	0,60
3.	3	0,84	1,50	44,80	15,30	1,70	3,70	0,90
4.	4	0,94	1,40	44,70	15,10	1,10	3,90	1,00
5.	5	1,00	1,80	45,00	15,30	1,00	3,90	1,20
6.	6	0,97	2,00	45,30	15,60	1,40	4,10	0,80
7.	7	0,95	2,20	45,30	15,30	1,60	4,10	0,90
8.	8	0,93	1,90	44,50	15,40	1,70	3,90	0,70
Priemer		0,94	1,80	44,94	15,15	1,44	3,90	0,93
Min		0,84	1,30	44,10	13,70	1,00	3,70	0,60
Max		1,00	2,30	45,80	15,60	1,70	4,10	1,30
SD		0,05	0,37	0,53	0,60	0,27	0,15	0,24
Hygienický limit*		0,5	1,0	80,0	25,0	0,5	2,0	-

* Potravinový kódex SR



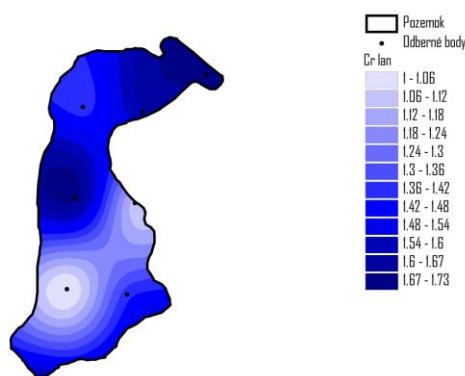
Obr. 6 Obsah Cd v semenách ľanu v lokalite Vrchy

Aj stanovený obsah Pb v semenách ľanu bol vo všetkých odberných miestach vyšší ako hygienický limit daný Potravinovým kódexom SR (Obr.7).



Obr. 7 Obsah Pb v semenách ľanu v lokalite Vrchy

Aj keď je Cr esenciálnym prvkom pre živé organizmy, niektoré jeho zlúčeniny sú preukázateľnými karcinogénmi. Množstvo Cr v pôde, ktoré je aktuálne nebezpečné pre rastliny, je určené jeho bioprístupnosťou (Gauglhofer, 1986). Nami stanovený obsah Cr v semenách ľanu bol o 100% - 240% vyšší než legislatívne dané maximálne prípustné množstvo vo vzorkách zo všetkých odborných bodov (obr. 8).



Obr. 8 Obsah Cr v semenách ľanu v lokalite Vrchy

Podľa Hazlett et al. (1983) je bioprístupnosť pôdneho obsahu Ni pre rastliny ovplyvňovaná fyzikálnymi faktormi (textúra, teplota, obsah vody), chemickými faktormi (pH, organická hmota, redoxný potenciál) a biologickými faktormi (variabilita rastlinných druhov, mikrobiálna aktivita). Aj obsahy Ni v ľanových semenách v lokalite Vrchy boli vyššie ako hygienická limitná hodnota vo vzorkách zo všetkých odborných miest (o 85% - 105%) (obr. 9).

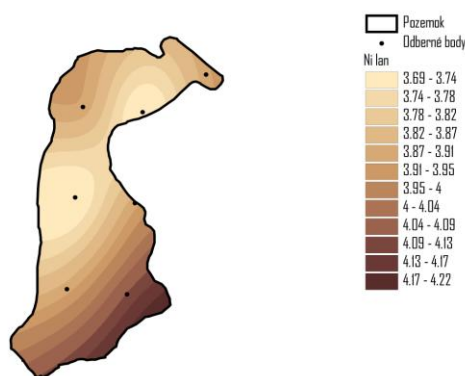


Fig. 9 Obsah Ni v semenách ľanu v lokalite Vrchy

Záver

Na základe uvedených výsledkov analýz možno skonštatovať, že sledovaná lokalita Vrchy nebola vhodnou pre pestovanie ľanu siateho. Analyzovanú produkciu možno bezpečne využiť len ako technickú plodinu. Naše výsledky súčasne potvrdili potrebu neustáleho monitoringu obsahu rizikových kovov tak v pôdach, ako aj poľnohospodárskej produkcii v blízkosti ich potenciálnych zdrojov s cieľom zachovania bezpečnosti potravinového reťazca

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. Angelova V. et al.: 2004. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, Vo. 19, No. 3, p. 197-205.
2. Bradham K.D. et al.: 2006. Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 25, No. 3, p. 769-775.
3. Buszewski B. et al: 2000. Monitoring of Selected Heavy Metals Uptake by Plants and Soils in the Area of Toruń, Poland. *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 9, No. 6 (2000), 511-515
4. Bystrická J., Musilová J., Tóth T.: 2008. The possibilities of cadmium uptake lowering by seeds of legumines with the application of Zn^{2+} into the soil. In *Slovak J. of Animal Science*, Nitra, Vol. 41, No.4, p. 197.
5. Das P, Samantaray S, Rout G. R.: 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ. Pollut.*, Vol. 98, p.29.
6. Gaughlofer J.: 1986. Environmental Aspects of Tanning with Chromium. *J. Soc. Leather Technol. Chem.*, Vol. 70, p. 11-13.
7. Hazlett et al.: 1983. Metal contaminants in surface soils and vegetation as a result of nickel/copper smelting at Coniston, Ontario, Canada. *Reclamat. Reveg. Res.*, Vol. 2, p. 123-137
8. Hegedúsová A.: 1999. Heavy metals (Cd, Pb, Hg) in soils of the South Slovakia and hygienic state of cultivated vegetables. *Dissertation Work*. Nitra. p. 20-30.

9. Hronec O., Holobradý K., Tóth T.: 2006. Old alkaline environmental loads of soils in Slovakia. *Acta regionalia et environmentalica*, Nitra, Vol. 3, No. 2 (2006), p. 32-35
10. Li H. F. et al.: 2009. Phytotoxicity and bioavailability of cobalt to plants in a range of soils. *Chemosphere* 75 (2009) 979–986
11. Musilová J., Bystrická J., Tomáš J., Poláková Z., Melicháčová S.: 2009 a. Changes of Vitamin C Content in Relation to the Range of Accumulation of Cd, Pb and Zn in Potato Tubers. *Czech J. Food Sci.*, Vol. 27, Special Issue, p. 192-194.
12. Musilová J., Tóth T., Árvay J.: 2009 b. Contents of Heavy Metals in Different Saccharides Fractions of Potato Tubers. *Czech J. Food Sci.*, Vol. 27, Special Issue, p. 382-385.
13. Osman, M. et al.: 2004. Differential effects of Co^{2+} and Ni^{2+} on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. *Environ. Toxicol. Phar.* 16, 169–178.
14. Rahmanian M. et al.: 2011. Effects of heavy metal resistant soil microbes inoculation and soil Cd concentration on growth and metal uptake of millet, couch grass and alfalfa. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(4) pp. 403-410.
15. Rubilar M. et al.: 2010. Flaxseeds as source of functional ingredients. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* Vol. 10 No.3, p. 373 -377.
16. Tibenská H.: 2010. Olejniny. VÚEPP Bratislava, 54 p.
17. Tóth T., Tomáš J., Vollmannová A., Lahučský L., Ducsay L., Varga L.: 2004. Kontaminácia pôd v okolí chemického podniku Chemko Strážske. In *Chem. Listy*, Vol. 98, No.11, p.1063.
18. Vollmannová A., Urminská D., Melicháčová S., Harangozo L., Timoracká M.: 2007. Polyphenolic compounds with antioxidant activity in buckwheat grown in the metallic burden soil. In *Synthetic and Natural Compounds in Cancer Therapy and Prevention. International Conference ERDF of European Union*, 28.-30.3.2007, Bratislava. p. 84.

Totálny obsah polyfenolov vo vybraných odrodách brusníc vo vzťahu k dobe mrazenia

Alena Vollmannová, Tomáš Tóth, Dana Urminská

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, SR
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-949 76 Nitra, Slovensko*

Abstrakt

Vo vybraných odrodách brusníc (Koralle, Ida, Sussi, Sanna, Linnea, Runo Bielawskie) sme v priebehu 6 mesiacov sledovali celkový obsah polyfenolov počas ich skladovania v mraziacom boxe pri -18°C . Obsah polyfenolov sme stanovili v etanolových extraktoch ovocia spektrofotometricky po 3 a 6 mesiacoch uskladnenia brusníc. Medzi odrodami sme potvrdili štatisticky preukazné rozdiely v celkovom obsahu polyfenolov ($P < 0,01$). S výnimkou odrody Sussi sme vo všetkých ostatných odrodách brusníc po 3 mesiacoch uskladnenia v mraziacom boxe zaznamenali zvýšené hodnoty obsahu polyfenolov o 6% - 30% v porovnaní s počiatočnou hodnotou. Po 6 mesiacoch sme zvýšenie celkového obsahu polyfenolov o 7%–29% v porovnaní s počiatočnou hodnotou potvrdili vo všetkých sledovaných odrodách brusníc. Rozdiely v obsahu polyfenolov medzi odrodami boli štatisticky preukazné ($P\text{-value} < 0,01$), s výnimkou odrody Ida. Naše výsledky potvrdili, že tak čerstvé, ako aj mrazené plody brusníc sú významným zdrojom bioaktívnych látok.

Kľúčové slová: brusnice, odroda, polyfenoly

Úvod

Fenolové zlúčeniny patria medzi sekundárne rastlinné metabolity, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu pri ich raste a reprodukcii, ako aj ochrane voči patogénom. Tieto zlúčeniny sa súčasne vyznačujú aj množstvom pozitívnych účinkov na ľudský organizmus, napr. antioxidačnou aktivitou, antialergickými, protizápalovými, antimikrobiálnymi účinkami, ako aj preventívnymi účinkami voči kardiovaskulárnym ochoreniam. Na druhej strane, niektoré z nich vykazujú aj antinutričné alebo až potenciálne toxické účinky (Stavric and Matula, 1988; Singleton and Kratzer, 1969; Morton, 1989; Salunkhe et al., 1989). Treba však poznamenať, že príjem polyfenolov z potravy, ako aj ich biopristupnosť je v bežne konzumovanej potrave nízka a teda nepredstavujú pre zdravie konzumenta riziko. Drobné ovocie, ako sú čučoriedky, černice alebo brusnice sú známe obsahom flavonoidov a fenolových kyselín s pozitívnym účinkom na ľudské zdravie. Brusnice obsahujú málo sodíka, veľa draslíka, málo sacharidov a vysoké množstvá polyfenolov s antioxidačnou aktivitou (Sikora et al., 2008; Vinson et al., 2001).

Cieľom práce bolo vo vybraných odrodách brusníc (Koralle, Ida, Sussi, Sanna, Linnea, Runo Bielawskie) v priebehu 6 mesiacov sledovať zmeny celkového obsahu polyfenolov počas ich skladovania v mraziacom boxe pri -18°C .

Materiál a metódy

Vzorky 6 odrôd brusníc Sussi, Sanna, Ida, Koralle (stredne skoré), Linnea, Runo Bielawskie (stredne neskoré,) sme získali z výskumného pracoviska Krivá na Orave. Z ručne nazbieraných plodov sme navážili 100g vzorky a uskladnili v PE vreckách v mraziacom boxe pri teplote -18°C . Extraktory sme pripravili homogenizáciou 50 g a extrahovaním zmesi 100 ml 80% etanolom počas 12 hodín. Totálny obsah polyfenolov sme stanovili na začiatku uskladnenia, po 3 a po 6 mesiacoch spektrofotometricky (Shimadzu UV/VIS – 1240) s použitím Folin-Ciocalteu agens. Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 765 nm oproti slepej vzorke.

Výsledky a diskusia

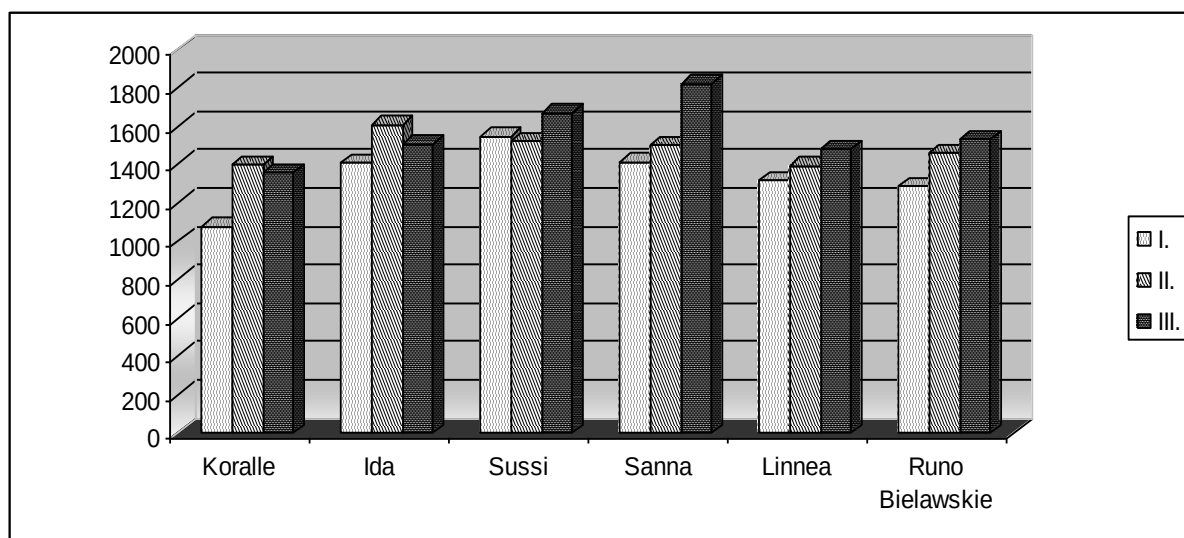
Vplyv odrody brusníc na obsah makro- a mikroelementov je evidentný. Stredne neskoré odrody obsahovali viac Mg and K (o 7 a 14%) a menej Fe (o 25%) a Na (o 13%) než stredne skoré odrody. Vo všetkých odrodách sme potvrdili níziy obsah sodíka (tab. 1).

Tab. 1 Obsah makro- a mikroelementov (mg.kg^{-1}) v odrodách brusníc

Odroda	Mg	K	Fe	Na
Koralle	505.3	5860	15.7	9.1
Ida	478.3	5760	14.2	stopy
Sussi	521.5	5930	29.3	stopy
Sanna	489.9	5860	22.8	7.4
Linnea	555.2	5690	19.9	4.3
Runo Bielawskie	491.9	7690	10.7	2.9

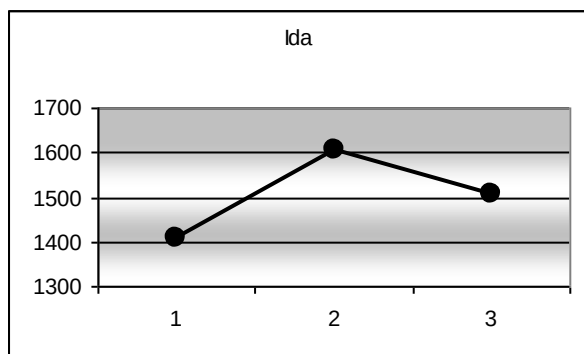
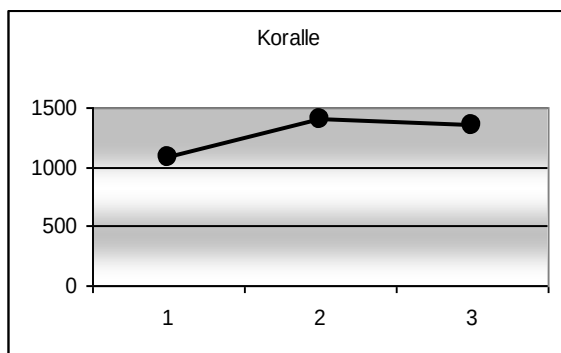
Štatisticky preukazné rozdiely ($P\text{-value} < 0,01$) v totálnom obsahu polyfenolov (TP) sme potvrdili len medzi odrodami Koralle – Sanna a Koralle – Sussi (obr. 1). Stanovené hodnoty TP sa pohybovali v rozmedzí $1076.29 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Koralle) – $1414.98 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Sanna). Borowska et al. (2009) stanovili vyššie hodnoty TP v 6 amerických odrodách brusníc (1921 mg.kg^{-1} - 3747 mg.kg^{-1}) a v divorastúcich brusniciach (2885 mg.kg^{-1}) tiež potvrdili signifikantné rozdiely v obsahu polyfenolov medzi odrodami. Ešte vyššie hodnoty TP (7990 mg.kg^{-1} - 4745 mg.kg^{-1}) uvádzajú v odrode Pilgrim Çelik et al. (2008). Na druhej strane Wang and Stretch (2001) zistili nižšie hodnoty TP v 3 odrodách brusníc (1200 mg.kg^{-1} - 1375 mg.kg^{-1}). Tieto výsledky korešpondujú s našimi zisteniami.

Podľa Häkkinen et al. (1999) koncentrácia fytochemikálií lesných plodov závisí od viacerých faktorov, ako sú environmentálne podmienky, stupeň zrelosti, odroda, lokalita, spôsob skladovania a spracovania ovocia.



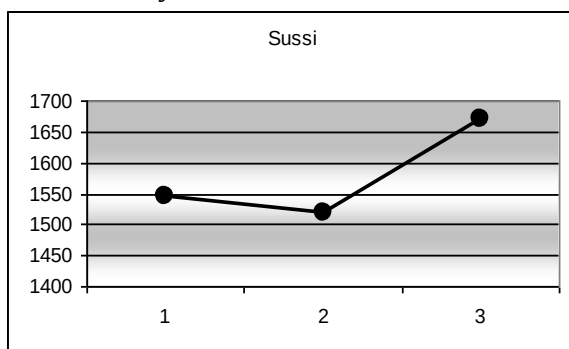
Obr.1 Totálny obsah polyfenolov v odrodách brusníc (mg.kg^{-1})

S výnimkou odrody Sussi bol vo všetkých ostatných odrodách po 3 mesiacoch uskladnenia v mraziacom boxe pozorovaný nárast TP od 6% v odrodách Linnea, Sanna po 30% v odrode Koralle (obr. 2 – 7). V odrode Sussi sme pozorovali nepatrný pokles TP (o 2%). Po 3 mesiacoch mrazenia sme potvrdili v hodnotách TP medzi odrodami štatisticky preukazné rozdiely ($P\text{-value} < 0,01$).



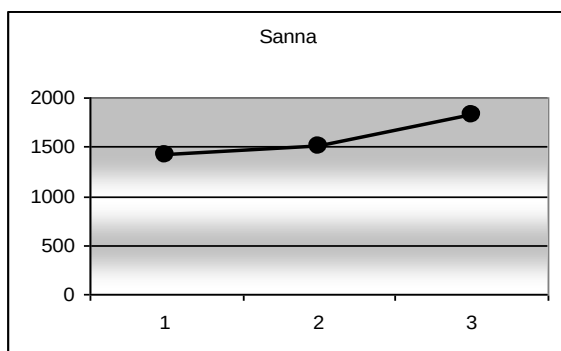
Obr. 2 Zmeny TP v odrode Koralle

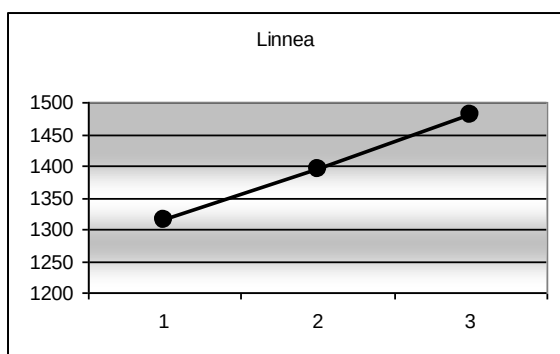
Obr. 3 Zmeny TP v odrode Ida



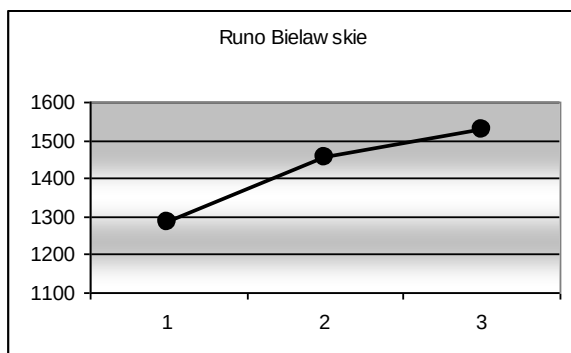
Obr. 4 Zmeny TP v odrode Sussi

Obr. 5 Zmeny TP v odrode Sanna





Obr. 6 Zmeny TP v odrode Linnea Bielawskie



Obr. 7 Zmeny TP v odrode Runo Bielawskie

Po 6 mesiacoch mrazenia brusníc sme vo všetkých odrodách pozorovali zvýšné hodnoty TP v porovnaní s prvým meraním. Zmeny v hodnotách TP boli štatisticky významné ($P\text{-value} < 0,01$) vo všetkých odrodách brusníc s výnimkou odrody Ida. Zvýšenie hodnôt TP sa pohybovalo v intervale 7% (Ida) – 29% (Sanna). Po 6 mesiacoch mrazenia sme potvrdili štatisticky významné rozdiely ($P\text{-value} < 0,01$) v hodnotách TP medzi skúmanými odrodami brusníc. Na rozdiel od našich výsledkov Ancos et al. (2000) nepotvrdili signifikantné zmeny v TP v plodoch čierníc počas 12 mesačného mrazenia. Po 6 mesiacoch mrazenia zaznamenal Skupień (2006) nepatrné zníženie hodnôt TP v odrodách čučoriedok, ale po 12 mesiacoch potvrdil zvýšenie hodnôt TP o 0,2% - 22 %.

Záver

Naše výsledky potvrdili, že mrazené brusnice si uchovávajú aj po 6 mesiacoch uskladnenia mraziacom boxe cenné bioaktívne zložky. Dlhodobé mrazenie je teda výbornou metódou konzervovania sezónneho ovocia s možnosťou zachovania obsahu jeho chemoprotektívnych komponentov.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- ANCOS B. et al. 2000. Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4565-4570
- BOROWSKA, E.J. et al. 2009. Polyphenol, anthocyanin and resveratrol mass fractions and antioxidant properties of cranberry cultivars. *Food Technol. Biotechnol.* 47 (1), 56-61

- ÇELİK, H. et al.. 2008. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 117 (4), 345-348
- HÄKKINEN, S. et al.. 1999: Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*, 32: 345 – 353
- MORTON, J.F. 1989. Tannin as carcinogen in bush-tea: tea, mate, and khat. In: *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. New York, 403-416
- SALUNKHE, D.K. et al.. 1989. *Dietary Tannins: Consequences and Remedies*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- SIKORA, E. et al.. 2008: The sources of natural antioxidants. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 7(1): 5-17
- SINGLETON, V.L., KRATZER, F.H. 1969. Toxicity and related physiological activity of phenolic substances of plant origin. *J. Agric. Food Chem.*, 17: 497-512
- SKUPIEŃ, K. 2006. Evaluation of chemical composition of fresh and frozen blueberry fruit. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 5(1): 19-25
- STAVRIC, B., MATULA, T.I. 1988. Biological significance of flavonoids in foods: a review of some recent issues and problems. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols*, 14: 95-104
- VINSON, J.A. et al.. 2001. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49 (11), 5315–5321
- WANG, S.Y. , STRETCH, A.W. 2001. Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *J. Agric. Food Chem.* 49: 969-974

Metalická záťaž pôdy vo vzťahu k obsahu rizikových kovov a polyfenolov v hľuzách zemiakov

Alena Vollmannová, Tomáš Tóth, Janette Musilová, Judita Bystrická

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita
v Nitre, SR*

*Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-949 76 Nitra, Slovensko*

Abstrakt

V práci sme sledovali vzájomný vzťah pôdných obsahov vybraných ťažkých kovov vo vybraných lokalitách Hontianskeho a Banskoštiavnického regiónu a ich množstiev kumulovaných v hľuzách ľuľka zemiakového pestovaného v sledovaných lokalitách. Zvýšený obsah kadmia a olova v pôde sa prejavil zvýšeným obsahom týchto kovov v hľuzách zemiakov. Stanovené hodnoty obsahu Cd a Pb niekoľkonásobne prevyšovali (Cd 0.106-0.357, Pb 0.32-0.48 mg.kg⁻¹ ČH) limitné hodnoty určené platnou legislatívou.. Naopak, zvýšený pôdny obsah Zn sa nepremietol do jeho zvýšenej kumulácie hľuzami zemiakov (Zn 1.94-6.87 mg.kg⁻¹ ČH). Obsah fenolových zlúčenín vo vzorkách zemiakov z Hontianskeho a Banskoštiavnického regiónu sa pohyboval v interval 263,59-920,38 mg.kg⁻¹ SH. Zvýšený obsah Cd a Pb mal štatisticky významný vplyv na tvorbu polyfenolov v zemiakoch, na druhej strane sme však nepotvrdili štatistickú závislosť medzi obsahom Zn a celkovým obsahom polyfenolov. Štatistickú závislosť sme však potvrdili aj medzi celkovým obsahom polyfenolov a antioxidačnou aktivitou hľúz zemiakov.

Kľúčové slová: zemiaky, cadmium, olovo, zinok, polyfenoly, antioxidačná aktivita

Úvod

Práca je venovaná tvorbe fenolových zlúčenín a antioxidačnej aktivite v hľuzách zemiakov, dopestovaných v pôdach s metalickou záťažou. Medzi lokality s vysokými obsahmi kadmia, olova, zinku, medi možno zaradiť Hontiansky a Banskoštiavnický región, ktoré sa nachádzajú na juhozápade stredného Slovenska. Táto oblasť je charakteristická dvoma typmi kontaminácie: antropickým, ktorý je spôsobený ťažbou rúd a ich spracovaním, a prirodzeným, spôsobeným zvetrávaním hornín obsahujúcich rizikové ťažké kovy (Bajčan et al., 2007). Obsahy niektorých sledovaných prvkov výrazne prekračujú legislatívou stanovené limitné hodnoty, čo z tohto pohľadu radí tieto pôdy medzi rizikové (Tóth et al., 2005). Je preto veľmi dôležité sledovať transfer ťažkých kovov z kontaminovaných pôd do poľnohospodárskych plodín v uvedenej oblasti.

Polyfenolové látky obsiahnuté v potravinách rastlinného pôvodu patria v súčasnosti k intenzívne sledovaným rastlinným komponentom. Ich vplyv na zdravie ľudí je diskutovaný na odbornej i laickej úrovni a názory, pričom názory na ich pôsobenie nie sú celkom jednotné (Vollmannová et al., 2008). Hľuzy zemiakov okrem významného množstva polyfenolov (1226-4405 mg.kg⁻¹), obsahujú i ďalšie látky s antioxidačnými účinkami – kyselinu askorbovú, karotenoidy, α -tokoferol, v menšom množstve selén či kyselinu α -lipoovú. Zo skupiny fenolové látok je najviac zastúpená kyselina chlorogénová a jej izoméry a kyselina kávová (Lachman et al., 2006).

Materiál a metódy

V odobraných pôdných vzorkách bola stanovená výmenná pôdna reakcia pH/KCl, obsahy živín a obsahy ťažkých kovov. Obsahy živín (P, K, Ca, Mg) boli stanovené metódou podľa Mehlicha (Mehlich II), pseudototálne obsahy rizikových kovov vo výluhu lúčavkou kráľovskou a obsahy mobilných foriem rizikových kovov v pôdnom extrakte NH₄NO₃ (c = 1 mol.dm⁻³). Vzorky pôdy boli odobraté v pôdnom horizonte 0-0,2 m podľa záväznej metodiky pomocou pedologickej vrtnej sondy GeoSampler fy. Fisher. Analytickou metódou stanovenia obsahov makroelementov

a rizikových kovov bola plameňová atómová absorpčná spektrometria (AAS Varian AA Spectr DUO 240FS/240Z/UltrAA).

Hľuzy ľuľka zemiakového boli zberané v čase plnej zrelosti. Po zhomogenizovaní vzoriek a nasledujúcej mineralizácii mokrým spôsobom sa metódou AAS stanovili obsahy rizikových prvkov. Totálny obsah polyfenolov (TP) bol stanovený v extraktoch lyofylizovanej vzorky 80 % etanolom modifikovanou metódou podľa Lachmana (2006) s použitím Folin-Ciocalteuovho činidla, absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 765 nm. Obsah polyfenolových látok bol vyjadrený ako obsah kyseliny gallovej a prepočítaný na sušinu. Totálna antioxidačná kapacita (TAC) bola stanovená modifikovanou metódou podľa Brand-Wiliamsa (1995) pomocou radikálu DPPH.

Výsledky a diskusia

Pôdne vzorky aj vzorky zemiakov boli odobraté zo štyroch lokalít Hontianskeho a Banskotiavnického regiónu (Terany, Hontianske Nemce, Prenčov 1, Prenčov 2). Pôdu možno charakterizovať ako stredne ťažkú, piesočnato-hlinitú, s vysokými až veľmi vysokými obsahmi živín (P 236,38-598,85; K 474,5-6874,5; Ca 2615-3520 a Mg 384,5-591,0 mg.kg⁻¹ pôdy) so slabou až kyslou pôdnou reakciou (pH/KCl 5,45-6,40). Obsahy Cd, Pb a Zn boli v porovnaní limitnými hodnotami, stanovenými Zákom č. 220/2004 niekoľko násobne vyššie, výrazné zvýšenie bolo vo vzorkách pôdy odobratej z oboch lokalít Prenčova (tab. 1).

Tabuľka I Obsah ťažkých kovov v pôde (mg.kg⁻¹)

lokalita	Extrakčné činidlo	Cd	Pb	Zn	Extrakčné činidlo	Cd	Pb	Zn
Terany	lúčavka kráľovská	1,64	97,6	212	NH ₄ NO ₃	0,032	0,235	0,125
Hontianske Nemce		1,22	87,2	184		0,035	0,24	0,155
Prenčov 1		11,72	1290	1555		0,076	0,255	3,735
Prenčov 2		10,26	1475	1385		0,068	0,25	3,20
	Limitná hodnota	0,7	70,0	150,0	Kritická hodnota	0,1	0,1	2,0

Pre väčšinu rastlín predstavujú cudzorodé prvky stresový faktor a cestou potravného reťazca následne znamenajú nebezpečenstvo pre ľudský organizmus. Pôsobenie cudzorodých prvkov na rastliny je značne variabilné. Okrem kumulácie v rastline sa môže ich vysoký obsah v pôde prejavovať depresívnym účinkom na jej rast (Hlušek et al., 2001). Z hygienického hľadiska je rozhodujúce, či sa kumulujú v častiach, ktoré sa využívajú ku konzumácii.

Najvyššia kumulácia kadmia v pôde je vo vrstve 0-50 mm od povrchu a jeho koncentrácia klesá s pribúdajúcou hĺbkou. Vzhľadom k tomu, že nemôže byť degradované, predstavuje pre pôdne prostredie dlhodobú hrozbu. Kontaminácia pôdy sa výrazne prejavila na jeho kumulácii v zemiakových hľúzach, kde okrem vzoriek odobratých z lokality Terany bola prekročená hygienická limitná hodnota stanovená PK SR (tab. 2). Pre rast a vývoj zemiakov nepredstavuje obsah kadmia v prirodzených podmienkach žiadne nebezpečenstvo, avšak pokiaľ sú pôdy kontaminované, môže sa kumulovať v zemiakových hľúzach a pri ich pravidelnej konzumácii so zvýšeným obsahom Cd dochádza k toxickému pôsobeniu na ľudský organizmus.

Olovo je zo všetkých ťažkých kovov najsilnejšie viazané špecifickými adsorpčnými procesmi a po Hg má najmenšiu pohyblivosť v pôdnom horizonte (Alloway, 1990). Napriek tomu, že zemiaky sú oveľa menej citlivé na zvýšený obsah olova v pôde, než na obsah kadmia (Hlušek et al., 1996), zaznamenali sme zvýšenie jeho obsah v hľúzach, čo je pravdepodobne ovplyvnené synergickým účinkom kadmia (Hronec et al., 2002). Zvýšený obsah kadmia a olova v pôde sa prejavil ich zvýšenou koncentráciou v hľúzach zemiakov v takej miere, že bola niekoľkonásobne prekročená

limitná hodnota stanovená platnou legislatívou. Zníženie obsahov ťažkých kovov v zemiakových hľuzách možno čiastočne dosiahnuť spracovávaním zemiakov. V prípade olova sa uplatňuje najmä ošúpanie zemiakov, zatiaľ čo vylúhovanie ovplyvňuje i obsah iných prvkov (Míča & Vokál, 1996). Zvýšenie obsahu zinku v pôde v lokalite Prenčov nad kritickú hodnotu sa neprejavilo zvýšením jeho obsahu v hľuzách zemiakov, pretože obsah zinku v hľuzách závisí od jeho obsahu v prístupnej forme v pôde, čo korešponduje s výsledkami Hlušeka et al. (1998). Najvyšší obsah Zn ($6,87 \text{ mg.kg}^{-1}$ ČH) bol v hľuzách zemiakov zo stanovišťa Prenčov 2 (tab. 2).

Tabuľka 2 Obsah ťažkých kovov v čerstvej hmote (ČH) a v suchej hmote (SH) zemiakov (mg.kg^{-1})

Lokalita	Cd		Pb		Zn	
	ČH	SH	ČH	SH	ČH	SH
Terany	0,039	0,201	0,030	0,156	5,289	27,192
Hontianske Nemce	0,106	0,493	0,318	1,478	6,100	28,371
Prenčov 1	0,357	1,946	0,361	1,969	4,939	26,916
Prenčov 2	0,256	1,354	0,483	2,556	6,868	36,336
PK SR ¹⁵	0,1		0,1		–	

Polyfenolové látky sú sekundárne rastlinné metabolity, ktoré možno nájsť v mnohých rastlinných druhoch vrátane zemiakov. Akumulujú sa v zdravom tkanive priliehajúcom k poškodenému tkanivu zemiakov ako reakcia na napadnutie patogénom. Pripúšťa sa i synergické pôsobenie medzi štrukturálne podobnými fenolovými látkami (Krištůfek et al., 2001).

Obsah polyfenolov vo vzorkách zemiakov z Hontianskeho a Banskštiavnického regiónu sa zvyšoval so zvyšujúcim sa obsahom Cd v zemiakových hľuzách. Prejavila sa i pozitívna súvislosť medzi TP a TAC (tab. 3).

Tabuľka 3 Totálny obsah polyfenolov (TP) a celková antioxidačná kapacita (TAC) vzoriek zemiakov

LOKALITA	TP (MG.KG^{-1} SH)	TAC (%)
Terany	263,59	6,27
Hontianske Nemce	423,17	7,85
Prenčov 1	920,38	10,67
Prenčov 2	835,57	9,97

Celkový obsah polyfenolov v hľuzách zemiakov bol signifikantne ovplyvnený obsahom Cd ($R = 0,961$; $P\text{-value: } 9,478 \cdot 10^{-14}$), ako aj Pb ($R = 0,864$; $P\text{-value: } 5,182 \cdot 10^{-8}$). Na druhej strane z hodnôt $R = 0,456$ a $P\text{-value: } 0,025$ vyplýva, že medzi obsahom Zn a celkovým obsahom polyfenolov bola potvrdená iba stredne silná pozitívna korelácia.

Vzhľadom k tomu, že pri vyhodnotení závislosti medzi obsahom kumulovaného zinku a obsahom polyfenolov bolo vypočítané, môžeme hovoriť iba o stredne silnej pozitívnej korelácii medzi sledovanými veličinami. Mierne zvýšenie obsahu celkových polyfenolov pri ekologickom pestovaní môže súvisieť s ich ochrannou úlohou proti škodlivým činiteľom, napr. napadnutiu mikroorganizmami (Lachman et al., 2001). Hamouz et al. (2006, 2007) zistili najvyšší obsah polyfenolov (o 5,7 až 56,3 % vyšší než v iných lokalitách) v lokalite, ktorá bola charakteristická nižšími teplotami a vyššou nadmorskou výškou, čím sa potvrdil vplyv lokality. Lachman et al. (2008) vo svojom príspevku potvrdili i signifikantný vplyv odrody. Na základe našich výsledkov predpokladáme, že zvýšený obsah fenolových zlúčenín môže byť i reakciou na také stresové

podmienky, akými sú vysoké obsahy ťažkých kovov v pôde a ich následná kumulácia v zemiakových hľuzách.

Silnú pozitívnu koreláciu sme potvrdili i medzi kumulovaným Cd a TAC ($R = 0,949$; P-value: $1,676 \cdot 10^{-12}$), kumulovaným Pb a TAC ($R = 0,883$; P-value: $1,100 \cdot 10^{-8}$) a slabú závislosť medzi kumulovaným Zn a TAC ($R = 0,464$; P-value: $0,022$).

Pozitívnu alebo negatívnu koreláciu antioxidačne pôsobiacich látok s ďalšími zlúčeninami zemiakovej hľuzy potvrdzuje André et al. (2009). Naše výsledky potvrdzujú tiež silnú pozitívnu koreláciu medzi TP a TAC ($R = 0,974$ a P-value: $1,124 \cdot 10^{-15}$). Podobne silnú koreláciu medzi TAC a obsahom TP uvádzajú Lugasi et al. (1999). Šulc et al. (2008) zase zaznamenali tendenciu zníženia hodnoty TP aplikáciou vysokých dávok draslíka a horčíka.

Lachman & Hamouz (2008) rozdelili faktory ovplyvňujúce obsah antioxidantov a antioxidačnú aktivitu zemiakov na: vnútorné, dané odrodou a vonkajšie, zahŕňajúce podmienky a spôsob pestovania, podmienky uskladnenia, kulinárske a technologické spracovanie.

Záver

V prirodzene metalicky kontaminovanej pôde, kde obsahy rizikových prvkov niekoľkonásobne prevyšujú limitné hodnoty, je riziko ich kumulácie hľuzou zemiakov evidentné, napriek tomu, že zemiaky patria k vysoko tolerantným plodinám voči metalickej záťaži. Uvedené poznatky sa potvrdili v sledovaných lokalitách Hontianskeho a Banskoštiavnického regiónu, kde obsah kadmia a olova v zemiakoch niekoľkonásobne prekročil najvyššie prípustné množstvo určené Potravinovým kódexom SR.

Vo vzorkách zemiakov z Hontianskeho a Banskoštiavnického regiónu sa so zvyšujúcim sa obsahom Cd, Pb a Zn v hľuzách štatisticky preukazne zvyšoval i celkový obsah polyfenolových látok. Potvrdila sa súčasne aj pozitívna korelácia medzi TP a TAC.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. BAJČAN D., LAHUČKÝ L., STANOVIČ R., ÁRVAY J., 2007. IX. Banskoštiavnické dni 2007, s. 33-38. Zvolen : TU Zvolen.
2. TÓTH T., TOMÁŠ J., LAZOR P., CHLPÍK J., JOMOVÁ K., HEGEDŮSOVÁ A., 2005. ChemZi, 1: 285.
3. VOLLMANNOVÁ A., TÓTH T., BYSTRICKÁ J., URMINSKÁ D., 2005. Proteins 2008, 227.
4. LACHMAN J., HAMOUZ K., ČEPL J., PIVEC V., ŠULC M., DVOŘÁK P. 2006. Chemické listy, 100: 522.
5. ZÁKON č. 220/2004 Z.z. Kritériá pre identifikáciu rizikových oblastí kontaminácie pôd a metodické postupy ich hodnotenia.
6. BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E., BERSET C., 1995. Lebensmittel – Wissenschaft and Technologie, 28: 25.
7. HLUŠEK J., ZRŮST J., JŮZL M., 2001. Bramborářství, IX: 9.
8. ALLOWAY B.J. 1990. Heavy metal in soil. Blackie and son Ltd., Glasgow, p. 1-339.
9. HLUŠEK J., RICHTER R., RŮŽIČKA A., 1996. Bramborářství, IV: 2.
10. HRONEC O., TÓTH J., TOMÁŠ J., 2002. Cudzorodé látky a ich riziká. Harlequin quality, 194.
11. MÍČA B., VOKÁL B., 1996. Bramborářství, IV: 5.
12. HLUŠEK J., JŮZL M., ZRŮST J., 1998. Úroda, 6: 21.
13. POTRAVINOVÝ KÓDEX SR (<http://www.svssr.sk/>)
14. KRIŠTŮFEK V., PELIKÁNOVÁ L., DIVIŠ J., 2001. Bramborářství IX, 4.
15. LACHMAN J., HAMOUZ K., ORSÁK M., PIVEC V., 2001. Bramborářství, IX: 6.

16. HAMOUZ K., LACHMAN J., DVOŘÁK P., JÚZL M., PIVEC V., 2006. *Plant Soil and Environment*, 52: 407.
17. HAMOUZ K., LACHMAN J., ČEPL J., DVOŘÁK P., PIVEC V., PRÁŠILOVÁ M., 2007. *Horticultural Science*, 34: 132.
18. LACHMAN J., HAMOUZ K., ŠULC M., ORSÁK M., DVOŘÁK P., 2008. *Plant Soil and Environment*, 54: 1.
19. ANDRÉ C. M., OUFIR M., HOFFMANN L., HAUSMAN J. F., ROGEZ H., LARONDELLE Y., EVERS D., 2009. *Journal of Food Composition and Analysis*, doi:10.1016/j.jfca.2008.11.010.
20. LUGASI A., AL MEIDA D.P.F., DWORSCHAK E., 1999. *Acta alimentaria*, 28: 183.
21. ŠULC M., LACHMAN J., HAMOUZ K., DVOŘÁK P., 2008. *Biological Agriculture and Horticulture*, 26: 45.
22. LACHMAN J., HAMOUZ K., 2008. Antioxidants and Antioxidant Activity of Red, Purple and Yellow-Coloured Potatoes Affected by Main Extrinsic and Intrinsic Factors. Chapter 1. In *Food Chemistry Research Developments*. Editor: K.N. Papadopoulos, Nova Science Publishers, Inc.

Vzťah celkových obsahov kadmia a zinku v zemiakových hľúzach a ich obsahov v rôznych frakciách sacharidov

Alena Vollmannová, Tomáš Tóth, Janette Musilová, Judita Bystrická

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita
v Nitre, SR*

*Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-949 76 Nitra, Slovensko*

Abstrakt

V práci sme sledovali vzťah celkových obsahov kadmia a zinku a ich obsahu v rôznych frakciách sacharidov prítomných v hľúzach zemiakov pestovaných vo vybraných lokalitách Hontianskeho a Banského štíavnického regiónu. Pôdne vzorky i vzorky zemiakov (*Solanum tuberosum*) boli odobraté na 4 odberných miestach (Terany, Hontianske Nemce, Prenčov-1, Prenčov-2). Pôdne obsahy Cd a Zn, stanovené v extraktoch lúčavkou kráľovskou, prekročovali na všetkých odberných miestach legislatívou stanovené limitné hodnoty pre Cd ($0,7 \text{ mg.kg}^{-1}$) a pre Zn ($150,0 \text{ mg.kg}^{-1}$). Obsah zinku, stanovený vo výluhu NH_4NO_3 , bol v porovnaní s kritickou hodnotou viac ako 1,5-násobne vyšší vo vzorkách pôd z odberných miest Prenčov-1 a Prenčov-2 (kritická hodnota pre Zn: $2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ pôdy). Zvýšené obsahy sa potvrdili iba v prípade Cd ($0,106\text{--}0,357 \text{ mg.kg}^{-1}$ ČH) v zemiakoch z odberných miest Hontianske Nemce, Prenčov-1, Prenčov-2. Okrem celkových obsahov Cd a Zn v zemiakových hľúzach boli tieto ťažké kovy stanovené i vo frakcii vodorozopustných sacharidov (VRS) a nerozpustných sacharidov (NRS). Obsah VRS bol v rozmedzí od 0,32 do 2,33 % a obsah NRS od 12,74 do 16,56 % v zemiakoch zo všetkých 4 odberných miest. Medzi obsahom Cd v ČH a v oboch sacharidových frakciách je silná štatistická závislosť (VRS: $R = 0,878$; $P\text{-value} = 1,686 \cdot 10^{-8}$, NRS: $R = 0,956$; $P\text{-value} = 3,387 \cdot 10^{-13}$). Medzi kumuláciou Zn v ČH a vo frakcii VRS sa nepotvrdila štatisticky preukazná závislosť a medzi obsahom Zn v ČH a v NRS je slabá negatívna korelácia ($P\text{-value} = 0,047$).

Kľúčové slová: zemiaky, kadmium, zinok, sacharidy, kontaminácia

Úvod

Zemiaky majú význam nielen v ľudskej výžive, ale i v spracovateľskom priemysle. Vo výžive človeka plnia zemiaky predovšetkým objemovú, sýtiacu a ochrannú funkciu. V prirodzenom stave obsahujú približne 75 % vody, pričom hlavný podiel sušiny (asi 75 %) tvorí škrob. Sú zdrojom bielkovín, minerálnych látok, vitamínov, polyfenolov a minimálneho množstva tukov. Dôležitým faktorom pre producentov aj konzumentov zemiakov je okrem výnosu hľúz aj ich vonkajšia a vnútorná kvalita. Kvalitu zemiakov, zahŕňajúcu ich zdravotnú nezávadnosť, ovplyvňuje mnoho faktorov. Nie je teda daná iba zložkami významnými vo výžive človeka, ale i látkami nežiaducimi. Do skupiny takýchto látok sa zaraďujú i ťažké kovy, ktoré v nízkych koncentráciách môžu vykazovať stimulačný vplyv na rast rastlín, avšak vo vysokých dávkach často pôsobia toxicky (Hlušek et al., 1998a). Zemiaky možno zaradiť do skupiny rastlín tolerantných k zvýšeným hladinám cudzorodých prvkov v pôde (Hlušek et al., 1996). K najzávažnejším kontaminantom životného prostredia sa zaraďuje kadmium. Z hľadiska prestupu do rastlín má kadmium vyššiu prijateľnosť ako olovo, meď a zinok. Na rastliny môže pôsobiť ako stresový faktor vyvolávajúci fyziologické zmeny, ktoré môžu vyústiť do inhibície rastu až vyhynutia rastliny. Zinok v optimálnom koncentračnom intervale patrí k esenciálnym prvkom pre rastlinný aj živočíšny organizmus. V rastlinách sa akumuluje prevažne v koreňoch, vo vyšších koncentráciách je fyto toxický (Tomáš, Hronec et al., 2007).

Vysoké obsahy zinku v rastlinných pletivách inhibujú funkciu proteínov, obsahujúcich iné kovy, ktoré sú substituované zinkom (Broadley et al., 2007; Malakouti et al., 2007).

Materiál a metódy

Vzorky pôdy aj rastlinného materiálu boli odobraté zo 4 odberných miest v lokalite Hontianskeho a Banskštiavnického regiónu (Terany, Hontianske Nemce, Prenčov 1, Prenčov 2), ktoré sa nachádzajú v okolí rieky Štiavnice, odvodňujúcej značnú časť Štiavnických vrchov. Významným transportným médiom ťažkých kovov je práve rieka Štiavnica, ktorá pramení v oblasti Štiavnických vrchov. Do nej sa dostávajú priesaky z banských šácht a hald a tým aj značné množstvo rizikových kovov, ktoré pri záplavách kontaminovali priľahlé aluviálne pôdy. V odobraných pôdnych vzorkách bola stanovená agrochemická charakteristika pôdy (aktívna pôdna reakcia pH/H₂O a výmenná pôdna reakcia pH/KCl), obsahy živín (P, K, Ca, Mg) boli stanovené metódou podľa Mehlicha (Mehlich II), a obsahy ťažkých kovov: pseudototálne obsahy rizikových kovov vo výluhu lúčavkou kráľovskou (Zákon 220/2004) a obsahy mobilných foriem rizikových kovov (Zákon 220/2004 – kritické hodnoty vo vzťahu pôda – rastlina) v pôdnom extrakte NH₄NO₃ (c = 1 mol.dm⁻³). Vzorky boli odobraté v pôdnom horizonte 0 – 0,2 m podľa záväznej metodiky pomocou pedologickej vrtnéj sondy GeoSampler fy. Fisher. Analytickou metódou stanovenia obsahov makroelementov a rizikových kovov bola plameňová atómová absorpčná spektrometria (AAS Varian AA Spectr DUO 240FS/240Z/UltrAA). Výsledky sa vyhodnotili v zmysle príslušných legislatívnych predpisov.

Skúmanou plodinou bol ľuľok zemiakový (*Solanum tuberosum* L.), odroda Adora (veľmi skorá odroda), zberala sa v konzumnej zrelosti. Obsahy Cd a Zn v hľúzach ľuľka zemiakového boli stanovené po zhomogenizovaní vzoriek a nasledujúcej mineralizácii mokrým spôsobom metódou AAS. Frakcie obsahujúce rozpustné sacharidy (RS) a nerozpustné sacharidy (NRS) boli izolované sekvenčnou analýzou z lyofyilizovanej a delipidovanej vzorky postupnou extrakciou a zrážaním nasledovnými činidlami: dest. voda, NaCl (c = 1 mol.dm⁻³) v fosforečnanovom pufri (c = 0,1 mol.dm⁻³), 70 % etanol, NaOH (c = 0,05 mol.dm⁻³); Z: octan olovnatý, tanín. NRS a popoloviny boli mineralizované koncentrovanou HNO₃ a v mineralizáte boli stanovené obsahy rizikových kovov. Jednotlivé frakcie boli separované modifikovanou metódou podľa Osborne (Michalík, 1982), obsahy rizikových prvkov boli stanovené metódou AAS.

Výsledky a diskusia

Pôdu odobratú na jednotlivých stanovištiach možno charakterizovať ako stredne ťažkú, piesočnato-hlinitú, s vysokými až veľmi vysokými obsahmi živín a so slabo kyslou až kyslou pôdnou reakciou (tab. 1).

Tabuľka 1 Obsah živín v mg.kg⁻¹ v pôde a pôdna reakcia

lokalita	pH/H ₂ O	pH/KCl	P	K	Ca	Mg
Terany	8,55	6,40	338,32	474,5	2675	459,5
Hontianske Nemce	7,51	6,15	460,19	6874,5	3520	591,0
Prenčov 1	7,45	5,45	236,38	794,5	2615	384,5
Prenčov 2	7,51	5,74	598,85	1032,5	3190	497,5

Obsahy Cd, Pb, Zn a Cu boli v porovnaní limitnými hodnotami, stanovenými Zákonom č. 220/2004 niekoľko násobne vyššie, výrazné zvýšenie bolo vo vzorkách pôdy odobratej z lokality Prenčov, kde bol obsah kadmia 16,7-násobne vyšší ako je limitná hodnota pre tento prvok a obsah zinku 10,4-násobne vyšší v porovnaní s limitnými hodnotami.

Kritické hodnoty, stanovené pre zinok, boli prekročené v pôde odobratej z lokality Prenčov 1, Prenčov 2 1,6 – 1,87-násobne (tab. 2).

Tabuľka 2 Obsah ťažkých kovov v mg.kg^{-1} v pôde

lokalita	Extrakčné činidlo	Cd	Zn	Extrakčné činidlo	Cd	Zn
Terany	lúčavka kráľovská	1,64	212	NH_4NO_3 ($c = 1 \text{ mol.dm}^{-3}$)	0,032	0,125
Hontianske Nemce		1,22	184		0,035	0,155
Prenčov 1		11,72	1555		0,076	3,735
Prenčov 2		10,26	1385		0,068	3,20
	Limitná hodnota	0,7	150,0	Kritická hodnota	0,1	2,0

Pre väčšinu rastlín predstavujú cudzorodé prvky stresový faktor a cestou potravinového reťazca následne znamenajú nebezpečenstvo pre ľudský organizmus. Pôsobenie cudzorodých prvkov na rastliny je značne variabilné. Okrem kumulácie v rastline sa môže ich vysoký obsah v pôde prejavovať depresívnym účinkom na jej rast (Hlušek et al., 2001). Z hygienického hľadiska je rozhodujúce, či sa kumulujú v častiach, ktoré sa využívajú ku konzumácii. Kontaminácia pôdy sa výrazne prejavila na jeho kumulácii v zemiakových hľuzách, kde okrem vzoriek odobratých z lokality Terany bola prekročená hygienická limitná hodnota stanovená PK SR (Hontianske Nemce: 1,1-násobne, Prenčov 1: 3,6-násobne, Prenčov 2: 2,6-násobne). Zníženie obsahov ťažkých kovov v zemiakových hľuzách možno čiastočne dosiahnuť spracovávaním zemiakov. V prípade olova sa uplatňuje najmä ošúpanie zemiakov, zatiaľ čo vylúhovanie ovplyvňuje i obsah iných prvkov (Míča & Vokál, 1996). Zvýšenie obsahu zinku v pôde v lokalite Prenčov nad kritickú hodnotu sa neprejavilo zvýšením jeho obsahu v hľuzách zemiakov, pretože obsah zinku v hľuzách závisí od jeho obsahu v prístupnej forme v pôde, čo korešponduje s výsledkami Hlušeka et al. (1998b). Najvyšší obsah Zn ($6,87 \text{ mg.kg}^{-1}$ ČH) bol v hľuzách zemiakov zo stanovišťa Prenčov 2 (tab. 3).

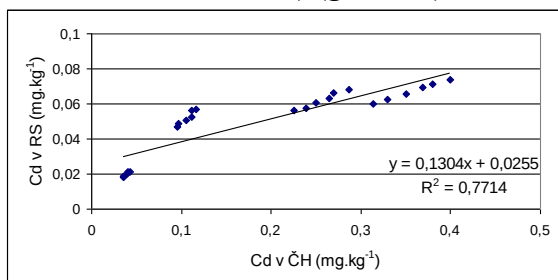
Obsahy sacharidových frakcií sa pohybovali v rozmedzí od 0,32 do 2,33 % (vodorozpustné sacharidy) a od 12,74 do 16,56 % (nerozpustné sacharidy (tab. 3). Zvýšené obsahy Cd a Zn v čerstvej hmote do určitej miery korešpondovali so zvýšenými obsahmi týchto ťažkých kovov v sacharidových frakciách (Cd RS: 0,020-0,067; NRS: 0,017-0,039 mg.kg^{-1} ČH, Zn RS: 1,429-2,999; NRS: 0,404-0,750 mg.kg^{-1} ČH). Najvýraznejší rozdiel v kumulácii ŤK v sacharidovej frakcii bol medzi obsahmi Cd v RS z lokalít Terany a Prenčov 2.

Tabuľka 3 Obsah sacharidových frakcií a obsah ŤK vo frakcii RS a NRS v 1 kg ČH zemiakov z Hontianskeho a Banskštiavnického regiónu (mg.kg^{-1})

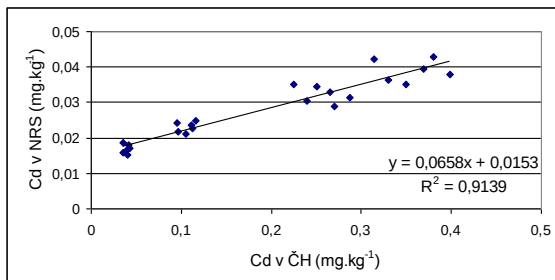
lokalita	Cd v ČH	Zn v ČH	% VRS	Cd v RS	Zn v RS	% NRS	Cd v NRS	Zn v NRS
Terany	0,039	5,28 9	2,33	0,020	1,771	14,54	0,017	0,517
Hontianske Nemce	0,106	6,10 0	1,06	0,052	2,999	16,56	0,023	0,404
Prenčov 1	0,357	4,93 9	1,04	0,067	2,006	12,74	0,039	0,750
Prenčov 2	0,256	6,86 8	0,32	0,062	1,429	14,32	0,032	0,621
PK SR*	0,1	10,0						

* Potravinový kódex SR

Medzi obsahom kadmia v ČH a vo frakciách sacharidov je silná pozitívna korelácia (RS: $R = 0,878$; NRS: $R = 0,956$) (graf 1, 2).

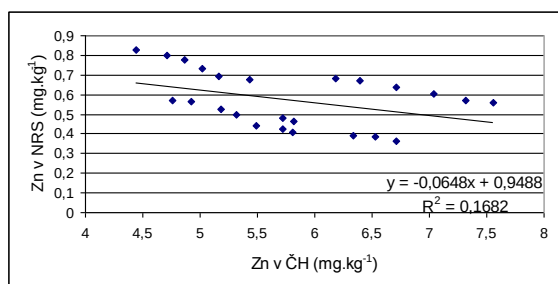


Graf 1 Závislosť obsahu Cd v RS od celkového Cd kumulovaného v zemiakoch (mg.kg^{-1} ČH)



Graf 2 Závislosť obsahu Cd v NRS od celkového Cd kumulovaného v zemiakoch (mg.kg^{-1} ČH)

Kumulácia zinku nemala štatisticky preukazný vplyv na jeho kumuláciu vo frakcii RS ($R = 0,000$; P-value = 0,930), medzi obsahom Zn v ČH zemiakoch a v NRS je slabá negatívna korelácia ($R = 0,410$; P-value = $4,651 \cdot 10^{-2}$) (graf 3).



Graf 3 Závislosť obsahu Zn v NRS od celkového Zn kumulovaného v zemiakoch (mg.kg^{-1} ČH)

Kultúrne plodiny (niekedy i odrody) sa líšia svojimi požiadavkami a citlivosťou na mikroelementy. Existujú i rozdiely v ich schopnosti prijímať tieto prvky z pôdy, čo sa prejavuje v minerálnom zložení jednotlivých rastlinných orgánov. Ich obsah v hľúzach zemiakov je veľmi významný ako z hľadiska nutričného, tak i hygienického. Pokiaľ dosiahne vyššie hodnoty, môžu mať tieto prvky negatívny dopad na rastlinu i zdravie človeka (Hlušek et al., 1998b).

Záver

Jednou z možností vstupu uvedených rizikových kovov ľudského organizmu je ich príjem potravou. Ak je významným podielom stravy potravina s ich zvýšenou kumuláciou, môže jej konzumácia znamenať riziko pre zdravie človeka. Zemiaky sú v strave našej populácie zastúpené vo výraznej miere, a preto je nevyhnutné dôsledne monitorovať vstup rizikových prvkov do ich hľúz, ako aj špecifikovať kumuláciu ťažkých kovov v jednotlivých komponentoch hľuzy ľulka zemiakového. Poznanie týchto skutočností môže byť východiskom pre ďalší výskum v oblasti šľachtiteľstva, ako aj potravinárstva.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. BROADLEY, M. – WHITE, P.J. – HAMMOND, J.P. – ZELKO, I. – LUX, A. 2007. Zinc in plants. In *New Phytology*, 173, 2007, 4, s. 677-702.
2. HLUŠEK, J. – RICHTER, R. – RŮŽIČKA, A. 1996. Vliv různého hnojení na výnos a kvalitu brambor. In *Bramborářství*, roč. IV, r. 1996, č. 4, s. 2-5. ISSN 1211-2429.
3. HLUŠEK, J. – JŮZL, M. – ZRŮST, J. 1998a. Iron, manganese and copper content in tubers of very early potato varieties. In *Rostlinná výroba*, vol. 44, 1998, č. 1, s. 1-5. ISSN 0370-663X.
4. HLUŠEK, J. – JŮZL, M. – ZRŮST, J. 1998b. Kvalita brambor v závislosti na odrůdě, hnojení a lokalitě pěstování. In *Úroda*, No 6, p. 21-25. ISSN 0139-6013.
5. HLUŠEK, J. – ZRŮST, J. – JŮZL, M. 2001. Obsah kadmia, arsenu a berylia v rostlinách brambor při rozdílných hladinách těchto prvků v půdě. In *Bramborářství*, roč. IX, r. 2001, č. 1, s. 9-12. ISSN 1211-2429.
6. MALAKOUTI, M.J. – BYBODI, A. – RANJBAR, R. – NOURI, A.A. 2007. The Role of Zinc (Zn) and Potassium (K) on the Reduction of Nitrate (NO₃) and Cadmium (Cd) Contaminants in Potato and Onion. In *Zinc crops 2007*, Improving crop production and human health. 24-26. May, Istambul, Turkey.
7. MÍČA, B. – VOKÁL, B. 1996. Technologická hodnota brambor. In *Bramborářství*, roč. IV, r. 1996, č. 5, s. 5-8. ISSN 1211-2429.
8. MICHALÍK, I. 1982. *Návody na cvičenia z biochémie a fyziológie rastlín*. Vyd. VŠP : Nitra, 2. neprepracované vydanie. 1982, 164 s.
9. TOMÁŠ, J. – HRONEC, O. et al. 2007. *Poškodzovanie pôd a rastlín ľudskými činnosťami*. (Monografia). Vyd. SPU : Nitra, 2007, 110 s. ISBN 978-80-8069-902-4.
10. ZÁKON č. 220/2004 Z.z. Kritériá pre identifikáciu rizikových oblastí kontaminácie pôd a metodické postupy ich hodnotenia.

Analýza biotechnologicky významnej látky biosenzorom

Tkáč Ján*, Šefčovičová Jana, Gemeiner Peter

*Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra*

**Jan.Tkac@savba.sk*

Kľúčové slová

Biosenzor, sorbitoldehydrogenáza, ampérometrické stanovenie, D-sorbitol, biotechnologický process

Úvod

Biotechnológia, ktorá využíva vedecké a inžinierske prístupy na výrobu rôznych produktov s využitím biologických objektov sa v súčasnosti považuje za technológiu, ktorá výrazným spôsobom redukuje našu závislosť na neobnoviteľných zdrojoch a je teda kľúčovou technológiou vedúcou k trvale udržateľnému rozvoju spoločnosti.¹ Okrem toho, že biotechnológia je komplementárnou k chemickej produkcii širokej palety látok (vitamíny, aminokyseliny, organické kyseliny), umožňuje produkovať látky, ktoré nie je možné pripraviť klasickými chemickými procesmi (napr. antibiotiká a proteíny). Len trh výroby antibiotík je odhadovaný na 30 miliárd dolárov a produkcia rekombinantných proteínov, vakcín a protilátok je odhadovaná na 40 miliárd dolárov.¹ Produkcia rekombinantných proteínov nielen znižuje cenu produkcie, ale zároveň zvyšuje reprodukovateľnosť ich prípravy s možnosťou purifikácie v jednom kroku a výrazným spôsobom znižuje variáciu výťažku počas purifikácie.²

Príroda vytvorila veľmi efektívne a presné spôsoby kontroly biologických procesov. Veľkou výzvou pre nás je preniesť tieto princípy do prípravy technicky aplikovateľných a presných analytických nástrojov, ktoré môžu byť využité na rozličné účely. Monitorovanie bioprocessu je kľúčovým faktorom zabezpečujúcim skrátenie času produkcie, zvyšujúcim kvalitu a produktivitu procesu. Dôraz na kvalitu výsledného produktu sa kladie hlavne pri následnom využití v klinických alebo terapeutických aplikáciách. Na sledovanie dôležitých parametrov bioprocessu (pH, O₂, živiny, substrát, otáčky, hustota buniek) je využívaných viacero prôb s možnosťou riadenia procesu spätnou väzbou, keď je možné tieto hodnoty držať v rámci optimálneho rozmedzia.³ Biosenzory sa pri využití v monitorovaní biotechnologických procesov nestratili a využívajú sa rutinne na stanovenie nízko molekulových látok (glukóza, glutamín, kys. mliečna) a to dokonca aj v priemyselných procesoch (firmy Ciba-Geigy, Degussa/Fermas, Merck, Novo Nordisk).³

Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie ako sorbitoldehydrogenáza, diaforáza, dialyzačná membrána a NAD⁺ boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko).

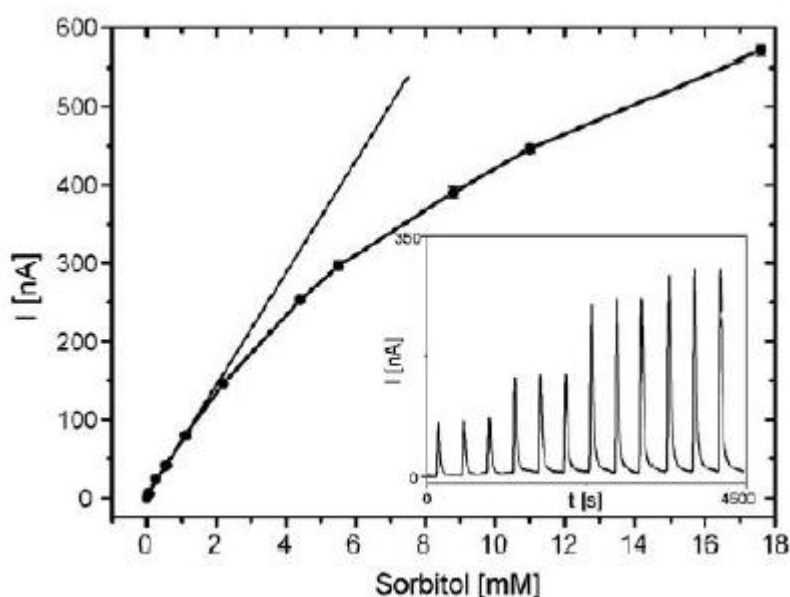
Výsledky a diskusia

Vitamín C (kyselina askorbová) je takmer výlučne produkovaný s využitím biotransformačného kroku, ktorým je oxidácia D-sorbitolu na L-sorbózu bunkami *G. oxydans* s celosvetovou produkciou 60 000 ton.⁴ Je to teda veľmi zaujímavý bioprocess, ktorý bol monitorovaný biosenzorom s využitím SDH a diaforázy (DP). Prístup využíva prídavný

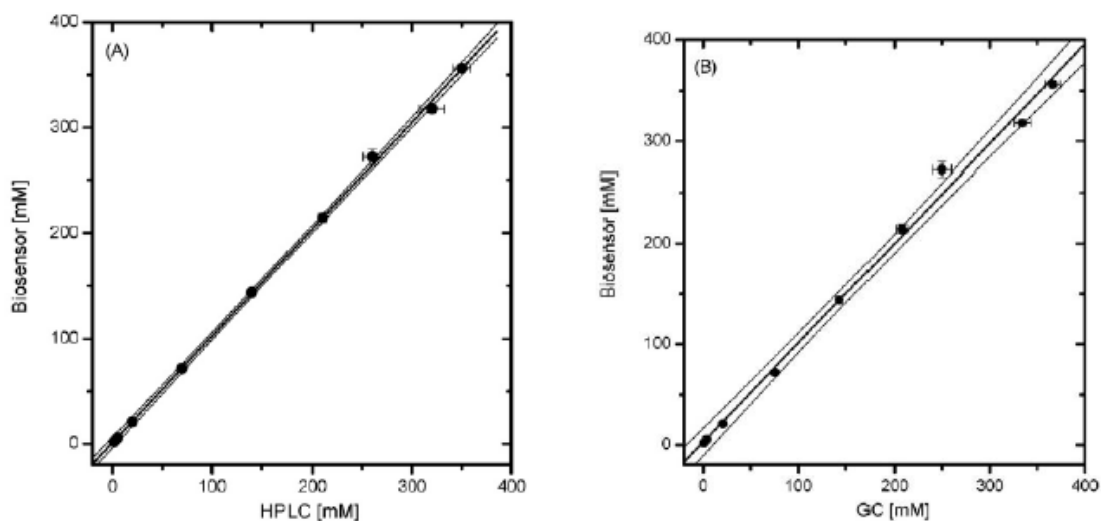
enzým DP na efektívnu oxidáciu kofaktoru dehydrogenázy (NADH) s využitím rozpustného mediátora (ferikyjanidu) a jednoduchej imobilizácie enzýmov pod dialyzačnou membránou s kalibračnou krivkou zobrazenou na *Obr. 1*. Takýto concept mal operačné charakteristiky porovnateľné s publikovanými biosenzormi na stanovenie D-sorbitolu, ale jeho relatívne nízka stabilita nebola kompatibilná s on-line monitorovaním procesu. Preto bol D-sorbitol stanovený vo vzorkách odobratých z bioprocessu off-line a ich analýza biosenzorom bola podrobená porovnaniu s dvomi referenčnými metódami GC (smernica 0,97, $R^2=0,999$) a HPLC (smernica 0,99; $R^2=0,999$, *Obr. 2*). Oba tieto výsledky potvrdzujú, že biosenzor fungoval spoľahlivo.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



Obr.1.: Kalibračná krivka biosenzora na stanovenie D-sorbitolu v prietokovom systéme (FIA).



Obr.2.: Porovnanie analýzy D-sorbitolu zo vzoriek odobratých z biotechno logického soôsobu ko nverzie D-sorbitolu na Lsorbózu biosenzorom a kvapalinovou chromatografiou HPLC (A) a plynovou chromatografiou GC (B)

Literatúra

- 1 Gavrilescu M., Chisti Y., *Biotechnol. Adv.* **2005**, 23, 471.
- 2 Gemeiner P., Mislovičová D., Tkáč J., Švitel J., Pätoprstý V., Hrabárová E. a kol., *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27, 1.
- 3 Junker B.H., Wang H.Y., *Biotechnol. Bioeneg.* **2006**, 95, 226.
- 4 De Muynck C., Pereira C.S.S., Naessens M., Parmentier S. a kol., *Crit. Rev. Biotechnol.* **2007**, 27, 147.

Využitie zlatých nanočastíc pri konštrukcii lektínového biosenzora

Bertók Tomáš*, Tkáč Ján

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra
*chemtobe@savba.sk

Kľúčové slová

Biosenzor, lektín, glykoproteín, zlato, nanočastica, samousporiadaná monovrstva

Úvod

Nanomateriály sú pre svoje unikátne vlastnosti, často lišiac sa od tých ktoré vykazujú ich makroskopické analógy, hojne využívané vo výskumných aplikáciách aj praxi. Medzi často využívané patria zlaté nanočastice, ktoré vynikajú – okrem svojich unikátnych optických vlastností, aj katalytickými vlastnosťami a reaktivitou. Zvýšenie povrchu, ktoré je dôsledkom modifikácie tohoto povrchu pomocou nanočastíc, má výrazne pozitívny vplyv na zvýšenie citlivosti biosenzorov kvôli zvýšeniu imobilizačnej plochy. Sférický model zlatých nanočastíc navyše poskytuje možnosť (oproti planárnym povrchom) v prípade imobilizácie veľkých molekúl bioselektora (napr. proteíny) aplikovať medzi tieto molekuly väčšiu vzdialenosť a sprístupniť tak biorozpoznávacie miesta pre analyt¹. Glykány sú molekuly určujúce funkciu ale aj iné vlastnosti svojich biologických nosičov. Proteíny schopné špecificky interagovať s určitými sacharidickými štruktúrami sa nazývajú lektíny. Tieto proteíny sú často izolované z prírodných zdrojov, najmä rastlín. Je možná ale aj ich príprava pomocou rekombinantných buniek, či príprava tzv. umelých lektínov (boronolektíny). V súčasnosti existuje niekoľko metód vyvinutých na detekciu glykánových štruktúr zahŕňajúcich lektíny. Práve príprava lektínových biosenzorov a biočipov v sebe zahŕňa možnosť uplatnenia nanomateriálov – najmä v kombinácii so samousporiadanými monovrstvami (SAM), schopnými veľmi citlivo kontrolovať hustotu, prípadne orientáciu bioselektora v nanoškále². Osvedčený systém dvoch glykoproteínov – fetuínu s vysokým obsahom kyseliny N-acetylneuramínovej (8,7% kys. sialovej) a asialofetuínu ($\leq 0,5\%$ kys. sialovej) slúžil ako analyt pre lektín izolovaný z bazy čiernej (*Sambucus nigra* lektín I). Po imobilizácii lektínu následovalo blokovanie nešpecifických interakcií pomocou PVA. S využitím nanočastíc sa dosiahla vysoká citlivosť a detekčný limit na úrovni attomolárných koncentrácií, spolu s lineárnym rozsahom presahujúcim niekoľko poriadkov.

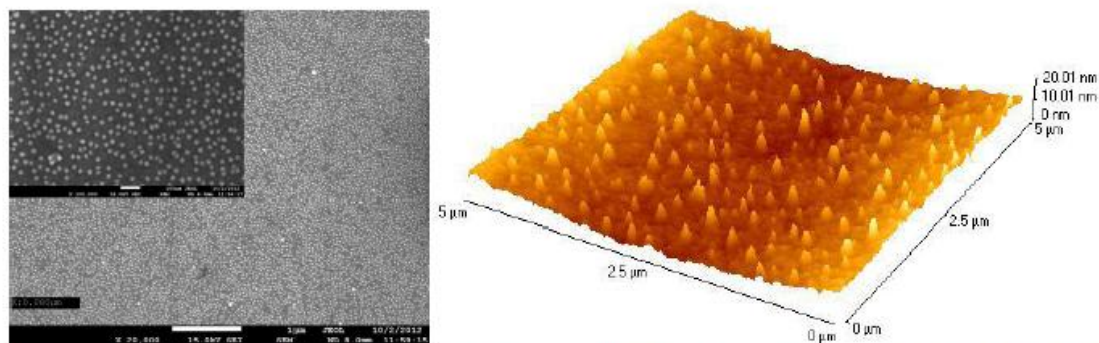
Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie, vrátane roztokov rôzne veľkých zlatých nanočastíc v citrátovom pufrí boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Lektín SNA-I bol zakúpený v spoločnosti Genta (Belgicko). Zlaté elektródy a zlaté čipy použité v tejto práci sú zo spoločnosti BAS (USA), resp. Litcon (Švédsko). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redistilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko). Pri príprave SAM vrstiev sa použili anaeróbne pripravené 1 mM roztoky alkántiolov v etanole pre UV/VIS spektroskopiu (Slavus, Bratislava).

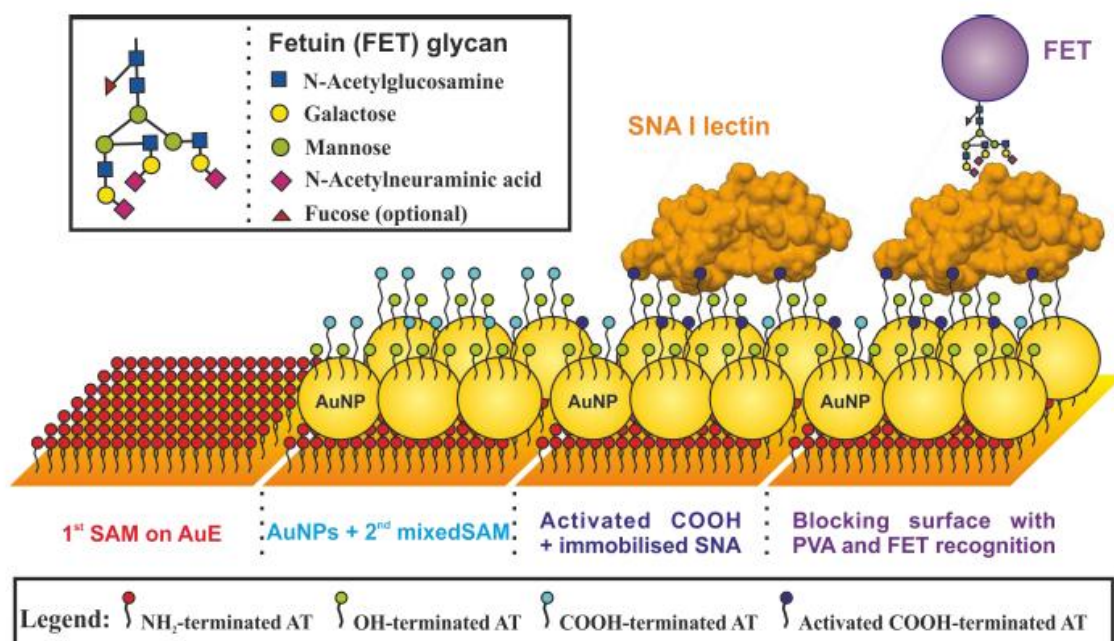
Výsledky a diskusia

V prvom kroku bola na zlatom povrchu pripravená monovrstva nanočastíc s využitím aminoalkántiolov s rôznou dĺžkou reťazca (C2, C6 a C11). Na monovrstve nanočastíc sa ďalej

vytvorila druhú, zmesnú SAM vrstvu, ktorá slúžila na imobilizáciu biorozpoznávacích elementov. Po blokovaní bol takto pripravený biosenzor použitý na detekciu glykoproteínov v roztoku. Citlivú metódu pre detekciu glykoproteínov predstavuje elektrochemická impedančná spektroskopia. Merania sa uskutočňovali pomocou systému troch elektród – pracovná (modifikovaná) zlatá elektróda, pomocná platinová a referenčná Ag/AgCl elektróda, v roztoku rozpusteného elektrochemického mediátora s negatívnym nábojom. Inkubácia biosenzora s roztokom analytu prebiehala pri laboratórnej teplote za občasného premiešania, sterilne, približne 30 minút.

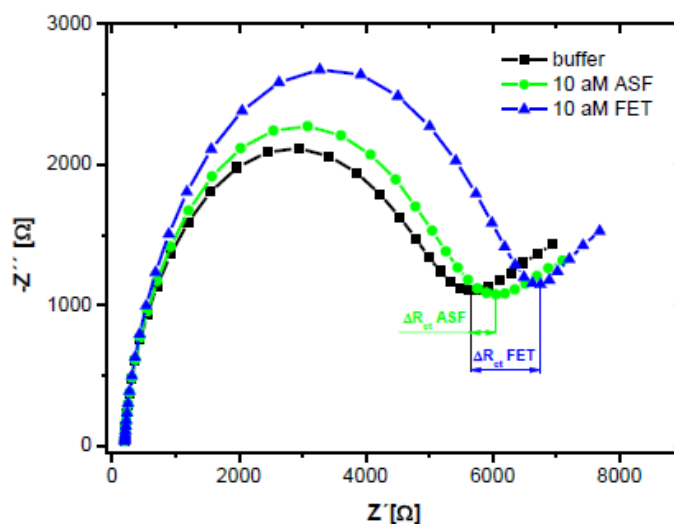


Obr.1.: Zlaté nanočastice s priemerom 20 nm pod skenovacím elektrónovým mikroskopom na zlatom čípe (vľavo). Zlaté nanočastice s priemerom 5 nm pod AFM mikroskopom (vpravo).



Obr.2.: Schéma jednotlivých krokov prípravy vyššie opísaného biosenzora.

Pripravený biosenzor vykazoval vysokú citlivosť na špecifický analyt fetuín ($338 \pm 11 \, \Omega$ / poriadok) a na druhý analyt asialofetuín ($109 \pm 10 \, \Omega$ / poriadok, s nižším obsahom kyseliny sialovej). Ako kontrola bol použitý chemicky oxidovaný asialofetuín ($79 \pm 13 \, \Omega$ / poriadok). Nielen že bol nami pripravený biosenzor schopný ultracitlivej detekcie, ale dokázal dokonca rozlíšiť rôzne zastúpenie kyseliny sialovej v glykánových štruktúrach stanovovaných glykoproteínov. Takto pripravený biosenzor je možné využiť i v biotechnológii pri kontrole kvality produkovaných rekombinantných proteínov, ktoré sú často glykozylované.



Obr.3.: Zvyšovanie odporu vrstvy voči prenosu elektrického náboja (reprezentovaného polkruhom Nyquistovho plotu) v závislosti na inkubácii biosenzora s roztokmi analytu. Odpor čistého biosenzora (čierna), nárast odporu po inkubácii s asialofetuínom (zelená) a následný nárast po inkubácii s fetuínom (modrá).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Bertok T., Sediva A., Katrlík J., Gemeiner P., Mikula M., Tkac J.: Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using go 1d nanoparticles, Talanta, zaslané
 - 2 Gooding J.J., Mearns F., Yang W., Liu J.: Self-assembled monolayers into the 21st century: Recent advances and applications, Electroanalysis 15 (2003) 81-94
- Gooding J.J., Darwish N.: The rise of self-assembled monolayers for fabricating electrochemical biosensors-an interfacial perspective, The Chemical Record 12 (2012) 92-105

Využitie entalpického prevodníka pri analýze dihydroxyacetónu počas biotechnologickej transformácie z glycerol

Tkáč Ján*, Gemeiner Peter

*Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra*

*[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)*

Kľúčové slová

Biosenzor, galaktózaoxidáza, entalpické stanovenie, glycerol, dihydroxyacetón, biotechnologický proces

Úvod

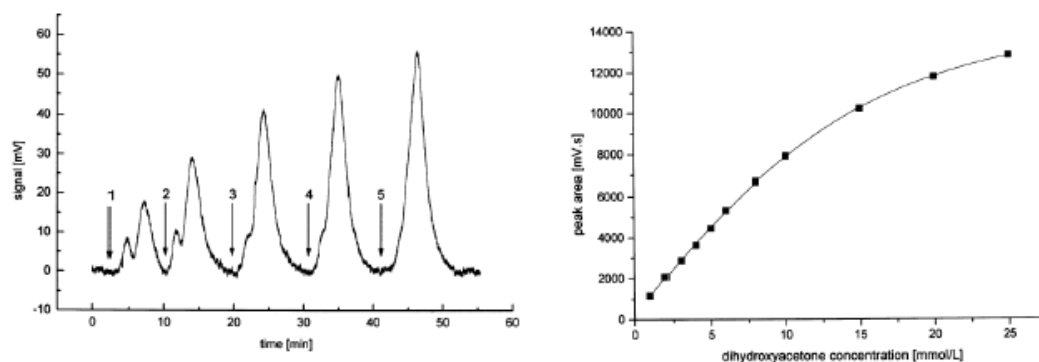
Galaktózaoxidáza (GalOD) je veľmi zaujímavým enzýmom, ktorého aktívne centrum bolo veľmi dlho záhadou, s unikátnou kombináciou kovu (Cu^{+2}) s tyrozínovým radikálom.¹ Tento enzým nie je substrátovo špecifický a dokáže okrem galaktózy oxidovať aj ďalšie látky ako polyoly (dihydroxyacetón) prípadne vyššie molekulové sacharidy s terminálnou galaktózou (napr. laktóza). Uvoľňovaním alebo spotrebou tepla sú sprevádzané mnohé biochemické deje vrátane biokatalytických procesov (oxidáciou glukózy glukózaoxidázou sa uvoľní 80 kJ mol⁻¹) a preto je možné tento typ detektora využiť, či už v kombinácii s enzýmami alebo mikrobiálnymi bunkami, pri konštrukcii biosenzorov.^{2,3} Tento typ prevodníka je schopný detegovať zmeny v teplote rádovo 10⁻³ °C a stanovovať koncentrácie látok rádovo v mM. Tento prevodník je skonštruovaný v dvojkanálovej konfigurácii, pričom signál zaznamenaný v kolónke s imobilizovaným biorozpoznávacím elementom je automaticky odčítaný od signálu nameraného v referenčnej kolónke bez imobilizovaného biorozpoznávacieho elementu. Týmto spôsobom je možné výrazným spôsobom zvýšiť selektivitu stanovenia odfiltrovaním nešpecifického signálu. Takýto biosenzor s imobilizovanou galaktózaoxidázou bol využitý na monitorovanie dihydroxyacetónu počas biotechnologického procesu.

Materiály a metódy

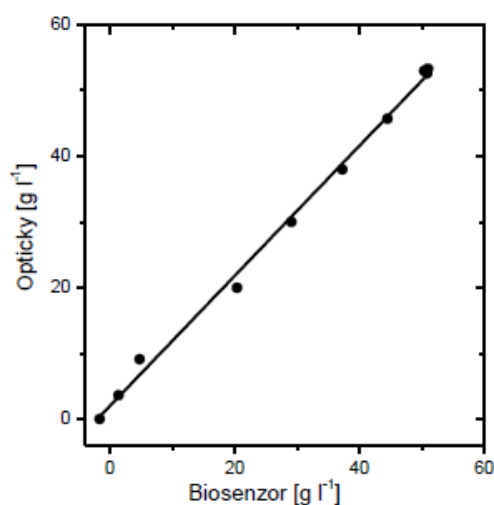
Všetky použité chemikálie ako zložky médií pre baktérie, galaktózaoxidáza, dialyzačná membrána a ďalšie boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 □S). Kalorimetrické merania, sa uskutočnili na enzýmovom termistore.

Výsledky a diskusia

Dihydroxyacetón (DHA) sa používa pri výrobe samoopaľovacích krémov, prípadne ako nutričný doplnok. DHA je možné vo vysokých výťažkoch pripraviť oxidáciou glycerolu viacerými kmeňmi octových baktérií (*Gluconobacter* alebo *Acetobacter*) a tento biotransformačný proces bol off-line monitorovaný galaktózaoxidázovými biosenzormi. Kalorimetrický princíp stanovenia je zaťažený väčšou chybou stanovenia DHA v počiatočných hodinách biotransformácie v porovnaní s ampérometrickým prevodníkom. To môže byť spôsobené vyššou citlivosťou stanovenia DHA ampérometricky (detekčný limit 0,8 □M), keď táto metóda umožňuje vzorku výrazne nariediť, čo znižuje koncentrácie možných interferujúcich látok. Reálny záznam merania kalorimetrickým biosenzorom spolu s typickou kalibračnou krivkou sú znázornené na Obr. 1. Mierna interferencia glycerolu na stanovenie DHA kalorimetricky sa prejavila aj v korelačnom koeficiente validácie metódy voči referenčnej metóde ($R^2=0,996$) (Obr. 2).



Obr.1.: Reálny záznam merania dihydroxyacetónu kalorimetrickým biosenzorom (vľavo) a kalibračná čiara biosenzora (vpravo).



Obr.2.: Validácia entalpického biosenzora referenčnou analytickou metódou s využitím spektrofotometrického stanovenia.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Whittaker J.W., *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2347.
- 2 Ramanathan K., Danielsson B., *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 417.
- 3 Ramanathan K., Rank M., Svitel J., Dzgoev A., Danielsson B., *Trends Biotechnol.* **1999**, 17, 499.

Využitie biosenzora na báze CNT nanokompozitu pri monitorovaní biotechnologického procesu etanolovej fermentácie

Tkáč Ján*, Filip Jaroslav, Šefčovičová Jana, Gemeiner Peter

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-94976 Nitra

**Jan.Tkac@savba.sk*

Kľúčové slová

Biosenzor, *Gluconobacter oxydans*, ampérometrické stanovenie, etanol

Úvod

Pri konštrukcii biosenzorov je veľmi dôležité optimalizovať zloženie vrstiev slúžiacich na modifikáciu elektród, na zvýšenie selektivity stanovenia, inkorporáciu mediátorov prípadne enzýmov (mikrobiálnych buniek) a mechanické ukotvenie enzýmov pod alebo vo vonkajšej membráne. Dlhý čas boli tieto membrány pripravované s kontrolou hrúbky v mikroškále, s imobilizáciou enzýmov bez kontroly hustoty a orientácie na povrchu. V súčasnosti (posledných 5-7 rokov) je však trend využívať úplne nové nanomateriály (nanočastice, nanorúrky, mezoporézne prášky) a nové postupy s kontrolou hustoty a povahy ligandov v nanoškále prípadne na molekulárnej úrovni. Biotechnológia, ktorá využíva vedecké a inžinierske prístupy na výrobu rôznych produktov s využitím biologických objektov sa v súčasnosti považuje za technológiu, ktorá výrazným spôsobom redukuje našu závislosť na neobnoviteľných zdrojoch a je teda kľúčovou technológiou vedúcou k trvale udržateľnému rozvoju spoločnosti.¹ Typickým formátom analýzy je at-line (diskontinuálne meranie blízko fermentačnej nádoby po odobratí vzorky) alebo on-line (meranie mimo fermentačnej nádoby vo vzorke kontinuálne odoberanej z fermentačnej nádoby). Off-line monitorovanie procesu je obvyčajne uskutočnené mimo miesto alebo čas fermentácie. On-line monitorovanie bioprocesu, ktoré umožňuje aj proces riadiť spätnou väzbou je preferovaným spôsobom analýzy. V práci sme techniku FIA použili na off-line monitorovanie biotechnologickej konverzie D-glukózy na etanol biosenzorom. Na prípravu tohto biosenzora bol využitý nanokompozit CNT s baktériami.

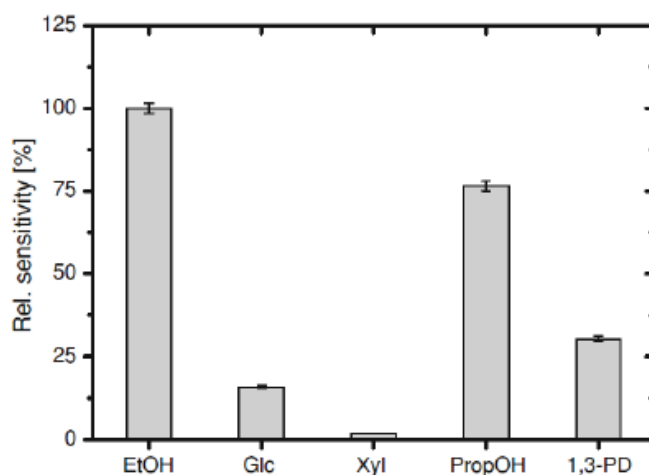
Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie ako média pre kultiváciu baktérií, dialyzačná membrána, chitozán a CNT boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 □S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko).

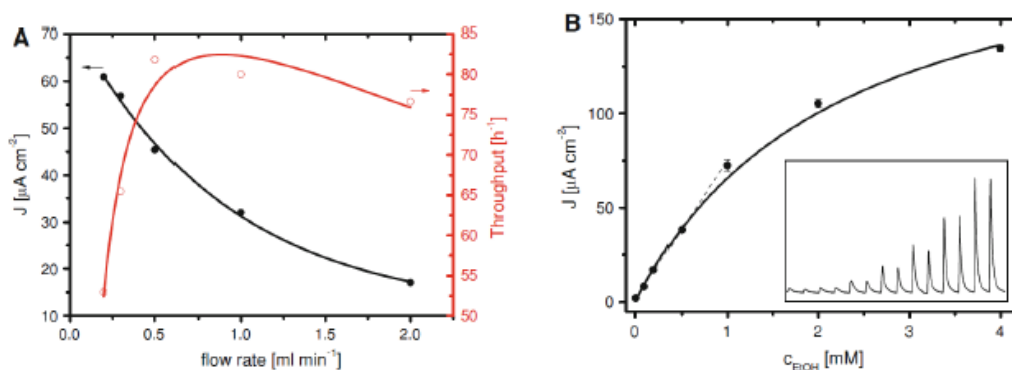
Výsledky a diskusia

Robustný mikrobiálny biosenzor na stanovenie etanolu bol pripravený z nanobiokompozitu, ktorý pozostával z mikrobiálnych buniek priamo integrovaných s uhlíkovými nanorúrkami (CNTs). Na zvýšenie citlivosti celého merania bol využitý redoxný mediátor ferrikyanid a následne bolo celé zariadenie integrované do prietokového systému (FIA). Okrem etanolu biosenzor reagoval aj na ďalšie analyty ako naznačuje Obr. 1. Výsledné zariadenie bolo extrémne citlivé s citlivosťou (74 ± 2.7) □A mM⁻¹ cm⁻², veľmi nízkym detekčným limitom 5 □M a lineárnym rozsahom od 10 □M po 1 mM. Veľmi rýchla odozva biosenzora dovoľovala analyzovať s rýchlosťou 67 vzoriek za 1 hodinu pri prietoku 0.3 ml min⁻¹ (Obr. 2). Biosenzor vykazoval vysokú operačnú stabilitu s poklesom citlivosti len 1.7% za 43 h kontinuálnej

analýzy. Výsledky analýzy etanolu biosenzorom boli vo veľmi dobrej zhode s výsledkami získanými referenčnou analytickou metódou – HPLC.



Obr.1.: Substrátová špecificita etanolového biosenzora.



Obr.2.: Vplyv prietoku vo FIA na citlivosť stanovenia ako i na počet analyzovateľných vzoriek za 1 h (vľavo) a kalibračná krivka biosenzora.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1 Gavrilescu M., Chisti Y., *Biotechnol. Adv.* **2005**, 23, 471.

Monitorovanie stresu počas rekombinantného biotechnologického procesu analýzou „heat shock“ proteínov

Tkáč Ján*, Nahálka Jozef

*Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra*

*[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)*

Kľúčové slová

Biosenzor, protilátky, povrchová plazmónová rezonancia (SPR), DnaK rekombinantný biotechnologický process

Úvod

Protilátky sú proteíny produkované imunitným systémom schopné špecificky rozpoznať vyššie molekulové látky, ktoré nie sú organizmu vlastné (antigény). Protilátky známe aj ako imunoglobulíny (IgG) sú biomolekuly s molekulovou hmotnosťou okolo 150 kDa, pozostávajúce z 2 ťažkých a 2 ľahkých reťazcov. Kombináciou oboch reťazcov vzniká tzv. hypervariabilná oblasť, ktorá je zodpovedná za selektívne rozpoznávanie antigénu s využitím širokej škály interakcií (elektrostatické, hydrofóbne, vodíkové a van der Waalsove väzby). Interakcia protilátka-antigén patrí k najsilnejším biologickým väzbám s afinitnou konštantou KD v rozmedzí 10^{-7} – 10^{-9} M (výnimkou je väzba biotínavidín s KD=10-15 M), pričom protilátka rozpoznáva antigén s vysokou špecificitou a hlavne s vysokou selektivitou, čo znamená, že aj relatívne malá zmena v štruktúre antigénu sa prejaví vysokou zmenou v hodnote KD.

Produkcia rekombinantných proteínov tvorí v súčasnosti značný podiel na trhu rozličných biotechnologických a farmaceutických firiem. Aj keď je to už veľmi dobre zvládnutá technológia, je veľmi potrebné pochopiť procesy vedúce k produkcii rekombinantných proteínov za účelom vyššej efektivity ich prípravy. Produkcia rekombinantného, a teda bunke cudzieho proteínu, je značným stresom a ak je využitý silný indukčný systém častokrát to vedie k preťaženiu biosyntetického aparátu bunky, čo negatívne ovplyvní rast mikroorganizmu ako aj aktivitu, prípadne funkciu rekombinantného proteínu.¹ Dekádu dozadu stres spôsobený produkciou rekombinantných proteínov sa študoval skôr semikvantitatívnymi metódami a cieľom tejto bolo navrhnúť robustný analytický systém, ktorým by bolo možné úroveň stresu v bunke spoľahlivo kvantifikovať. Na tento účel bola využitá technika SPR s imobilizovanými protilátkami voči dvom proteínom – rekombinantnému rhSOD proteínu (využívaný na terapeutické účely)² a stresovému proteínu DnaK.³

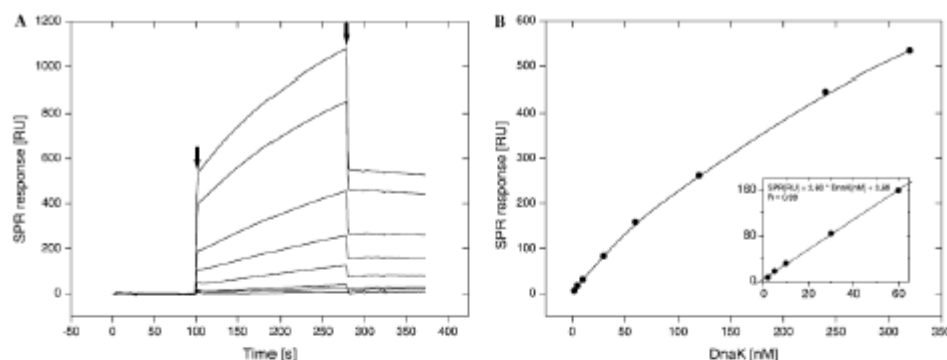
Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie ako protilátky, blokovacie látky a ďalšie pomocné látky v procese imobilizácie a celkového merania boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Optické merania technikou SPR sa uskutočnili na prístroji Biacore (Švédsko).

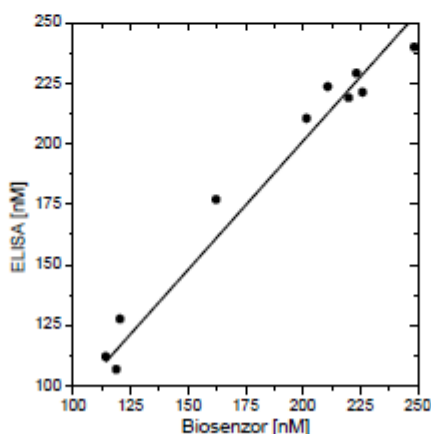
Výsledky a diskusia

V prvej fáze bol optimalizovaný protokol imobilizácie protilátok voči proteínu DnaK a podmienky merania ako aj vzorkovací protokol a hlavne spôsob dezintegrácie buniek *E. coli* za účelom uvoľnenia intracelulárnych proteínov. Typický priebeh merania analytu týmto biosenzorom je znázornený na Obr. 1 spolu s kalibračnou krivkou. Porovnanie analýzy SPR

metódou s referenčnou ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ukázalo veľmi dobrú zhodu so smernicou 1,06 a korelačným koeficientom $R^2=0,956$ (Ob. 2), čo bolo veľmi dôležité pri meraní vo veľmi komplexnej matrici, akým bunkový lyzát je. Vhodný vzorkovací protokol zaručil, že aj malé zmeny v koncentrácii DnaK (maximálny nárast z 120 nM na 240 nM) boli veľmi reprodukovateľne monitorované. Off-line monitorovanie oboch týchto analytov skutočne potvrdilo, že intenzita indukcie musí byť veľmi starostlivo nastavená a menej pridaného induktora skutočne znamenal viac naprodukovaného aktívneho rhSOD.



Obr. 1: Reálny záznam merania proteínu DnaK s metódou SPR (vľavo) a kalibrácia tohot biosenzora (vpravo).



Obr. 2: Validácia SPR biosenzora referenčnou analytickou technikou ELISA.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Glick B.R., *Biotechnol. Adv.* **1995**, 13, 247.
- Chou C.P., *Appl. Microb. Biotechnol.*, **2007**, 76, 521.
- Demain A.L., Vaishnav P., *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27, 297.
- 2 Ertl P., Unterladstaetter U., Bayer K., Mikkelsen S.R., *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4949.
- 3 Barends T.R.M., Werbeck N.D., Reinstein J., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 20, 46.

Sorbitolový biosenzor s využitím polysacharidového nanokompozitu

Tkáč Ján*, Šefčovičová Jana, Filip Jaroslav, Gemeiner Peter

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra
[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)

Kľúčové slová

Biosenzor, sorbitoldehydrogenáza, ampérometrické stanovenie, D-sorbitol, uhlíkové nanorúrky (CNT)

Úvod

Biotechnológia, ktorá využíva vedecké a inžinierske prístupy na výrobu rôznych produktov s využitím biologických objektov sa v súčasnosti považuje za technológiu, ktorá výrazným spôsobom redukuje našu závislosť na neobnoviteľných zdrojoch a je teda kľúčovou technológiou vedúcou k trvale udržateľnému rozvoju spoločnosti.¹ Typickým formátom analýzy je at-line (diskontinuálne meranie blízko fermentačnej nádoby po odobratí vzorky) alebo on-line (meranie mimo fermentačnej nádoby vo vzorke kontinuálne odoberanej z fermentačnej nádoby). Off-line monitorovanie procesu je obvyčajne uskutočnené mimo miesta alebo čas fermentácie. On-line monitorovanie bioprocesu, ktoré umožňuje aj proces riadiť spätnou väzbou je preferovaným spôsobom analýzy.

Najčastejšie sa na on-line monitorovanie využíva prietoková analýza FIA (z angl. Flow Injection Analysis) vyvinutá v roku 1975², keď je do kontinuálneho toku mobilnej fázy (väčšinou tlmivý roztok) nastreknuté presne definované množstvo analytu (vzorky) určené veľkosťou slučky. Výhodou takéhoto usporiadania je vysoká reprodukovateľnosť, krátky čas analýzy, vysoká flexibilita a cenová nenáročnosť s možnosťou využívať viaceré prevodníky (elektrochemický, optický a kalorimetrický).³

On-line monitorovanie si však vyžaduje kontinuálne aseptické odoberanie vzorky, čo nie je vôbec jednoduché. V princípe sú k dispozícii dve techniky – dialýza alebo filtrácia. Problémom využitia dialýzy je fakt, že počas fermentácie je permeabilita membrány zmenená adsorpciou komponentov z fermentačného média, a preto častejšie využívanou je filtračná próba. Filtračná próba zase môže do systému vnášať vzduchové bubliny, ktoré negatívnym spôsobom môžu ovplyvňovať on-line merania s nutnosťou využívať odvdzdušňovanie vzorky. V práci sme techniku FIA použili na off-line monitorovanie biotechnologickej konverzie D-sorbitolu na L-sorbózu, ktorá je prekursorom pri výrobe vitamínu C. Na prípravu tohto biosenzora bol využitý nanokompozit CNT s HA (kys. hyalurónová).

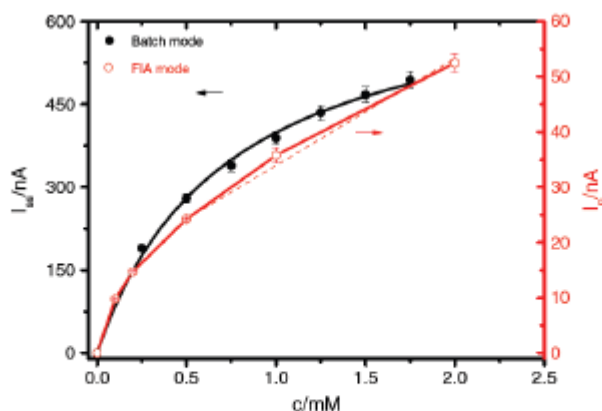
Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie ako sorbitoldehydrogenáza, dialyzačná membrána, CNT a NAD⁺ boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko).

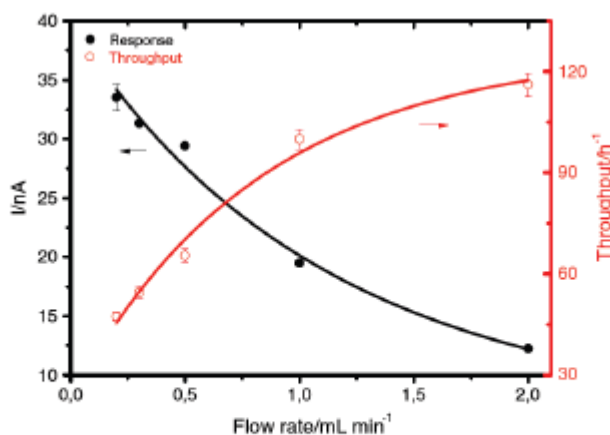
Výsledky a diskusia

Vitamín C (kyselina askorbová) je takmer výlučne produkovaný s využitím biotransformačného kroku, ktorým je oxidácia D-sorbitolu na L-sorbózu bunkami *G. oxydans* s celosvetovou produkciou 60 000 ton.⁴ Je to teda veľmi zaujímavý bioproces, ktorý bol monitorovaný biosenzorom s využitím SDH a bionanokompozitu CNT v HA. Citlivosť

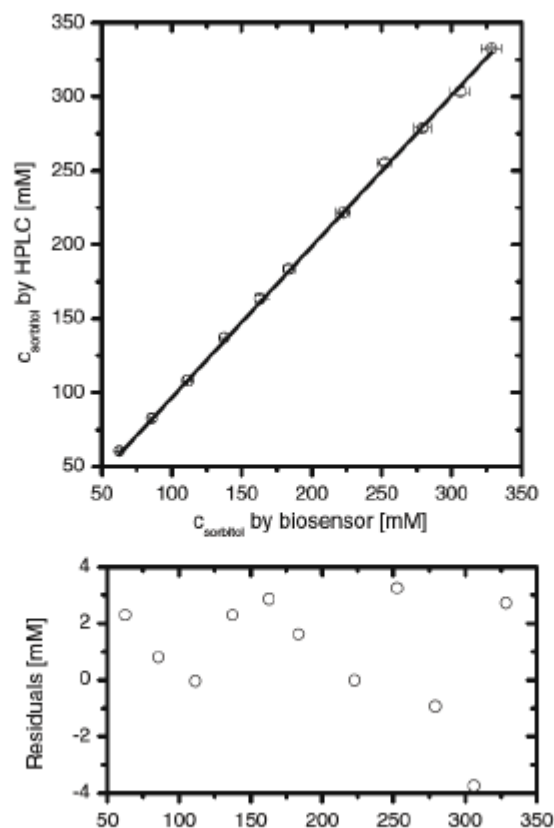
stanovenia NADH na CNT/HA modifikovanej electrode sa výrazne zvýšila (z $0,73 \mu\text{A mM}^{-1}$ na $2,20 \mu\text{A mM}^{-1}$) použitím redoxného mediátora toluidínovej modrej, ktorá bola na CNT/HA adsorbovaná a držaná silnými elektrostatickými silami. Okrem toho bol pracovný potenciál detekcie NADH znížený z cca $+400 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ na 0 mV vs. Ag/AgCl a teda umožňoval pracovať v optimálnom rozsahu potenciálu. Takto pripraveným bionanokompozitom modifikovaný povrch bol využitý na prípravu biosenzora na stanovenie D-sorbitolu s veľmi dobrými operačnými vlastnosťami, ako rýchlosť odozvy (25 s) a detekčný limit ($4 \mu\text{M}$) (Obr. 1 a 2). Navyše operačná stabilita bola vynikajúca s poklesom citlivosti biosenzora na 85% pôvodnej citlivosti počas 19 h kontinuálneho používania. Tento biosenzor bol následne použitý na analýzu D-sorbitolu vo vzorkách odobratých z biotransformácie D-sorbitolu na L-sorbózu s veľmi dobrou zhodou výsledkov v porovnaní s HPLC metódou (smernica 0,99 a $R^2=0,999$) (Obr. 3).



Obr.1.: Kalibračná krivka biosenzora na stanovenie D-sorbitolu v prietokovom systéme (FIA mode) a vo vsádzkovom režime (batch mode).



Obr.2.: Základné charakteristiky D-sorbitoldehydrogenázového biosenzora na stanovenie D-sorbitolu v biotechnologických vzorkách od prietoku vo FIA systéme akými sú celková prúdová odozva v nA a frekvencia analyzovateľnosti vzoriek (sample throughput).



Obr.3.: Porovnanie analýzy D-sorbitolu zo vzoriek odobratých z biotechnologického spôsobu konverzie D-sorbitolu na L-sorbitózu biosenzorom a kvapalinovou chromatografiou HPLC.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Gavrilescu M., Chisti Y., *Biotechnol. Adv.* **2005**, 23, 471.
- 2 Ruzicka J., Hansen E.H., *Anal. Chim. Acta* **1975**, 78, 145.
- 3 Schugerl K., *J. Biotechnol.* **2001**, 85, 149.
- 4 De Muynck C., Pereira C.S.S., Naessens M., Parmentier S. a kol., *Crit. Rev. Biotechnol.* **2007**, 27, 147.

Celiakálne aktívne bielkoviny v cereáliách a pseudocereáliách

Peter Socha, Dana Urminská*

Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko
[*dana.urminska@uniag.sk](mailto:dana.urminska@uniag.sk)

Kľúčové slová

celiakia, cereálie, pseudocereálie, frakčná skladba bielkovín, ELISA

Úvod

Problematika alergií a potravinových intolerancií je v súčasnosti veľmi aktuálna, pretože už príjem malého množstva potravy môže vyvolať patologickú reakciu. Jedným z takýchto ochorení je aj gluténsenzitívna enteropatia, známejšia pod názvom celiakia (Ciacci et al., 2002).

V obilninách sa nachádzajú rôzne typy zásobných bielkovín, z ktorých prolamíny tvoriace súčasť lepku, môžu vyvolať prejavy intolerancie. Za alergénne agens sú pokladané prolamíny s nízkou molekulovou hmotnosťou okolo 30 kDa.

Po presnej diagnostike je jedinou liečbou celiakie prísna eliminačná bezlepková diéta (Fasano a Catassi, 2001). Lepok je však významnou zložkou obilného zrna, skladá sa z bielkovín rozpustných v etylalkohole, tzv. prolamínov a bielkovín rozpustných v zásadách, tzv. glutelínov. Príprava bezlepkovej suroviny pre výrobu potravín je časovo a finančne náročná, a preto sa perspektívnymi potravinami pre celiakov stávajú pseudocereálie pohánka, láskavec, mrlík (quinoa) a ďalšie. Pre celiakov nevhodné frakcie bielkovín sa v nich takmer nevyskytujú (Szabová et al., 2003).

Imunitná odpoveď organizmu na prítomnosť prolamínových bielkovín vzniká po pôsobení tráviacich enzýmov, ktoré štiepia prolamíny na peptidy, ktoré majú typickú sekundárnu štruktúru (Jabri a Sollid, 2006) a ktoré prechádzajú stenou črevnej sliznice do *lamina propria*. Transglutamináza deaminuje glutamíny, čo umožní väzbu týchto peptidov na imunoproteíny HLA DQ2 a DQ8 (Waszczuk et al., 2007) a aktiváciu T-buniek (typ CD4+). Stimulácia T-buniek vyvolá sekréciu pro-zápalových cytokínov (Wieser, 2004, Wieser a Koehler, 2008), a tým štartuje alergická reakcia na konzumáciu prolamínov (Jabri a Sollid, 2006). T-bunky celiatikov rozpoznávajú predovšetkým peptidy bohaté na prolín a glutamín: PFPQPQLPY, PQQQLPYPQ a PYPQPQLPY.

Materiál a metódy

Základnou metódou pre stanovenie prítomnosti celiakálne aktívnych prolamínových bielkovín je frakcionácia na základe rozdielnej rozpustnosti s následným stanovením koncentrácie bielkovín destilačnou metódou podľa Kjeldahla. Pre špecifickú analýzu je potrebná imunochemická metóda, napr. ELISA, základom ktorej v tzv. sendvičovom usporiadaní je protilátka R5, ktorá bola pripravená imunizáciou myši ražným peptidom. Je špecifická voči sekvenciám QQPFP, QQQFP, LQPFP a QLFPF (Osman et al., 2001; Valdés et al., 2003). Kahlenberg et al. (2005) predpokladajú, že imunodominantnou štruktúrou prolamínov je sekvencia QQQ/PFP. Vzhľadom na to, že v avenínoch ovsa sa tieto epitopy nenachádzajú, protilátka R5 nie je vhodná na stanovenie bielkovín ovsa. Využíva sa však na stanovenie kontaminácie ovsa jačmennými bielkovinami. Méndez et al. (2005) dokázali, že ELISA s R5 je vhodnou metódou aj pre stanovenie ražných sekalínov.

Sendvičová ELISA s protilátkou R5 a enzýmom chrenová peroxidáza je referenčnou metódou pre stanovenie lepkových bielkovín podľa Potravinového kódexu. Ako prirodzene bezlepková surovina a potravina je označená iba taká, ktorá obsahuje menej ako 20 ppm gluténu.

Rastlinný materiál získaný v tzv. biopredajniach: pšenica letná, pšenica špaldová, pšenica tvrdá, ovos (vločky), jačmeň jarný, pohánka lúpaná, ryža natural, kukurica. Triticale a láskavec metlinatý boli dopestované na pokusnom poli KUPaH FAPZ v areáli SPU.

Stanovenie celkového dusíka a frakčnej skladby bielkovinového komplexu podľa Kjeldahla (Michalík et al., 2002). Stanovenie množstva celiakálne aktívnych bielkovín metódou ELISA s využitím testu Ridascreen Gliadin Test (R-Biopharm, Germany).

Výsledky a diskusia

Celiakia, glutén-senzitívna enteropatia, je ochorenie sliznice tenkého čreva, ktoré vzniká po prijímaní gluténu v potrave.

Podľa Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses sú od roku 2007 potraviny rozdelené do troch skupín:

- potraviny, ktoré neobsahujú žiadne prolamíny z rastlín druhu *Triticum*, jačmeňa, raže a ovsa. Limit pre obsah gluténu je 20 mg.kg⁻¹,
- potraviny, ktoré obsahujú zložky pšenice, jačmeňa, raže, ovsa, a sú považované za „gluten-free“. Limit pre obsah gluténu je 100 mg.kg⁻¹,
- potraviny, ktoré sú zmesou zložiek uvedených v predchádzajúcich bodoch. Limit pre obsah gluténu je 100 mg.kg⁻¹.

Základnou metódou pre kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu bielkovín zrna cereálií a pseudocereálií je ich frakčné rozdelenie na základe rozdielnej rozpustnosti (Tab. 1).

Tabuľka 1

Zastúpenie jednotlivých bielkovinových frakcií v zrne cereálií a pseudocereálií

Biologický materiál	Albumíny globulíny, %	Prolamíny, %	Glutelíny, %
Pšenica letná	22,7	33,8	35,0
Pšenica špaldová	24,3	42,2	25,1
Pšenica tvrdá	26,7	37,8	26,3
Ovos	48,0	14,1	33,0
Triticale	31,4	34,6	28,0
Jačmeň jarný	29,0	31,4	29,7
Láskavec metlinatý	56,8	3,2	23,1
Pohánka lúpaná	50,1	6,3	18,8
Ryža	12,6	3,6	44,9
Kukurica	17,3	23,6	32,1

Celiakálne aktívnymi bielkovinami sú prolamíny, resp. bielkoviny rozpustné v etylalkohole. Najvyššie množstvo obsahovali druhy rodu *Triticum*, predovšetkým pšenica špaldová, tvrdá a letná. Prekvapivým zistením je vysoká koncentrácia týchto bielkovín v zrne kukurice, ktorá sa považuje za potravinu vhodnú pre prípravu bezlepkovej diéty.

Z uvedeného jednoznačne vyplýva, že pre stanovenie celiakálne aktívnych bielkovín sú nevyhnutné imunochemické metódy.

S využitím testu, ktorý obsahoval špecifickú protilátku R5 boli v analyzovaných surovinách stanovené koncentrácie prolamínov, vyvolávajúcich celiakiu. Test zahŕňal extrakciu vzorky

roztokom, ktorý obsahoval 2-merkptoetanol a guanidín hydrochlorid, ktorými sa redukujú možné disulfidické mostíky, stabilizujúce štruktúru zásobných bielkovín. Preto je možné predpokladať, že všetky prolamíny boli extrakčným postupom uvoľnené a analyzované (Tab. 2).

Tabuľka 2

Celiakálne aktívne bielkoviny v zrne cereálií a pseudocereálií

Biologický materiál	ELISA Ridascreen Gliadin, mg.kg ⁻¹
Pšenica letná	16200
Pšenica špaldová	17500
Pšenica tvrdá	15000
Ovos	14000
Tritikale	2200
Jačmeň jarný	1300
Láskavec metlinatý	8,80
Pohánka lúpaná	7,50
Ryža	5,00
Kukurica	6,20

Výsledky ELISA testu potvrdili nevhodnosť pšenice, tritikale a jačmeňa pre výživu celiakov, pretože v 1 kg suroviny bolo 14 – 16,2 g celiakálne aktívnych bielkovín. Pozitívnym zistením je, že protilátka R5, ktorá je špecifická práve voči takým peptidom, ktorých aminokyselinové sekvencie sa v ovse nevyskytujú, citlivo reagovala aj s bielkovinami izolovanými z ovsu. Kahlenberg et al. (2005) zistili, že R5 reaguje aj s epitopmi QQQFP, LQPFP a QLPFP. Na základe analýz a pozorovaní viacerých autorov (Janatuinen et al., 2000; Högberg et al., 2004), venujúcich sa problematike celiakie, je však pravdepodobné, že analyzované ovsené vločky boli kontaminované jačmeňom alebo pšenitou. Pre bezpečný stravovací režim celiakov je preto nutné odporúčanie, že ovos by nemali konzumovať. Všetky cereálie vysoko prekračovali limit v obsahu celiakálne aktívnych bielkovín, ktorý je pre celiakov bezpečný.

Ryža natural, pohánka, láskavec a kukurica, resp. kukuričný škrob sú vhodnou surovinou a potravinou pre pacientov s celiakiou, pretože obsahujú iba 5 - 8,8 mg.kg⁻¹ alergénnych bielkovín.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

CIACCI, C. – CIRILLO, M. – CAVALLARO, R. – MAZZACCA, G. 2002. Long-term follow-up of celiac adults on gluten-free diet: prevalence and correlates of intestinal damage. In: Digestion, vol. 66, 2002, p. 178-185.

FASANO, A. – CATASSI, C. 2001. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. In: Gastroenterology, vol. 120, 2001, p. 636-651.

JABRI, B. – SOLLID, L. M. 2006. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. In Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology, vol. 3, 2006, no. 9, p.516-25.

KAHLENBERG, F. – SANCHEZ, D. – LACHMENN, I. 2005. Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. In European Food Research and Technology, vol. 222, 2005, p. 78-82.

MÉNDEZ, E. – VELA, C. – IMMER, U. 2005. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. In European Joournal of Gastroenterology and Hepatology, vol. 17, 2005, no. 10, p. 1053-1063. ISSN 1473-5687.

OSMAN, A. A. – UHLING, H. H. – VALDES, I. et al. 2001. A monoclonal antibody that recognize a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. In European Journal of Gasthroenterology and Hepatology, vol. 13, 2001, no.10, p. 1189-1193. ISSN 094-691X.

SZABOVÁ E. – URMINSKÁ D. – MICHALÍK I. 2003. Využitie pseudocereálií na prípravu potravín pre pacientov s celiakiou. In Rizikové faktory potravinového reťazca.zborník vedeckých prác z 3. medzinárodnej vedeckej konferencie. Nitra : SPU, 2003, s. 143-145.

URMINSKÁ, D. – SOCHA, P. – VOLLMANNOVÁ, A. 2009. ELISA and PAGE analysis of protein determinants from cereal and pseudocereal grain causing human coeliac disease. In: FEBS Journal. – Oxford: Blackwell Publishing, 2009, ISSN 1742 464X, vol. 276, suppl. 1 (2009), p. 94.

VALDÉS, I. – GARCIA, E. – LLORENTE, M. et al. 2003. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protokol. In European Joournal of Gastroenterology and Hepatology, vol. 15, 2003, no. 5, p. 465-474.

WASZCZUK, E. – KOSIARA, M. – DOBOSZ, T. et al. 2007. Celiac disease and Diabetes mellitus. In

Advances in Clinical and Experimental Medicine, vol. 16, 2007, no. 2, p. 297301. ISSN 1230-025X.

WISER, H. 2004. Celiac disease. In Encyclopedia of grain science, vol. 1 – 3, 2004,p. 179187.

WIESER, H. – KOEHLER, P. 2008. The biochemical basis of celiac disease. In Cereal Chemistry, vol. 85, 2008, no. 1, p. 1-14.

Rizikové prvky v podmienkach intenzívneho hospodárenia

Tomáš Tóth, Alena Vollmannová, Dana Urminská

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, SR
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-949 76 Nitra, Slovensko*

Abstrakt

Limitné hodnoty A pre celkový obsah kadmia $0,80 \text{ mg.kg}^{-1}$ boli prekročené na všetkých parcelách s rozpätím $0,80 - 0,97 \text{ mg.kg}^{-1}$. Limitná hodnota A 20 mg.kg^{-1} bola pre kobalt taktiež prekročená, pričom sme dosiahli zvýšené obsahy v rozmedzí $20,30 - 28,50 \text{ mg.kg}^{-1}$. Výrazne bol prekročený limit A 35 mg.kg^{-1} pre nikel s dosiahnutými hodnotami $34,80 - 44,80 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Potenciálne uvoľniteľné formy rizikových a stopových prvkov pre limitne hodnoty A_1 boli prekročené len u kadmia ($0,30 \text{ mg.kg}^{-1}$) na troch sledovaných parcelách s rozsahom $0,30 - 0,361 \text{ mg.kg}^{-1}$. Obsah kadmia na ďalších šiestich parcelách nebol pod $0,20 \text{ mg.kg}^{-1}$. Tieto údaje svedčia o možnej rizikovosti kadmia v pôdnom prostredí pri možnej zmene pH pôdneho roztoku.

Kľúčové slová: pôdny typ, cudzorodé látky, stopové prvky, extrakčné činidlá

Úvod

Intenzívne používanie priemyselných hnojív v uplynulom období vo výžive rastlín prinieslo so sebou okrem pozitívneho ovplyvňovania úrod viacero problémov ekologického a hygienického charakteru. Jedným z nepriaznivých prejavov používania vysokých dávok priemyselných hnojív je možnosť kontaminácie poľnohospodárskych pôd ťažkými kovmi. Ich príjem rastlinami a transport do potravinového reťazca v konečnom dôsledku ovplyvňuje zdravie ľudskej populácie.

JANKOVIČ et al.(1988) uvádza, že samotné priemyselné hnojivá prispievajú k znečisteniu pôdy ťažkými kovmi približne 25 – 35 % podielom. V tomto smere v najväčšej miere spôsobujú znečistenie hnojivá s obsahom oxidu fosforečného (superfosfáty), najmä pokiaľ ide o kadmium a chróm. TOMKOVÁ et al. (1989) popisujú, že dávky kadmia vnášané do pôdy v európskom meradle fosforečnými hnojivami dosahujú v priemere $3 - 4 \text{ g.ha}^{-1}$ za rok, ale uvádzajú aj vyššie množstvá viac než 10 g.ha^{-1} za rok.

V podmienkach intenzívneho poľnohospodárstva sa v okolí Nitry, taktiež aplikovali vysoké dávky fosforečných priemyselných hnojív, ktoré mohli mať negatívne dôsledky na pohyblivosť zapracovaných ťažkých kovov do pôdy. BIELEK (1996) poukazuje, že ak sú kontaminované pôdy v dobre prevzdušnenom stave s podmienkami pre priebeh intenzívnych oxidačných procesov, toto prispieva k znižovaniu škodlivého ťažkých kovov a ich pohyblivosti a naopak. CHRENEKOVÁ et al.(1994), HOLOBRADÝ et al. (1992) popisujú, že jednou z príčin rôzneho vplyvu pôdy na obsah ťažkých kovov môže byť ich rozdielna distribúcia z pôdneho roztoku do nadzemných častí rastlín.

Materiál a metódy

Na sledovanie obsahu rizikových a stopových prvkov v podmienkach intenzívneho hospodárenia sme zvolili poľnohospodársky podnik v okrese Nitra s vysokou úrovňou poľnohospodárskej výroby aj v súčasnom období.

Odber pôdnych vzoriek sme uskutočnili na deviatich parcelách, kde sa vyskytujú hnedozeme typické na sprašiach s miernou svahovitou a bez skeletu. Odber pôdnych vzoriek sme uskutočnili podľa metodiky VÚPVR v troch hĺbkach: $0 - 0,10\text{m}$; $0,20 - 0,30 \text{ m}$;

0,35 – 0,45m.V jednotlivých horizontoch a na rôznych pestovateľských plochách boli uskutočnené chemické analýzy na obsah rizikových a stopových prvkov (Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Ni, Cr, Pb, Cd). Analýzy sa uskutočnili v pôdnych vzorkách po spracovaní ako jemnozernou. V pôdnych vzorkách sme stanovovali celkový obsah sledovaných prvkov suchou cestou a potenciálne uvoľniteľné obsahy sledovaných prvkov v 2 M HNO₃. Stanovenie sledovaných rizikových a stopových prvkov sa uskutočnil atómovou absorpčnou spektrofotometriou. Agrochemické charakteristiky z X. cyklu ASP sú uvedené v tabuľke č.1.

Agrochemická charakteristika

Tabuľka č.1

Parcela	Obsah humusu v %	pH/KCl	P v mg.kg ⁻¹	K v mg.kg ⁻¹	Mg v mg.kg ⁻¹	Ca v mg.kg ⁻¹
1.	2,05	7,2	59	251	374	5 350
2.	1,97	7,0	59	223	417	3 370
3.	2,21	6,9	67	279	380	5 200
4.	1,76	7,3	86	264	317	5 770
5.	1,64	7,2	48	200	361	5 050
6.	1,78	6,9	70	257	471	4 320
7.	1,69	7,1	87	279	388	4 630
8.	1,93	6,9	67	279	380	5 200
9.	1,82	7,2	82	298	343	5 770

Dosiahnuté výsledky a diskusia

Na základe agrochemického skúšania pôd (Tab.č.1)je možné konštatovať, že na sledovaných parcelách bol nízky obsah humusu v rozpätí 1,4 – 2,21 % a je nevyhnutne na zvýšenie obsahu organických látok aplikovať organické hnojivá v požadovaných dávkach pre pestované plodiny. Hodnota pH je neutrálna, ktorá je vhodná pre pestované plodiny a zároveň priaznivo ovplyvňuje pohyblivosť rizikových prvkov ako je Cd a Pb. Obsahy makrobiogenných prvkov je na strednej až veľmi vysokej úrovni, čo poukazuje, že v danom podniku aj napriek ekonomickým problémom poľnohospodárstva venujú úrodnosti pôdy zvýšenú pozornosť.

Celkový obsah rizikových a stopových prvkov je uvedený v tabuľke 2.

Celkové obsahy rizikových a stopových prvkov v mg.kg⁻¹

Tabuľka č.2

Názov	Fe	Mn	Zn	Cu	Co	Ni	Cr	Pb	Cd
1. 0–0,01 m	26110	662,9	63,00	27,60	24,70	38,20	53,00	25,80	0,820
0,2–0,3 m	26110	671,9	61,20	21,60	26,80	39,10	52,50	26,60	0,770
0,35–0,45 m	24745	644,1	58,50	20,60	24,60	36,30	50,40	26,70	0,660
2. 0–0,1 m	26015	709,5	63,10	20,80	26,40	39,60	53,70	28,30	0,870
0,2–0,3 m	26565	720,9	61,50	20,20	26,60	39,50	53,60	26,60	0,800
0,35–0,45 m	26035	701,0	62,20	21,30	26,20	40,20	52,20	27,40	0,840
3. 0–0,1 m	28315	759,6	64,30	23,50	28,20	44,80	54,60	29,60	0,900
0,2–0,3 m	28645	768,0	63,70	22,50	27,90	41,20	53,80	28,80	0,830
0,35–0,45 m	28225	771,2	63,20	22,50	28,50	41,40	54,10	28,80	0,960
4. 0–0,1 m	26860	688,1	76,40	22,20	21,40	36,70	53,30	27,90	0,970
0,2–0,3 m	26810	697,5	75,10	21,40	21,60	37,10	55,60	27,40	0,930
0,35–0,45 m	26625	683,5	73,50	20,80	21,60	36,90	52,50	26,50	0,970
5. 0–0,1 m	25700	698,4	70,40	23,10	21,10	36,40	51,40	27,00	0,790
0,2–0,3 m	26510	707,1	71,00	21,40	22,80	37,80	52,70	26,00	0,760
0,35–0,45 m	26645	717,5	70,50	21,50	23,40	37,50	52,50	26,80	0,760
6. 0–0,1 m	25955	740,6	61,00	19,60	20,70	36,80	52,90	29,30	0,900
0,2–0,3 m	26120	703,6	61,80	17,90	20,30	35,90	51,80	28,50	0,790
0,35–0,45 m	26775	720,2	62,30	19,70	21,10	36,60	53,80	27,00	0,790
7. 0–0,1 m	27530	649,4	86,20	22,20	20,90	36,60	53,70	27,40	0,860
0,2–0,3 m	27725	668,6	86,90	22,10	21,60	36,10	53,00	27,20	0,750
0,35–0,45 m	27570	683,6	82,50	22,50	21,50	35,40	50,70	28,70	0,890
8. 0–0,1 m	26890	731,2	76,90	21,40	20,50	35,80	51,60	26,80	0,820
0,2–0,3 m	26425	745,4	70,30	20,80	21,20	36,00	52,70	28,10	0,880
0,35–0,45 m	28560	740,9	67,50	21,00	22,70	36,10	52,40	28,00	0,880
9. 0–0,1 m	26985	679,6	71,10	23,30	19,20	35,70	52,20	27,10	0,790
0,2–0,3 m	26420	671,3	67,30	23,10	19,80	34,80	51,30	26,50	0,840
0,35–0,45 m	26580	688,9	68,20	23,90	21,00	36,03	51,60	27,30	0,830

Celkový obsah rizikových a stopových prvkov zahŕňa všetky formy, v ktorých sa určitý prvok v pôde vyskytuje. Pri použití týchto údajov dostávame celkový obraz o stave pôd aj napriek tomu, že len malá časť sa môže dostať do potravinového reťazca.

Dosiahnuté výsledky poukazujú na pomerne vysokú vyrovnanosť obsahov jednotlivých rizikových a stopových prvkov na jednotlivých honoch. Avšak limitné hodnoty A (LINKEŠ et al.1997) boli prekročené najmä u kadmia, kobaltu a niklu na všetkých sledovaných plochách.

V prípade kadmia limitný obsah pre A kategóriu predstavuje 0,8 mg.kg⁻¹ a nami namerané hodnoty sa pohybovali v rozmedzí 0,75 – 0,97 mg.kg⁻¹. Prekročený limit bol na všetkých parcelách, ktorého rozpätie bolo 0,8 – 0,97 mg.kg⁻¹. Limitný obsah kobaltu je 20 mg.kg⁻¹ a na sledovaných plochách bol obsah 19,20 – 28,50 mg.kg⁻¹. Na všetkých sledovaných miestach prekročenie bolo v rozsahu 20,30 – 28,50 mg.kg⁻¹. Zvýšený prekročený limit A 35 mg.kg⁻¹ bol dosiahnutý aj pri stanovení niklu. Rozsah celkového obsahu bol 34,80 – 44,80 mg.kg⁻¹. Limit A bol prekročený u všetkých horizontov s výnimkou jedného na parcele č.9 (0,20 – 0,30 m).

Aj napriek tomu, že z celkového obsahu sa môže len nepatrná časť dostať do potravinového reťazca je nevyhnutné týmto trom rizikovým prvkom venovať zvýšenú pozornosť.

Potenciálne uvoľniteľné obsahy rizikových a stopových prvkov (výluh M HNO₃) sú uvedené v tabuľke č. 3.

Potenciálne uvoľniteľné obsahy v mg.kg^{-1}

Tabuľka č.3

Názov	Fe	Mn	Zn	Cu	Co	Ni	Cr	Pb	Cd
1.0–0,01 m	2026,8	411,5	8,82	8,73	5,02	6,27	1,99	11,88	0,274
.....0,2–0,3 m	2014,0	410,5	8,11	8,66	5,01	6,44	2,04	12,31	0,265
.....0,35–0,45 m	2008,0	430,5	8,23	8,67	5,21	6,39	2,13	12,00	0,253
2.0–0,1 m	1061,8	420,3	8,26	8,14	6,23	7,60	2,18	12,83	0,294
.....0,2–0,3 m	1064,8	430,0	9,84	8,61	6,41	7,66	2,12	12,66	0,307
.....0,35–0,45 m	1167,5	453,0	8,87	8,73	6,60	7,96	2,18	13,35	0,293
3.0–0,1 m	1033,8	408,5	7,38	8,48	5,57	7,43	2,13	12,25	0,224
.....0,2–0,3 m	1082,3	412,0	6,88	8,59	5,72	7,08	2,27	12,69	0,231
.....0,35–0,45 m	1142,5	414,5	6,92	9,06	5,68	7,55	2,41	12,55	0,222
4.0–0,1 m	1261,5	388,3	17,65	9,33	5,71	7,06	2,04	13,09	0,319
.....0,2–0,3 m	1445,0	429,8	17,56	9,84	6,28	7,51	2,32	13,24	0,328
.....0,35–0,45 m	1324,0	407,8	16,58	9,34	6,04	7,21	2,15	13,44	0,305
5.0–0,1 m	1236,0	413,8	15,27	8,82	6,36	7,45	1,99	12,52	0,345
.....0,2–0,3 m	1154,0	366,3	14,75	8,82	6,09	7,24	2,00	12,38	0,337
.....0,35–0,45 m	1289,0	395,0	14,98	9,10	6,35	7,43	2,21	12,26	0,361
6.0–0,1 m	1314,8	432,0	8,26	8,09	6,07	7,17	2,24	12,73	0,225
.....0,2–0,3 m	1288,5	393,0	8,03	7,63	5,60	6,67	2,29	12,29	0,228
.....0,35–0,45 m	1206,3	359,3	7,86	7,75	5,25	6,46	2,20	12,42	0,229
7.0–0,1 m	1772,0	447,3	11,75	9,77	6,52	7,75	2,91	13,84	0,324
.....0,2–0,3 m	1578,8	412,5	11,17	9,43	5,85	7,09	2,77	13,17	0,307
.....0,35–0,45 m	1660,0	446,0	11,86	9,56	6,29	7,40	3,21	13,19	0,322
8.0–0,1 m	964,25	384,3	6,49	8,34	5,98	6,89	2,39	11,87	0,222
.....0,2–0,3 m	1069,0	420,3	7,18	8,86	5,81	7,28	2,64	12,69	0,234
.....0,35–0,45 m	1015,5	406,0	6,72	8,16	5,70	7,09	2,48	12,24	0,239
9.0–0,1 m	1811,3	435,0	12,05	10,1	5,90	7,39	2,48	13,30	0,283
.....0,2–0,3 m	1866,3	437,5	12,43	10,5	5,99	7,51	2,56	13,51	0,284
.....0,35–0,45 m	1965,8	465,5	12,01	10,5	6,11	7,49	2,62	13,80	0,294

Potenciálne uvoľniteľný obsah rizikových a stopových prvkov zahŕňa rôzne frakcie prvkov z hľadiska ich rozpustnosti. Tieto výluhy umožňujú s dostatočnou citlivosťou zistiť aj minimálne, aj maximálne obsahy u všetkých prvkov v pôdach.

Z celkove deviatich sledovaných stanovišť len na troch parcelách bol prekročený limit A_1 ($0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) pre kadmium. Na ďalších parcelách nebolo výrazné zníženie obsahov pričom nebola dosiahnutá žiadna hodnota pod $0,20 \text{ mg.kg}^{-1}$. V prípade kadmia sa potvrdzujú výsledky (TÓTH et al.1998;TÓTH et al.2000;TOMÁŠ et al. 2000), že aj zvýšené pH pôdy nemusí znižovať potenciálne uvoľniteľné obsahy rizikových prvkov v pôdach. Používanie vysokých dávok fosforečných priemyselných hnojív môžu ovplyvniť celkový obsah kadmia v pôde avšak agronomickými zásahmi sa neprekročí limitná hodnota.

V sledovaní potenciálne uvoľniteľných foriem niklu a kobaltu neboli prekročené limitné hodnoty čo svedčí o tom, že tieto prvky sú pre rastliny vo forme neprijateľnej aj keď limitná hodnota celkového obsahu je prekročená.

Záver

V podmienkach intenzívneho poľnohospodárstva aj napriek ekonomickým problémom je možné dosahovať výsledky na vysokej štandardnej úrovni. Agrochemické vlastnosti pôdy svedčia o vysokej odbornej starostlivosti o úrodnosť pôdy. Je nevyhnutné zvýšenú pozornosť venovať zapracovaniu organickej hmoty na zvýšenie obsahu humusu na jednotlivých parcelách. Limitné hodnoty A pre celkové obsahy rizikových prvkov boli prekročené v prípade kadmia, kobaltu a niklu. Potenciálne uvoľniteľné formy rizikových a stopových prvkov boli prekročené na troch parcelách pri sledovaní limitnej hodnoty A_1 pre kadmium. Obsah tohto rizikového prvku na ďalších parcelách nebol nižší ako $0,20 \text{ mg.kg}^{-1}$, čo

svedčí o možnej rizikovosti tohto prvku v pôdnom prostredí pri možnej zmene pH pôdneho roztoku.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- 1.BIELEK,P.:Ochrana pôdy v environmentálnej a agrárnej politike u nás a v štátoch EU. In: Zbor. ref.z ved. konf. „Ochrana pôdy-Výživa pre budúcnosť“. Nízke Tatry-Tále, Bratislava ,1996,s.53 – 64
- 2.HOLOBRADÝ,K. et all.: Zdroje a obmedzenie vstupu ťažkých kovov do produktov rastlinnej výroby. In. Ekologické princípy ochrany životného prostredia v poľnohospodárstve.Šaľa,1992,s.81 – 87
- 3.CHRENEKOVÁ,E,et all.: Pôdne vklady odpadmi a formy Cr^{III} a Cr^{VI} v rastlinách. Rostlinná výroba,1994,s.841 – 850
- 4.JANKOVIČ,J.et all.: Problém ťažkých kovov v priemyselných hnojivách n.p. Duslo Šaľa.AGROCHÉMIA,28,9-1988,s.267 – 272
- 5.LINKEŠ,V. et all.: Monitoring pôd Slovenskej republiky.1997,128s.
- 6.TOMÁŠ,J.et all.: Stav pôdnej hygieny v regiónoch nížin SR z hľadiska obsahu ťažkých kovov v rôznych extrahovadlách. Acta fytotechnica et zootechnica,Roč.3,č.1,2000,s.16 - 20
- 7.TOMKOVÁ,D.et all.: Vstupy kadmia do pôdy prostredníctvom priemyslových hnojív v podmínkach ČSSR.AGROCHÉMIA,29,2-1989,s.37 – 39
- 8.TÓTH,J.et all.: Hodnotenie pôdnej hygieny v okolí hutníckeho závodu. Acta fytotechnica et zootechnica.Roč.1,č.2,1998,s.42 - 45
- 9.Kolektív : Ochrana pôdy „Kódex správnej poľnohospodárskej praxe v SR“,MP SR-VÚPÚ,Bratislava,1996

Kontaktná adresa : Tomáš Tóth, Katedra chémie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU, 949 01 Nitra, e-mail: Tomas.Toth@uniag.sk

Príprava lektínoveho biosenzora s optimalizáciou hustoty lektínu

Bertók Tomáš*, Mislovičová Danica, Gemeiner Peter, Tkáč Ján

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra
[*chemtobe@savba.sk](mailto:chemtobe@savba.sk)

Kľúčové slová

Biosenzor, *Sambucus nigra* aglutinín, lektín, glykoproteín, elektrochemická impedančná spektroskopia, kys. sialová

Úvod

Kombinatorický potenciál sacharidov vysoko presahuje počet možných kombinácií oligomérov dosiahnuteľný nukleovými kyselinami alebo proteínmi. Práve glykozylácii proteínov sa pripisuje vysoká rôznorodosť ľudského proteómu, vzhľadom na relatívne malú veľkosť genómu. Glykány sú teda molekuly veľmi citlivo modulujúce nie len funkciu, ale aj ďalšie vlastnosti glykoproteínov či glykolipidov a ďalších glykokonjugátov. V eukaryotických organizmoch má vysoké zastúpenie v glykánových štruktúrach kyselina sialová (N-acetylneuramínová kyselina), najmä v koncových častiach glykánov exponovaných do vonkajšieho prostredia. Zmeny v zastúpení kys. sialovej (desialylácia proteínov) býva často sprievodný jav niektorých abnormálnych, patofyziologických prejavov rozvíjajúceho sa ochorenia¹.

Z diagnostického hľadiska je preto dôležité vyvinúť metódu, ktorá selektívne odhalí zmeny v glykoproteínoch vybraných biomolekúl, a to aj vo veľmi nízkych koncentráciách, nakoľko tieto zmeny v glykánových štruktúrach sa objavujú ešte pred prvými symptómami daného ochorenia. Proteíny schopné viac či menej špecificky viazať určité sacharidické štruktúry sa nazývajú lektíny. V tejto práci sa využíva lektín izolovaný z kôry bazy čiernej SNA (*Sambucus nigra* aglutinín), resp. jeho izoforma, tzv. izolektín SNA-I so špecificitou na kys. sialovú viazanú na susedný monosacharid pomocou 2,6- glykozidovej väzby². Systém pre sledovanie citlivosti biosenzora v tomto prípade predstavuje fetuín/asialofetuín/chemický oxidovaný asialofetuín s obsahom kys. sialovej 8,7% pre fetuín (FET) a <0,5% pre asialofetuín (ASF). Nižšie opísaný biosenzor bol schopný detekcie jednotlivých glykoproteínov pri femtomolárnych koncentráciách s využitím elektrochemickej impedančnej spektroskopie (EIS). Ďalšie metódy použité pre podrobnú charakterizáciu povrchu a sledovanie aktivácie samousporiadaných monovrstiev pre imobilizáciu lektínu sú AFM mikroskopia a XPS spektroskopia. Ako dva faktory najviac vplývajúce na citlivosť biosenzora je hustota lektínu na povrchu, ktorá sa dá jemne kontrolovať použitím zmesných samousporiadaných monovrstiev (SAM), a voľba blokovacieho činidla. Z komerčne dostupných a často využívaných možno spomenúť mliečne proteíny, kazeín či hovädzí sérový albumín (BSA)³. V tejto práci sme dokázali pozitívny vplyv polyvinylalkoholu (PVA) v porovnaní s hovädzím sérovým albumínom pre tento systém. Hustota biorozpoznávacieho prvku na povrchu fyzikálneho prevodníka, ktorý predstavovali zlaté elektródy, sa kontrolovali pomocou zastúpenia karboxylových funkčných skupín na povrchu elektród, ktoré ďalej slúžili pre vytvorenie peptidovej väzby s lektínom. Veľmi nízka koncentrácia lektínu na povrchu nie je schopná vytvoriť dostatočne veľký signál pri interakcii s analytom pri nízkych koncentráciách, naopak vysoká koncentrácia lektínu na povrchu má za následok zhoršenú prístupnosť relatívne veľkých molekúl analytu k väzobným miestam lektínu. Pre riedenie karboxylov v SAM vrstve (konkrétne 11- merkaptoundekánovej kyseliny, MUA) sa použil v rôznych pomeroch 6-merkaptohexanol (MH).

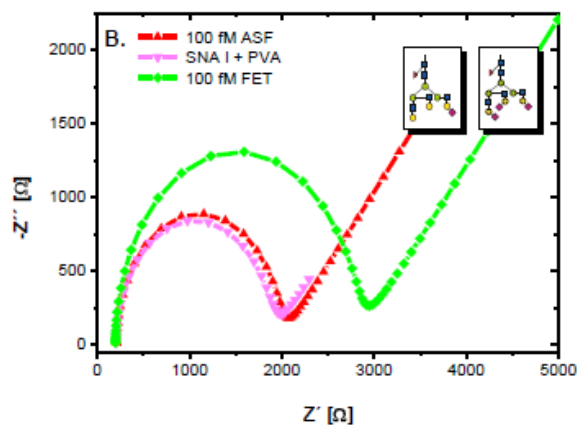
Pripravený biosenzor vykazoval lineárnu oblasť v rozsahu siedmych poriadkov a detekčný limit 0,33 fM pre fetuín a 0,54 fM pre asialofetuín.

Materiály a metódy

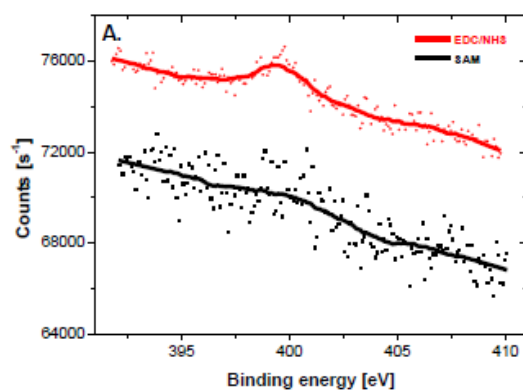
Všetky použité chemikálie boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Lektín SNA-I bol zakúpený v spoločnosti Gentaur (Belgicko). Zlaté elektródy a zlaté čipy použité v tejto práci sú zo spoločnosti BAS (USA), resp. Litcon (Švédsko). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko). Pri príprave SAM vrstiev sa použili anaeróbne pripravené 1 mM roztoky alkántiolov v etanole pre UV/VIS spektroskopiu (Slavus, Bratislava).

Výsledky a diskusia

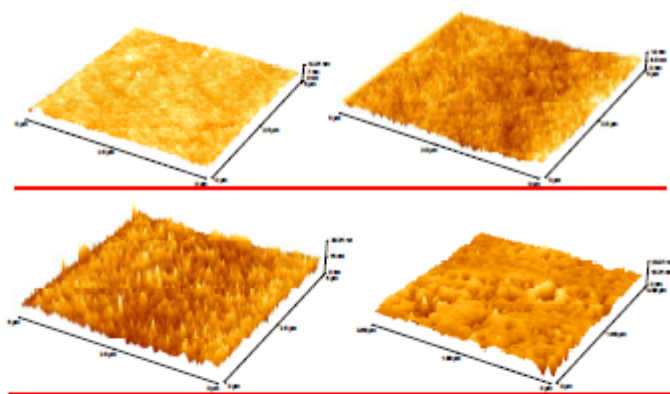
Elektrochemická impedančná spektroskopia sa merala v rozsahu 50 rôznych frekvencií (0,1 Hz až 100 kHz), v trojelektrodovom systéme (Au WE, Ag/AgCl RE a Pt CE), s rozpusteným mediátorom (5 mM zmes hexakyanoželezitanu/hexakyanoželeznatanu draselného v pomere 1:1) v 0,1 M KCl. Pre sledovanie reálneho obrazu povrchu sa použila AFM mikroskopia na zlatých čipoch. Pre vyhodnotenie dejov na povrchu sa používa štandardne parameter R_q (stredná kvadratická drsnosť). Pokles drsnosti medzi obr. 3a a 3b znamená viazanie blokovacieho činidla prednostne medzi lektíny na povrchu (na miesta bez biorozpoznávacieho elementu). Pre citlivosť biosenzora sa ukázalo byť okrem blokovacieho činidla dôležité aj riedenie karboxylov v SAM monovrstve. Prehľad výsledkov – citlivosť (nárast impedancie na jeden rád), lineárny rozsah, či pomer špecifických a nešpecifických interakcií je uvedený v tab.1., rovnako ako porovnanie PVA a BSA ako blokovacích činidiel a ich vplyv na výkon biosenzora. Na základe nameraných údajov sa z hľadiska citlivosti a lineárneho rozsahu, rovnako ako blokovania nešpecifických interakcií, ukázala konfigurácia s 1:1 zmesnou SAM monovrstvou a PVA ako blokovacím činidlom⁴. Takto pripravený biosenzor je možné využiť i v biotechnológii pri kontrole kvality produkovaných rekombinantných proteínov, ktoré sú častokrát glykozylované.



Obr.1.: Záznam Nyquistovho plotu z EIS. Viditeľný rozdiel priemeru polkruhu reprezentujúceho odpor voči prenosu náboja čistého biosenzora (ružová), odozva na 100 fM roztok asialofetúinu (červená) a odozva na fetúin s rovnakou koncentráciou (zelená).



Obr.2.: Záznam z XPS merania. Po aktivácii karboxylovej skupiny pomocou EDC/NHS sa na povrchu zlatých čipov detekuje dusík, ktorý predtým nebol na povrchu prítomný. Rovnako možné je pozorovať zvýšenie obsahu kyslíka, prítomného v molekule NHS (N-hydroxysukcinimid).



Obr.3.: AFM obrázky povrchu zlatého čipu modifikovaného SAM pre immobilizáciu lektínu. Čistý zlatý čip (vľavo hore, $R_q=0,9$ nm), čip modifikovaný SAM vrstvou 1:1 (vpravo hore, $R_q=1,1$ nm). Ten istý čip po aktivácii EDC/NHS a immobilizácii SNA lektínu (vľavo dole, $R_q=3,1$ nm) a po blokování (vpravo dole, $R_q=2,4$ nm).

Tab.1.: Prehľad rôznych pomerov MUA a MH v roztoku a ich vplyv na výkon biosenzora. RSD – relatívna štandardná odchýlka

Pomer MUA:MH v 1mM roztoku	Citlivosť [$\Omega \text{ rád}^{-1}$]	Lineárny rozsah [poriadky]	Pomer FET/ASF	
1+0	-	-	-	
1+3	110 ± 20	4	0.84	
1+1	550 ± 20	7	3.5	
3+1	870 ± 50	9	1.3	
0+1	44 ± 3	5	0.88	
Blokovacie činidlo	Citlivosť [$\Omega \text{ rád}^{-1}$]	Lineárny rozsah [poriadky]	Pomer FET/ASF	RSD [%]
BSA	790 ± 40	3	1.5 ± 0.2	8.4 ± 5.8
PVA	550 ± 20	7	3.5 ± 0.5	4.6 ± 3.7

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Bertok T., Katrlík J., Gemeiner P., Tkáč J.: Electrochemical lectin based biosensors as a label-free tool in glycomics, *Microchimica Acta*, v tlači
- 2 Bertok T., Šefcovicová J., Gemeiner P., Tkáč J.: Lektinomika: nástroj pre klinickú diagnostiku, *Chemické Listy* 106 (2012), 20- 26
- 3 Mislovicová D., Katrlík J., Paulovicová E., Gemeiner P., Tkáč J.: Comparison of three distinct ELLA protocols for determination of apparent affinity constants between Con A and glycoproteins, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94 (2012) 163-169
- 4 Bertok T., Gemeiner P., Mikula M., Gemeiner P., Tkáč J.: Ultrasensitive impedimetric lectin based biosensor for glycoproteins containing sialic acid, *Microchimica acta*, akceptované

Polysacharidový nanokompozit ako sensor

Tkáč Ján*

*Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra*

*[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)*

Kľúčové slová

Senzor, peroxid vodíka, ampérometrické stanovenie, interferencie, uhlíkové nanorúrky (CNT)

Úvod

Nanomateriály (aspoň jeden z rozmerov do 100 nm) sa veľkosťou približujú veľkosti biorozpoznávacích elementov – proteínov a protilátok (3 – 10 nm) a pri ich spoločnej integrácii dochádza k interakcii na veľmi malej ploche, čo neumožňuje, aby sa proteín po povrchu roztiahol („lateral spreading“), čo vedie následne k denaturácii proteínu a zníženiu aktivity. Nanomateriály sú teda považované za biokompatibilné matrice. Okrem toho veľký pomer plocha/objem spôsobuje, že nanomateriály sú extrémne katalyticky aktívne.

Uhlíkové nanorúrky od ich objavu, či už vo forme viacstenných¹ alebo jednostenných², ovplyvnili rozvoj prakticky každej vedeckej disciplíny a s obľubou sa používajú na prípravu ultracitlivých senzorov, nanozariadení, nanoobvodov, separačných zariadení a zariadení na skladovanie energie; na administráciu liečiv, ako aj na prípravu palivových a biopalivových článkov.^{3,4} Uhlíkové nanorúrky (CNT) je veľmi ťažké dostať do kvapalnej fázy⁵ a je preto dôležité ich modifikovať niektorou z modifikačných procedúr pri príprave disperzií v organickej alebo vodnej fáze.⁶ Kovalentná modifikácia uhlíkových nanorúrok však častokrát vedie k negatívnym zmenám ich fyzikálochemických vlastností, preto by preferenčnou modifikáciou mala byť nekovalentná modifikácia. Disperzné činidlo by malo byť v ideálnom prípade, okrem dispergovania uhlíkových nanorúrok, schopné vnieť funkčné skupiny (využiteľné na následné modifikácie disperzií uhlíkových nanorúrok) a zabezpečiť vysokú biokompatibilitu. Reprodukateľná práca s CNT je možná len v prípade, že sú dispergované v kvapalnej fáze. Veľmi dôležité je, aby disperzné činidlo neovplyvnilo fyzikálno-chemické vlastnosti CNT, preto sa využíva iný ako kovalentný modifikačný protokol. Sensory a biosensory pripravené na báze nanokompozitov s CNTs majú vysoký potenciál pri monitorovaní biotechnologických procesov.

Materiály a metódy

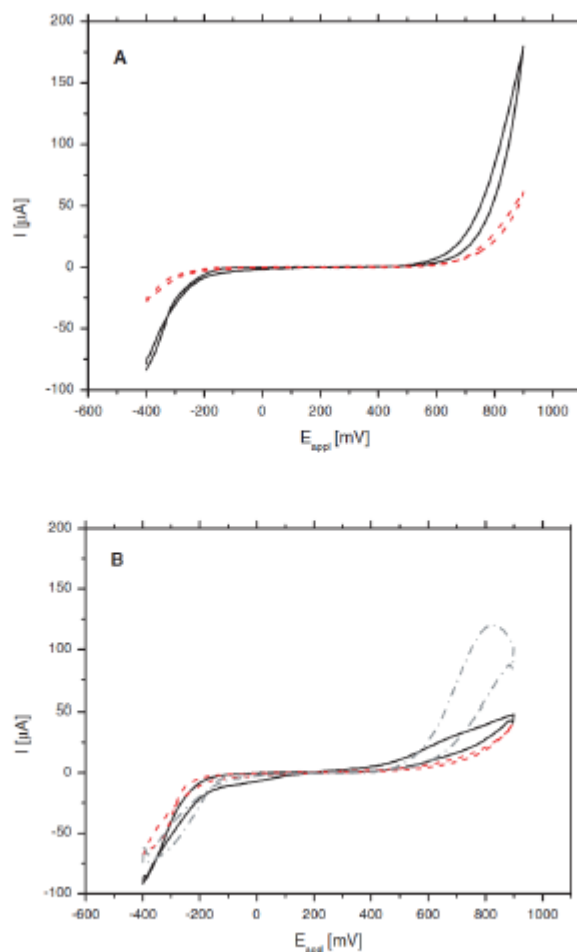
Všetky použité chemikálie ako peroxid vodíka, uhlíkové nanorúrky, dialyzačná membrana a chitozán boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 □S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko).

Výsledky a diskusia

Zo siedmich testovaných disperzných činidiel (organické rozpúšťadlá, povrchovo aktívna látka a nabité polyméry) najstabilnejším disperzným činidlom bol chitozán (*Obr. 1*). Jeho výhodou nie je len stabilita disperzie, ale i krátky čas potrebný na jej prípravu (20 min), mechanická stabilita nanoseného CNT filmu a možnosť využiť -NH₂ skupinu chitozánu na imobilizáciu biorozpoznávacích elementov.

Detekcia peroxidu vodíka bola možná pri nižšom potenciáli („overpotential“), či už s využitím oxidácie peroxidu vodíka alebo jeho redukcie. Celkovo možno povedať, že na

zabezpečenie stability disperzie je dôležité použiť disperzné činidlo s nábojom (či už kladným alebo záporným), čím sa zníži agregácia jednotlivých CNT elektrostatickou repulziou.



Obr.1.: Signál z cyklickej voltampérometrie pre 5 mM H_2O_2 odčítaný od pozadia pre elektródu modifikovanú disperiou uhlíkových nanorúrok v A) dimetylfomamide (—), cyklohexanóne (---) a v B) Nafióne v etanole (---), Nafióne v pufrí (—) a chitozáne (---).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Iijima S., *Nature* **1991**, 354, 56.
- 2 Iijima S., Ichihashi T., *Nature* **1993**, 363, 603.
- 3 Baughman R.H., Zakhidov A.A., de Heer W.A., *Science* **2002**, 297, 787.
- 4 Tkac J., Svitel J., Vostiar I., Navratil M., Gemeiner P., *Bioelectrochem.* **2009**, 76, 53.
- 5 Kharisov B.I., Kharissova O.V., Gutierrez H.L., Mendez U.O., *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, 48, 572.
- 6 Peng X.H., Wong S.S., *Adv. Mater.* **2009**, 21, 625.
- Valcarcel M., Cardenas S., Simonet B.M., *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4788.
- Tasis D., Tagmatarchis N., Bianco A., Prato M., *Chem. Rev.* **2006**, 106, 1105.

Imunochemická analýza prolaminových bielkovín zrna cereálií a pseudocereálií

Peter Socha, Dana Urminská*, Barbara Mickowska¹

Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

¹Faculty of Food Technology, Agricultural University in Krakow, Balicka 122, 30-149 Krakow, Poland.

[*dana.urminska@uniag.sk](mailto:dana.urminska@uniag.sk)

Kľúčové slová

Western-blot, prolamíny, celiakia

Úvod

Bielkoviny zrna obilnín je možné rozdeliť na základe rozpustnosti do štyroch skupín: albumín, ktoré sú rozpustné vo vode, globulíny – rozpustné v roztokoch solí, prolamíny, ktoré sú rozpustné v alkoholoch a bielkoviny, ktoré nie sú rozpustné v neutrálnych roztokoch solí, ani v alkoholoch – glutelíny (Ciccocioppo et. al., 2005). Osborne nazval frakcie prolaminov a glutelínov zásobnými bielkovinami zrna obilnín.

Pšeničné glutelíny sú komplexom nízkomolekulových a vysokomolekulových glutenínov s Mr 15 - 150 kDa, pšeničné prolamíny sú tvorené gliadínmi s Mr 30 - 80 kDa (van Eckert et. al., 2010) a obsahujú vysoké zastúpenie prolínu a glutamínu (20 - 55 %). Okrem pšenice, sa prolamíny nachádzajú aj v jačmeni ako hordeíny, v ovse sú aveníny a v raži sa vyskytujú sekalíny (Weber et. al., 2009). Sekvencie bohaté na Pro a Gln vytvárajú v prolamínoch sekundárne štruktúry, ktoré u citlivých jedincov spôsobujú potravinovú intoleranciu – celiakiu. Celiakiu charakterizuje spektrum rôznych gastro – intestinálnych a kožných prejavov, ktoré sú dôsledkom poškodenia epitelu tenkého čreva po jeho patologickej reakcii na prítomnosť prolaminov v potrave (Zingone et. al., 2010) a následnej malnutricie. Základom liečby celiakie je bezlepková diéta, ktorá prísne eliminuje obilniny a výrobky z nich (Pruska-Kędzior et. al., 2008). Surovinovú základňu výživy celiakov tvorí ryža a kukurica, a preto je potrebné postupne rozširovať dopĺňať ponuku o menej tradičné, ale nutrične hodnotné rastlinné druhy. V potravinovom kódexe sú presne stanovené limity pre obsah zásobných bielkovín obilnín, označovaných ako lepok. Bezlepkové potraviny nesmú obsahovať viac ako 20 ppm lepku. Je veľmi dôležité, aby toto stanovenie bolo presné a jednoznačné. Nezastupiteľné miesto v tomto smere majú imunochemické metódy ELISA alebo imunobloting po elektroforetickej separácii bielkovín v polyakrylamidovom géli, tzv. Western-blot (Battais et. al., 2003).

Imunochemické metódy sú založené na reakcii antigliadínových protilátok získaných z imunizovaných zvierat s antigénmi – celiakálne aktívnymi peptidmi v prolaminových bielkovinách (Wieser, Koehler, 2008). V súčasnosti sa najčastejšie využíva monoklonálna protilátka R5, ktorá bola pripravená proti ražným sekalínom (Konic-Ristic et. al., 2009) a reaguje so sekvenciami QQFPF, QQQFP, LQFPF a QLFPF (Kahlenberg et. al., 2006; van Eckert et. al., 2010), ktoré sa nachádzajú aj v gliadínoch a hordeínoch (Konic-Ristic et. al., 2009). Okrem toho sa pri Western- blot reakcii využívajú aj polyklonálne protilátky.

Materiál a metódy

Biologický materiál bol získaný z Génovej banky SR (SCPV Piešťany):

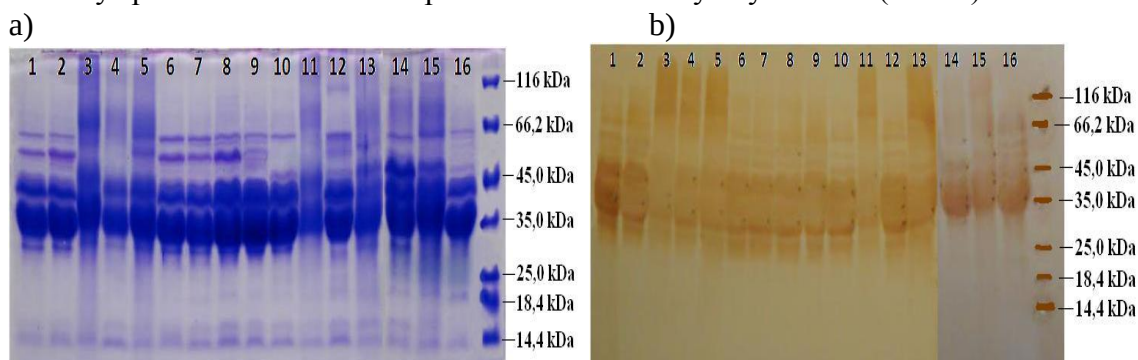
Cereálie a pseudocereálie	Odroda
Ovos (<i>Avena sativa</i>)	Ardo, Atego
Ovos nahý (<i>Avena sativa</i>)	Detvan, Izak, Polar

Jačmeň jarný (<i>Hordeum vulgare</i>)	Levan, Ludan, Radegast, Sladar
Jačmeň ozimný (<i>Hordeum vulgare</i>)	Amsterdam, Babette, Gerlach, Luran
Raž ozimná (<i>Secale cereale</i>)	Amilo, Dankowskie Nowe
Tritikale jarné (<i>Triticosecale</i>)	Wanad
Tritikale ozimné (<i>Triticosecale</i>)	Kendo, Kinerit
Pšenica jarná (<i>Triticum aestivum</i>)	Granny, Saxana
Pšenica ozimná (<i>Triticum aestivum</i>)	Arida, Balaton, Blava, Brea, Hana, Karpatia, Ignis, Markola, Viginta, Vlada
Pšenica tvrdá (<i>Triticum durum</i>)	Riveldur, Soldur
Pšenica špaldová jarná (<i>Triticum spelta</i>)	Ceralio, Jary B10, Rubiota
Pšenica špaldová ozimná (<i>Triticum spelta</i>)	Schwabenkorn
Proso siate (<i>Panicum miliaceum</i>)	Unikum
Cícer baraní (<i>Cicer arietinum</i>)	Punjab, Slovák
Vika siata (<i>Lathyrus sativus</i>)	Arida
Mohár taliansky (<i>Setaria italica</i>)	Čiernoklas, Friderika, Z2300002
Mrlík (<i>Chenopodium quinoa</i>)	Baer, Carmen, Faro
Pohánka streliciová (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	FAG 120/82, Pyra, Špačinská
Láskavec červenoklasý (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)	Koniz
Ryža siata (<i>Oryza sativa</i>)	okružlozrná, basmati, natural
Kukurica siata (<i>Zea mays</i>)	bez odrodového označenia

Extrakcia prolamínov bola realizovaná pridaním 15 ml 70 % etylalkoholu k 1 g celozrnného šrotu, SDS-PAGE bola uskutočnená podľa metódy Schagger a von Jagov (1987). Electrotransfer proteínov po elektroforetickej separácii na PVDF membránu ImmobilonP^{SQ} sa uskutočnil počas 1,5 h. pri 170 mA (Millipore, USA) a na vizualizáciu proteínov bol použitý roztok Ponceau S-red. Pre Western-blot bola membrána inkubovaná počas 1 h. v roztoku TBS s 1 % hovädzím sérovým albumínom pH 7.6 a po premytí bola prenesená na 1,5 h. do roztoku primárnej protilátky. Následne, po premytí, bola membrána umiestnená do roztoku sekundárnej protilátky na dobu 1 h. Detekcia sa uskutočnila pomocou diaminobenzidínu.

Výsledky

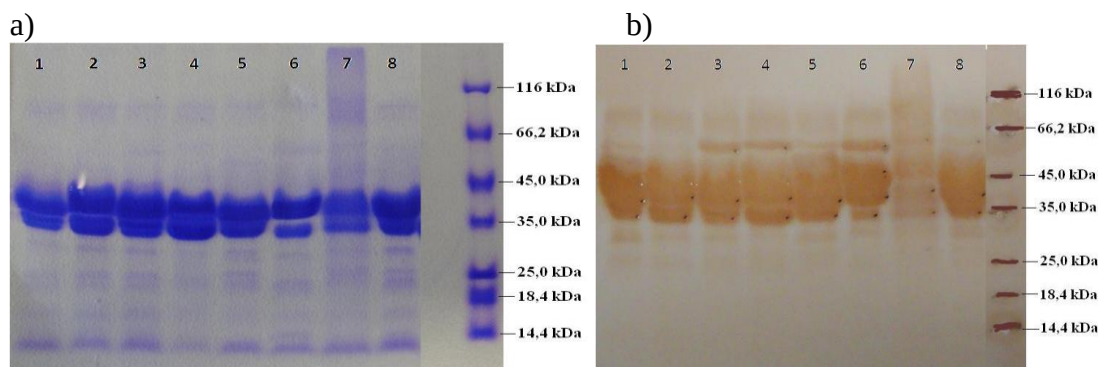
Z imunochemickej analýzy prolamínových bielkovín vyplýva, že neexistujú odlišnosti medzi alergénou aktivitou týchto bielkovín izolovaných z rozdielnych druhov odrôd rodu *Triticum*. Identifikované boli gliadíny s Mr 32 kDa (α -gliadíny), 38 - 42 kDa (γ -gliadíny) a 55 - 79 kDa (ω -gliadíny) (van Eckert et al., 2010). Rozdiely sú len v kvantitatívnom zastúpení a preto musí byť pšenica ako surovina úplne eliminovaná z výživy celiaka (Obr. 1).



Obrázok 1 SDS-PAGE (a) a Western-blot (b) prolamínov rodu *Triticum*

Obsah bielkovín (μg): 1. Ignis (41,0); 2. Markola (35,6); 3. Arida (31,5); 4. Balaton (19,7); 5. Blava (32,8); 6. Viginta (31,5); 7. Brea (25,8); 8. ID Karpatia (37,1); 9. Hana (41,0); 10. Vlada (35,7); 11. Granny (25,9); 12. Saxana (31,8); 13. Riveldur (34,2); 14. Soldur (30,6); 15. Rubiota (34,1); 16. Ceralio (29,9).

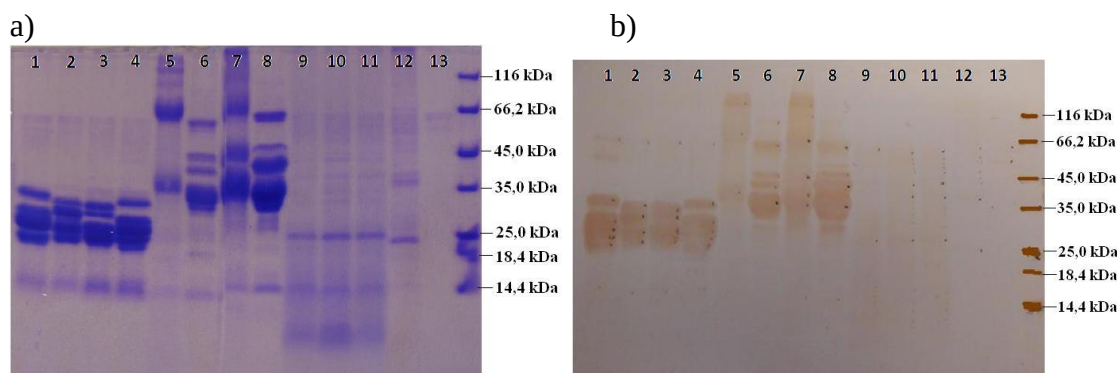
Hordeíny jačmeňa tvoria predovšetkým proteíny s Mr 30 – 45 kDa (Obr. 2), ktoré pozitívne reagujú s protilátkami a preto celiatik nesmie konzumovať jačmeň a výrobky z neho.



Obrázok 2 SDS-PAGE (a) a Western-blot (b) prolamínov rodu *Hordeum*

Obsah bielkovín (μg): 1. Levan (49,5); 2. Ludan (58,1); 3. Radegast (45,3); 4. Sladar (60,4); 5. Amsterdam (65,3); 6. Babette (58,2); 7. Gerlach (48,7); 8. Luran (55,6).

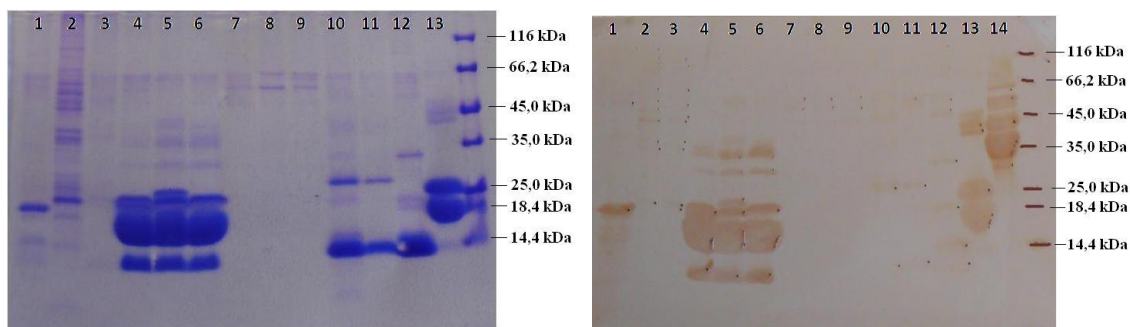
Sekalíny raže sú tvorené predovšetkým proteínmi s Mr >35 kDa a Mr > 66 kDa, tritikale obsahuje typické proteíny pšenice aj raže, a to je predovšetkým frakcia s Mr 35 - 45 kDa a 66 kDa (Obr. 3). Aveníny ovsu sú bielkoviny s Mr < 35 kDa a ich reakcia s protilátkou bola veľmi výrazná, čo je v rozpore so zisteniami viacerých autorov, ktorí pokladajú ovos za potravinu bezpečnú pre výživu celiakov (Janatuinen et. al., 1995; Størsrud et. al., 2003; Silano et. al., 2007). Zastúpenie prolamínov v zrne pseudocereálií je minoritné a z imunochemickej reakcie vyplýva, že tieto bielkoviny nereagujú s protilátkami voči gliadínom. Láskevce, pohánka, proso a cícer sú vhodnými surovinami pre prípravu tzv. bezlepkovej diéty.



Obrázok 3 SDS-PAGE (a) a Western-blot (b) zásobných bielkovín ovsu, raže, tritikale, pohánky, cíceru a laskavca

Obsah bielkovín (μg): 1. ovos Ardo (25,3); 2. ovos Atego (17,2); 3. ovos Detvan (25,7); 4. ovos Izák (12,9); 5. raž Dankowskie Nowe (17,6); 6. tritikale Kendo (16,2); 7. tritikale Kinerit (38,7); 8. tritikale Wanad (44,1); 9. pohánka Špačinská (5,5); 10. pohánka FAG 120/82 (5,1); 11. pohánka Pyra (3,3); 12. cícer Punjab (2,8); 13. laskavec Koniz (0,6);

a) b)



Obrázok 4 SDS-PAGE (a) a Western-blot (b) zásobných bielkovín prosa, cicero, vika, mrlíka, mohár, ryže a kukurice

Obsah bielkovín (μg): 1. proso Unikum (5,3); 2. cícer Slováč (4,4); 3. vika Arida (3,3); 4. mohár Čiernoklas (62,5); 5. mohár Friderika (62,1); 6. mohár Z2300002 (65,1); 7. mrlík Carmen (0,2); 8. mrlík Faro (0,5); 9. mrlík Baer (0,3); 10. ryža (18,9); 11. ryža natural (5,5); 12. ryža Basmati (18,7); 13. kukurica (53,8); 14. kontrola pšenica Ignis (41,0).

Zrno ryže obsahuje predovšetkým bielkoviny s Mr 15 kDa (Obr. 4), mohár obsahuje vysoké koncentrácie bielkovín typu prolamínov s Mr < 25 kDa, zeíny kukurice majú Mr > 25 kDa. Veľmi prekvapivá bola pozitívna reakcia zeínov kukurice s antigliadínovými protilátkami. Kukurica tvorí základ výživy celiakov a je bezpečne považovaná za bezpečnú, nealergénnu surovinu. Na základe získaných výsledkov je možné predpokladať, že natívne proteíny môžu pozitívne reagovať s protilátkou, ale v procese tepelnej úpravy a technologického spracovania, resp. v procese trávenia potravy, sú zeíny kukurice štiepené a vzniknuté peptidy nie sú alergénnym agens. Vika, ryža a mrlík môžu byť využívané vo výžive celiakov.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Battais, F. – Pineau, F. – Popineau, Y. – Aparicio, C. – Kanny, G. – Guerin, L. – Moneret-Vautrin, D. A. – Denery-Papini, S. 2003. Food Allergy To Wheat: Identification Of Immunoglobulin E And Immunoglobulin G-Binding Proteins With Sequential Extracts And Purified Proteins From Wheat Flour. In: *Clin. Exp. Allergy*, Vol. 33, 2003, P. 962-970.
- Ciccocioppo, R. – Di Sabatino, A. – Corazza, G. R. 2005. The Immune Recognition Of Gluten In Celiac Disease. In: *Clinical And Experimental Immunology*, Vol. 140, 2005, P. 408-416.
- Eckert Van, R. – Bond, J. – Rawson, P. – Klein, Ch. L. – Stern, M. – Jordan, T. W. 2010. Reactivity Of Gluten Detecting Monoclonal Antibodies To A Gliadin Reference Material. In: *Journal Of Cereal Science*, Vol. 51, 2010, P. 198-204.
- Janatuinen, E. K. – Pikkarainen, P. H. – Kempainen, T. A. – Kosma, V. M. – Järvinen, R. M. K. – Uusitupa, M. I. J. – Julkunen, R. J. K. 1995. A Comparison Of Diets With And Without Oats In Adults With Celiac Disease. In: *N. Engl. J. Med.*, Vol. 333, 1995, P. 1033-1037.
- Kahlenberg, F. – Sanchez, D. – Lachmann, I. – Tuckova, L. – Tlaskalova, H. – Méndez, E. – Mothes, T. 2006. Monoclonal Antibody R5 For Detection Of Putatively Coeliac-Toxic Gliadin Peptides. In: *Eur. Food. Res. Technol.*, Vol. 222, 2006, P. 78-82.
- Konic-Ristic, A. – Dodig, D. – Krstic, R. – Jelic, S. – Stankovic, I. – Ninkovic, A. – Radic, J. – Besu, I. – Bonaci-Nikolic, B. – Jojic, N. – Djordjevic, M. – Popovic, D. – Juranic, Z. 2009. Different Levels Of Humoral Immunoreactivity To Different Wheat Cultivars Gliadin Are

- Present In Patients With Celiac Disease And In Patients With Multiple Myeloma. In: *Bmc Immunology*, Vol. 10, 2009, P. 1-7.
- Pruska-Kędzior, A. – Kędzior, Z. – Gorący, M. – Pietrowska, K. – Przybylska, A. – Spsychalska, K. 2008. Comparison Of Rheological, Fermentative And Baking Properties Of Gluten-Free Dough Formulations. In: *Eur. Food Res. Technol.*, Vol. 227, 2008, P. 1523-1536.
- Schägger, H. – Von Jagow, G. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis For The Separation Of Proteins In The Range From 1 To 100 Kda. In: *Analytical Biochemistry*, Vol. 166, 1987, No. 2, P. 368-379
- Silano, M. Benedetto, R. – Maialelli, F. – Vincenzi, A. – Calcaterra, R. – Cornell, H. J. – Vincenzi, M. 2007. Avenins From Different Cultivars Of Oats Elicit Response By Coeliac Peripheral Lymphocytes. In: *Scandinavian Journal Of Gastroenterology*, Vol. 42, 2007, P. 1302-1305.
- Størsrud, S. – Hulthén, L. R. – Lenner, R. A. 2003. Beneficial Effects Of Oats In The Gluten-Free Diet Of Adults With Special Reference To Nutrient Status, Symptoms And Subjective Experiences. In: *British Journal Of Nutrition*, Vol. 90, 2003, P. 101-107.
- Weber, D. – Clérout, Ch. – Godefroy, S. B. 2009. Emerging Analytical Methods To Determine Gluten Markers In Processed Foods – Method Development In Support Of Standard Setting. In: *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol. 395, 2009, P. 111-117.
- Wieser, H. – Koehler, P. 2008. The Biochemical Basis Of Celiac Disease. In: *Cereal Chemistry*, Vol. 85, 2008, No. 1, P. 1-14.
- Zingone, F. – Capone, P. – Ciacci, C. 2010. Celiac Disease: Alternatives To A Gluten Free Diet. In: *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, Vol. 1, 2010, No. 1, P. 36-39.

RIZIKÁ APLIKÁCIE KALOV NA OBSAH KADMIA A OLOVA V PÔDE

Tomáš Tóth, Dana Urminská, Juraj Miššík, Alena Vollmannová, Július Árvay

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, SR
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-949 76 Nitra, Slovensko*

Abstrakt:

Biokal, vyhnitý substrát, je produktom, ktorý vzniká pri výrobe bioplynu po kontinuálnej kofermentácii živočíšnych exkrementov a rastlinných zvyškov. Takto získaný biokal je možné aplikovať na pôdu ako alternatívne hnojivo, ktoré má svoje charakteristické vlastnosti, ale aj riziká. Využívaním alternatívnych zdrojov energie sa získava aj značné množstvo vedľajšieho produktu, ako je biokal.. Z pohľadu odberateľa, rozhodujúce vlastnosti kalov spočívajú v ich priaznivom hnojivom účinku vplyvom obsahu: organickej hmoty, makroelementov, mikroelementov. V práci sme sa zamerali na hodnotenie kvality pôdy po aplikácii biokalu získaného po kontinuálnej kofermentácii živočíšnych exkrementov a rastlinných odpadov. Pokusy sa uskutočnili na Výskumnej báze SPU – Kolíňany v rámci projektu VEGA č. 1/345/04 - Výskum využitia biokalu po kontinuálnej kofermentácii živočíšnych odpadov a energetických plodín pre udržanie racionálnej intenzity rastlinnej výroby a kvality prírodného prostredia

Kľúčové slová: biokal, ťažké kovy, pôdna hygiena, kontaminácia

Úvod

Na ornú pôdu je možné priamo aplikovať tekuté, alebo odvodnené kaly podľa nárokov poľnohospodárskych plodín. Pôdy musia vyhovovať kritériám, t.j. vhodné pH, sorpčná kapacita, obsah škodlivín v pôde i v kaloch a pod. Problematika pôdnej hygieny v návaznosti na obsah ťažkých kovov v pôde ako aj ich následného vstupu do rastlín je v dnešnej dobe aktuálna. Jedným zo spôsobov pri využívaní alternatívnych zdrojov energie je aplikácia vyhnutého substrátu po kontinuálnej výrobe bioplynu a následne sledovanie jeho komplexného vplyvu na stav pôdnej hygieny so zreteľom na input ťažkých kovov. Sem patria čistiarenské odpadové kaly a dnové sedimenty vodných diel, ako aj biokal, získaný na kontinuálnej kofermentácii živočíšnych exkrementov. S aplikáciou biokalu súvisí aj možné riziko vstupu kadmia a olova, ako aj ďalších rizikových prvkov do pôdy. Ich množstvo a forma v súčinnosti s pôdnymi vlastnosťami môže predstavovať riziko ich vstupu do rastlinných komodít, pestovaných na týchto pôdach. Mobilitu alebo imobilitu ťažkých kovov v pôde ovplyvňujú nasledovné vlastnosti: pôdna reakcia, organická hmota, minerálne zloženie, obsah oxidov....S aplikáciou biokalu súvisí aj možné riziko vstupu rizikových prvkov do pôdy. Ich množstvo a forma v súčinnosti s pôdnymi vlastnosťami môže predstavovať riziko ich vstupu do rastlinných komodít, pestovaných na týchto pôdach. Mikroelementy zastúpené v kaloch môžu priaznivo ovplyvňovať ich zásobu v pôde. V praxi však predstavujú riziko, nakoľko, obsah mikroelementov je často vysoký (Cu, Zn, Mo) To isté platí pre Pb, Cr, Ni, Hg, Cd a As. Práve obsah ťažkých kovov a toxických prvkov limituje použiteľnosť biokalov, ako hnojivého substrátu. Činnosťou mikroorganizmov v pôde dochádza k bioakumulácii kovov v rastlinách, cez krmoviny sa ťažké kovy následne dostávajú do živočíšnych organizmov. Bioakumuláciou dochádza často k fyzikálnym zmenám, napríklad k redukcii alebo oxidácii kovov (As, Mn, Se, Tc), ale aj k ich metylácii (Hg, Cd, Pb, Te), čím sa výrazne menia ich fyziologické účinky. V zmesiach sa toxické účinky jednotlivých kovov môžu navzájom zosilňovať (synergizmus Cd+Zn, Ni+Zn, Hg+Cu a ďalšie), ale tiež zoslabovať (antagonizmus Se+Cd, Se+Hg...). Príjem kadmia koreňmi rastlín je determinovaný jeho rozpustnosťou v pôde, pH pôdy, obsahom alkalických kovov a kovov

alkalických zemín, ako aj prítomnosťou iných ťažkých kovov. Kadmium je prístupnejšie pre rastliny na kyslejších pôdach ako na pôdach s vyšším pH. Najčastejšie sa vyskytujúce formy olova v pevnej fáze pôdy: Pb CO_3 a Pb SO_4 . Z hľadiska mobility olovo v pôdach patrí k najmenej pohyblivým prvkom. Mnohí autori zistili, že prídavok huminových látok výrazne imobilizoval rozpustné a výmenné formy niektorých ťažkých kovov vrátane olova. Olovo má vysokú afinitu k tvorbe komplexov s nerozpustnými huminovými látkami, čo vedie k fixácii a imobilizácii tohto prvku v humusových vrstvách pôdy.

Materiál a metódy

Vstup kadmia a olova do pôdy aplikáciu biokalu získaného po kontinuálnej kofermentácii živočišných odpadov a energetických plodín sme zisťovali v podmienkach poloprevádzkového pokusu na Výskumnej báze SPU v Kolíňanoch. Záujmová plocha je situovaná východne od obce Kolíňany na parcele „Letisko“. Severnou hranicou je štátna cesta Nitra – Zlaté Moravce, východnou hranicou letisko VPP a juhozápadnou hranicou je koryto miestneho potoka. Parcela má východozápadný sklon s nadmorskou výškou v rozpätí 160 – 180 m n. m. Pôdny typ : hnedozem kultizemná.

Varianty pokusu :

- Kontrola : bez aplikácie biokalu
- Variant 1 : aplikácia biokalu na jeseň – $50 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$
- Variant 2 : aplikácia biokalu na jar – $50 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$

V rámci poloprevádzkových pokusov sa na parcelách o veľkosti 18×100 metrov pestovali nasledovné plodiny : jačmeň jarný , cukrová repa, kukurica na siláž, slnečnica ročná. Medzi jednotlivými parcelami boli zaradené ochranné plochy o veľkosti 6×100 m. Pri odbere a úprave pôdnych sme postupovali podľa „Závazných metodík rozborov pôd, ČMS – Pôda. Pre hodnotenie pôdnej hygieny sme stanovili celkové obsahy ťažkých kovov (Cd a Pb) vo výluhu $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4 + \text{HF}$. Analýzy pôdnych mineralizátov sa uskutočnili metódou plameňovej atómovej absorpčnej spektrofotometrie v plameni acetylén – vzduch na základe charakteristickej absorpcie žiarenia na rezonančných čidlách týchto prvkov. Celkové obsahy ťažkých kovov zahŕňujú ich všetky formy, ktoré sa v pôde nachádzajú a podľa Rozhodnutia MP SR o najvyšších prípustných hodnotách škodlivých látok v pôde č. 531/1994 sú určujúce pre hodnotenie pôdnej hygieny. V záujme posúdenia bioprístupnosti ťažkých kovov sme sledovali sledovať distribúcia ťažkých kovov v jednotlivých pôdnych typoch metódou selektívnej sekvenčnej extrakcie (SSE) podľa metodiky Ziehena a Brümmera v hĺbke 0 – 0,1 m. V tejto hĺbke prebieha najaktívnejší príjem ťažkých kovov, a preto je hodnotenie ich bioprístupnosti najvýznamnejšie.

Stanovili sme nasledujúcich sedem frakcií :

1. **frakcia** : *mobilné formy ťažkých kovov*, Extr. : $1 \text{ M NH}_4\text{NO}_3$
2. **frakcia** : *ľahko prístupné formy ťažkých kovov*, Extr. : $1 \text{ M NH}_4\text{OAc}$
3. **frakcia** : *ťažké kovy viazané na Mn – oxidy*, Extr. : $0,1 \text{ M NH}_2\text{OHHCl} + 1 \text{ M NH}_4\text{OAc}$
4. **frakcia** : *kovy viazané na organickú hmotu*, Extr. : $0,025 \text{ M NH}_4\text{-EDTA}$
5. **frakcia** : *kovy viazané na amorfné Fe – oxidy*, Extr. : $0,2 \text{ M NH}_4\text{OAc}$
6. **frakcia** : *kovy viazané na kryštalické Fe – oxidy*, Extr. : $0,1 \text{ M kys. askorbová} + 0,2 \text{ M NH}_4\text{-oxalát}$
7. **frakcia** : *reziduálna frakcia*, Extr. : $65 \% \text{ HNO}_3, 72 \% \text{ HClO}_4$

Analytická metóda stanovenia bola plameňová AAS (PYE UNICAM SP-9).

Výsledky a diskusia

Aplikáciou biokalu (v dávke $50 \text{ t} \cdot \text{ha}^{-1}$) na jar a na jeseň, sa do pôdy dostalo aj určité množstvo Cd a Pb. Množstvom kadmia a olova v aplikovanom biokale je uvedené v tab. 1.

Tabuľka 1 Obsah kadmia a olova v aplikovanom biokale a v mg.kg⁻¹

	Biokal aplikovaný na jeseň	Biokal aplikovaný na jar
Sušina (v %)	5,084	4,925
Kadmium	0,010	0,034
Olovo	0,111	0,479

Celkový obsah kadmia v pôde je uvedený v tabuľke 2. Vo všetkých variantoch bol celkový obsah kadmia v pôde vyšší, ako je legislatívne stanovená hodnota (0,8 mg.kg⁻¹). V porovnaní s kontrolným, nehnojeným varinatom (1,16 Cd mg.kg⁻¹) sa aplikáciou biokalu zvýšil obsah kadmia v pôde vo variante 1 o 6,8 % (1,24 Cd mg.kg⁻¹) a vo variante o 3,4 % . Celkový obsah olova je v kontrolnom a vo variante 2 vyšší ako je limitná hodnota (35 mg.kg⁻¹). V porovnaní s kontrolným variantom sa vo variante 1 znížil obsah Pb v pôde o 10,2 % a vo variante 2 sa zvýšil obsah Pb o 3,4 %.

Metódou selektívnej sekvenčnej extrakcie (SSE) sme stanovili formy Cd a Pb v pôde. Namerané hodnoty podľa jednotlivých frakcií sú uvedené v tab. 3 a 4 a v obrázkoch 1 až 6. Z hľadiska prístupnosti ťažkých kovov v pôde sú pre rastliny najviac prístupné frakcie 1 až 4.

Tabuľka 2 Celkový obsah kadmia a olova v pôde v mg.kg⁻¹

	Pôdny subtyp	pH/KCl	Humus (%)	Cd	Limitný obsah Cd*	Pb	Limitný obsah Pb *
kontrola	hnedozem kultizemná	4,59	1,86	1,16	0,8	35,2	35
variant 1		5,02	1,98	1,24		31,6	
variant 2		5,09	1,87	1,20		36,4	

* - Limitné hodnoty pre obsah Cd a Pb v pôdach podľa Vestníka MP SR (č. 531/1994 – 540)

Tabuľka 3 Frakcionácia kadmia v mg.kg⁻¹

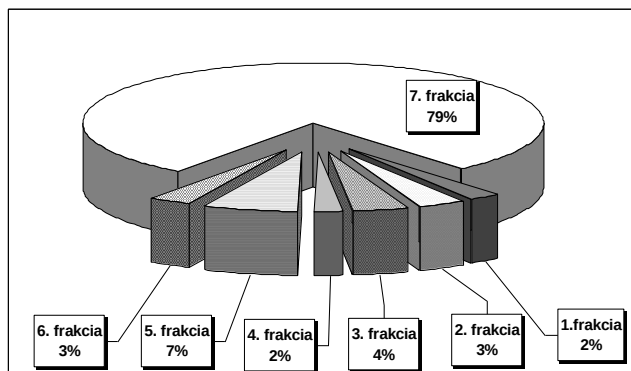
VARIANT	1. frakcia	2. frakcia	3. frakcia	4. frakcia	5. frakcia	6. frakcia	7. frakcia
kontrola	0,075	0,067	0,082	0,030	0,142	0,091	1,497
variant 1	0,045	0,067	0,075	0,037	0,135	0,061	1,570
variant 2	0,085	0,082	0,082	0,105	0,127	0,105	1,617

Frakcionáciou kadmia sme zistili, že aplikáciu biokalu do pôdy sa podiel jednotlivých frakcií zmenil len v minimálnej miere. Podiel jednotlivých frakcií vo všetkých sledovaných variantoch je uvedený v obrázkoch 1 až 3.

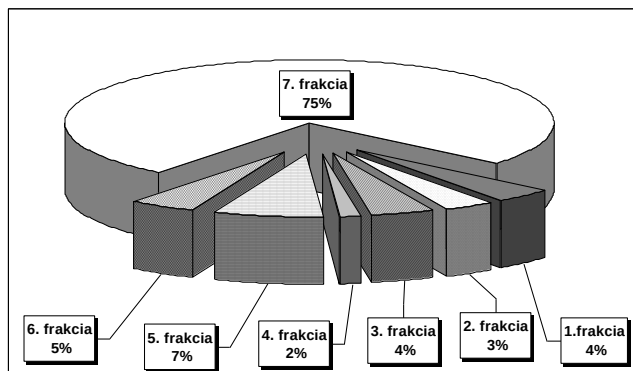
Tabuľka 4 Frakcionácia olova v mg.kg⁻¹

VARIANT	1. frakcia	2. frakcia	3. frakcia	4. frakcia	5. frakcia	6. frakcia	7. frakcia
kontrola	0,30	0,67	3,22	17,02	4,12	6,75	7,80
variant 1	1,35	0,45	2,17	10,80	5,32	5,77	7,31
variant 2	1,11	2,32	1,21	9,60	5,71	4,12	6,01

Obrázok 1 Percentuálne vyjadrenie zastúpenia kadmia v pôdach podľa jednotlivých frakcií v kontrolnom variante



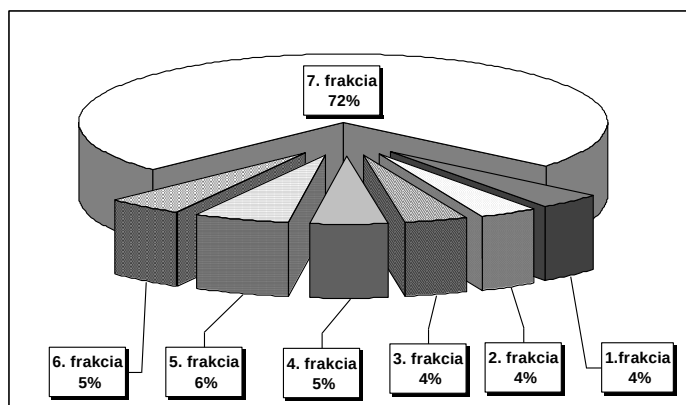
Obrázok 2 Percentuálne vyjadrenie zastúpenia kadmia v pôdach podľa jednotlivých frakcií vo variante 1



Zastúpenie frakcií 1 až 4, predstavujúcich rastlinami prijateľné formy kadmia je v kontrolnom variante v sumáre 13 %, vo variante 1 je to 11 % a vo variante 2 je to 17 % z celkového obsahu kadmia v pôde.

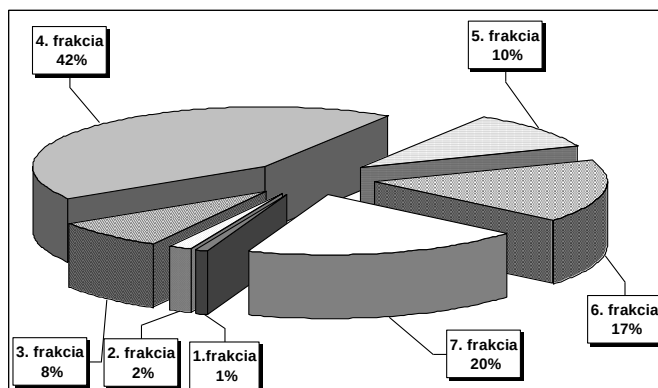
Najväčšie zastúpenie má reziduálna frakcia, a to v rozpätí 72 až 79 %. Z uvedeného vyplýva, že 72 až 79 % kadmia v pôde sa nachádza vo formách, ktoré nie sú pre rastliny prijateľné a nepredstavujú riziko ich zvýšeného príjmu.

Obrázok 3 Percentuálne vyjadrenie zastúpenia kadmia v pôdach podľa jednotlivých frakcií vo variante 2

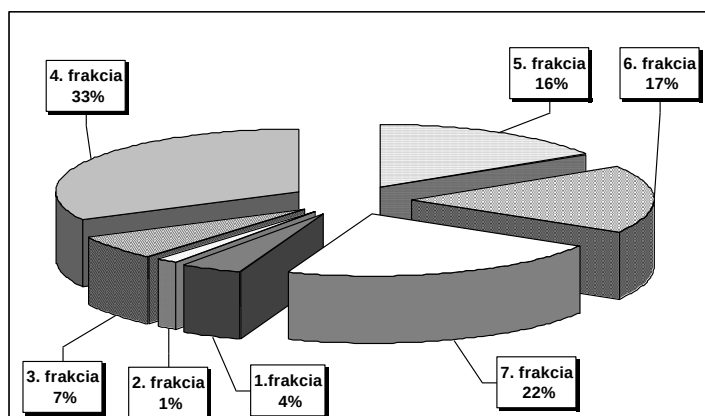


Zastúpenie jednotlivých frakcií olova je uvedený v obrázkoch 4 až 6. Na rozdiel od kadmia, zastúpenie prístupných foriem Pb v pôde je vyšší, s prevládajúcou frakciou č. 4 (Pb viazané na organickú hmotu).

Obrázok 4 Percentuálne vyjadrenie zastúpenia olova v pôdach podľa jednotlivých frakcií v kontrolnom variante

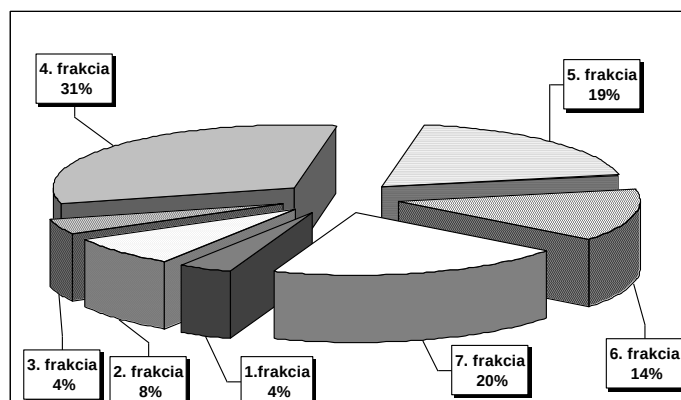


Obrázok 5 Percentuálne vyjadrenie zastúpenia olova v pôdach podľa jednotlivých frakcií vo variante 1



Zo sumáru frakcií 1 až 4 vyplýva, že podiel týchto frakcií Pb v pôde je v kontrolnom variante 54 %, vo variante 1 to je 45 % a vo variante 2 je to 47 % podiel. V porovnaní s kontrolným variantom sa aplikáciou biokalu znížil podiel prístupného Pb v pôde o 9 % (variant 1) a o 7 % (variant 2) ale zároveň sa zvýšilo zastúpenie Pb v 5. frakcii (Pb viazané na amorfné Fe oxidy) o 6 % (variant 1) a o 9 % (variant 2). Zastúpenie ostatných frakcií sa zmenilo v minimálnej miere.

Obrázok 6 Percentuálne vyjadrenie zastúpenia olova v pôdach podľa jednotlivých frakcií vo variante 2



Záver

Na základe rozborov pôd na obsah a formy Kadmia a olova možno konštatovať, že obsah Cd prekračuje limitnú hodnotu, z čoho vyplýva riziko jeho vstupu do rastlín, avšak metódou SSE sme zistili, že 72 až 79 % Cd sa nachádza v pôde vo formách, ktoré nie sú pre rastliny prijateľné. Aplikáciu biokalu sa obsah kadmia v pôde zvýšil o 6,8 % a 3,4 % (variant 1 a 2). Celkový obsah olova v pôde je nižší ako je legislatívne stanovená limitná hodnota iba vo variante 1. Aplikáciu biokalu sa jeho obsah v pôde nezvýšil. Metódou SSE sme však zistili, že aj podlimitný obsah Pb v pôde môže predstavovať riziko jeho zvýšeného príjmu rastlinami, nakoľko 45 až 54 % z jeho celkového obsahu v pôde sa nachádza vo formách, ktoré sú rastlinami prijateľné. Aplikáciu biokalu sa podiel prístupných foriem v porovnaní s kontrolným variantom znížil o 9 a 7 %, čo možno hodnotiť ako pozitívny vplyv na pôdnu hygienu.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. CHLPÍK, J. - POSPÍŠIL, R. : Plošná charakteristika mechanických a chemických vlastností pôdy na Výskumnej báze Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre, lokalita Kolíňany. In : Acta fytotechnica et zootechnica, roč. 7, 2004, č 1., s. 6-10.
2. LAHUČKY, L a kol. Vertikálna migrácia kadmia vo vybraných pôdnych predstaviteľoch. In : Agriculture, vol. 51, 2005, No. 8, s. 429-435.
3. PARILÁKOVÁ, K. Možnosti riešenia biologicko-technickej rekultivácie kalových polí ZSNP a.s. Žiar nad Hronom. VÚPOP Bratislava, Pedo-Disertationes. 2003.ISBN 80-89128-02-5. 128 s.
4. VOLLMANNOVÁ, A. - LAHUČKÝ, L. - LAZOR, P. - HEGEDUSOVÁ, A., Kumulácia ťažkých kovov bôbom vo vzťahu k obsahu ich potenciálne bioprístupných foriem v pôde. In: Chemické Listy 98 (8), 2004, s.532 ,

Kontaktná adresa

Tomáš Tóth, Katedra chémie, FBP SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, e-mail : tomas.toth@uniag.sk

pH závislost jednotlivých aktivních center enzymu bilirubin oxidáza

Jaroslav Filip, Ján Tkáč*

*Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra*

*[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)*

Klíčová slova

bilirubin oxidáza, aktivní centra, protonový transfer

Úvod

Bilirubin oxidáza (BOD) patří mezi tzv. „Multicopper“ oxidázy, tedy rodinu oxidoreduktáz zabezpečujících jednoelektronovou oxidaci substrátu a následně čtyřelektronovou redukci kyslíku na vodu pomocí čtyř atomů mědi. K samotné oxidaci dochází v aktivním centru zvaném T1 a odtud jsou elektrony transportovány k aktivnímu centru označenému T2/T3. Zde dochází k navázání molekulárního kyslíku a přes intermediáty k jeho redukci na vodu. T1 a T2 centra obsahují po jednom Cu atomu, T3 je tvořeno dvěma Cu atomy [1]. Díky efektivitě redukce kyslíku je BOD spolu s lakázami nejčastěji používanými enzymatickými katalyzátory pro konstrukci katod biopalivových článků, tedy zařízení, v nichž je biokatalyticky přeměňována část chemické energie dodávaného substrátu na energii elektrickou. Díky těmto možnostem využití byla věnována velká pozornost detailnímu zkoumání mechanismu redukce kyslíku stejně jako hledání hlavních parametrů s vlivem na operační vlastnosti připravených biokatod [2,3].

V předchozích studiích bylo připraveno nanostrukturované elektrodové rozhraní vhodné pro efektivní imobilizaci BOD [4]; takto připravená biokatoda byla použita na elektrochemickou charakteristiku jednotlivých aktivních center, která byla detekovatelná pomocí cyklické voltametrie (CV). Byla zjištěna poměrně komplexní závislost mezi jednotlivými atomy mědi, kdy redoxní stav jednoho aktivního centra má vliv na elektrochemické vlastnosti sousedících aktivních center. Další parametr ovlivňující elektrochemii jednotlivých Cu atomů jsou ligandy, kterými jsou komplexovány.

V této práci je zjišťována elektrochemická charakteristika aktivních center BOD v závislosti na pH elektrolytu. Pomocí pH profilu redoxních pontenciálů jednotlivých center lze detekovat jednak deprotonaci jednotlivých Cu ligandů a obecně porovnat charakter protonového transportu pro jednotlivá aktivní centra.

Materiál a metody

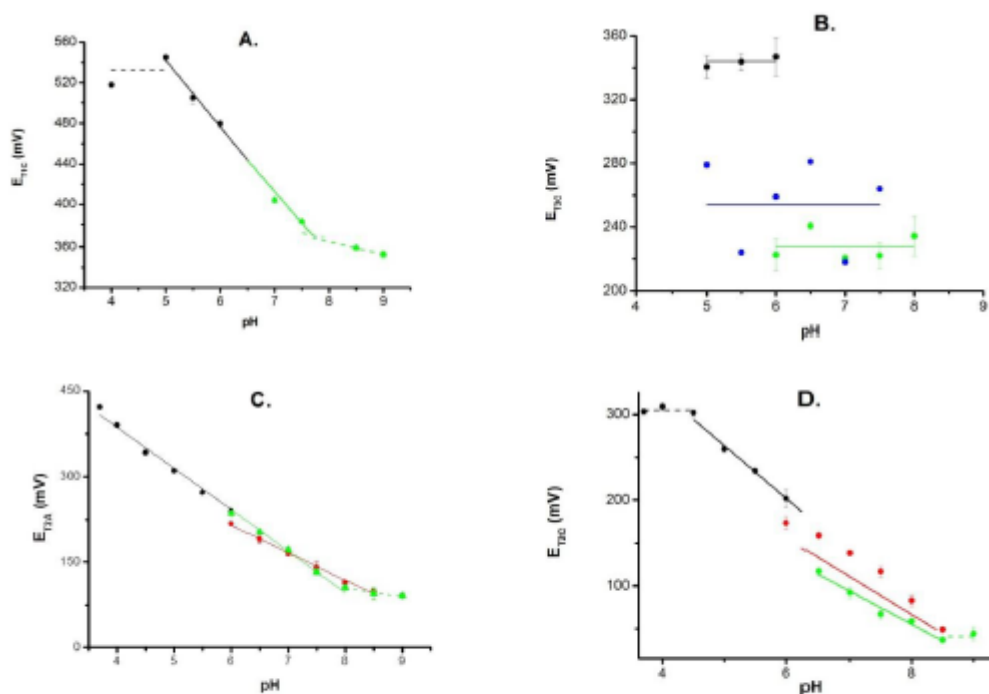
Uhlíkové nanotrubičky ($d = 1.1 \text{ nm}$, $l = 0.5\text{--}100 \text{ }\mu\text{m}$, čistota $> 90\%$), BOD (izolováno z *Myrothecium verrucaria*), chitosan (CHI, MW = 50-190 kDa) – Sigma Aldrich; St. Louis, USA. KetjenBlack EC 600-JD (Akzo Nobel Polymer Chemicals B.V., Amersfoort, Nizozemsko) darováno firmou Biesterfeld Silcom s.r.o. (Praha, Česká republika). Ostatní chemikálie čistoty p.a. Modifikované uhlíkové elektrody (GCE; BAS) byly charakterizovány na potenciostatu PGSTAT 128N (Ecochemie, Utrecht, Nizozemsko) s tříelektrodovým uspořádáním (Ag/AgCl referenční, disková platinová jako pomocná a modifikovaná uhlíková jako pracovní elektroda). BOD biokatody byly připraveny podle protokolu publikovaného v [4]: na povrch přečištěné GCE bylo deponováno 5 l disperze KB (4,3 mg ml⁻¹) a CNT (0,67 mg ml⁻¹) dispergovaných v chitosanu (0,1% v 0,3% kyselině octové), ta byla nechána zaschnout a takto připravená elektroda byla po opláchnutí v pufru inkubována 8 h s roztokem

BOD (0,25 U na elektrodu; 0,1M acetátový pufr, pH 6). Jako elektrolyt byly použity tyto pufrovací systémy: pro pH 3,7 – 6,0 acetátový pufr; pH 6 – 9 fosfátový pufr; pH 4,5 – 6,5 MES/NaOH; pH 6,0 – 9,0 HEPES/HCl.

Výsledky, diskuze

Cyklickou voltametrií biokatody v deaerovaném acetátovém pufru, pH 6, byly detekovány tři katodické a jeden anodický pík, které byly přiřazeny k elektrochemickým transformacím jednotlivých center následujícím způsobem: katodický pík při ~500 mV – redukce T1 centra; katodický pík při ~370 mV – redukce T3 centra; redoxní pár s půlrvnovým potenciálem ~220 mV – redukce a oxidace T2 centra [4]. Následně byly v sérii pufrů s různým pH měřeny biokatody spolu s elektrodami bez adsorbované BOD, jejichž odezva byla použita jako pozadí. Na CV korigovaných o toto pozadí byly vyhodnocovány jednotlivé píky a jejich pozice (tzn. redoxní potenciál příslušné reakce) vynášeny do grafu proti hodnotě pH.

Z obr. 1A - závislost potenciálu redukce T1 (ET1) na pH - je evidentní, že toto centrum je v kyselém prostředí redukováno prakticky nezávisle na pH, tzn. bez přispění protonů. Při pH 5 – 7 lze ale pozorovat pokles ET1 rychlostí 66 ± 3 mV pH⁻¹. Tato hodnota je velmi blízko teoretickému poklesu 59 mV pH⁻¹ odpovídajícímu elektrochemické transformaci s výměnou ekvivalentního množství elektronů a protonů. Při dalším zvýšení pH byl pozorován pokles 13 mV pH⁻¹, což svědčí opět o minimální protonové výměně při redukci T1. Z hodnot pH, při kterých došlo ke změně závislosti ET1 na pH (t.j. pH 5 a 8) lze usuzovat na vliv aminokyselin s deprotonovatelnými bočními řetězci – Glu (pKa = 4,25), Asp (pKa = 3,86) a Cys (pKa = 8,33). Je známo, že cystein je jeden z ligandů T1 Cu [4] a kyselina glutamová (Glu463) a asparagová (Asp105) jsou součástí protonového transferu nezbytného ke katalýze redukce O₂.



Obr. 1: Závislost redoxního potenciálu T1 katodického (A), T3 katodického (B), T2 anodického (C) a T2 katodického (D) procesu na pH. Zjišťováno z CV korigovaných o pozadí, skenovací rychlost 10 mV s⁻¹, v deaerovaném acetátovém (černá), fosfátovém (červená), HEPES (zelená) a aerovaném MES (modrá) pufru.

Redukce T3 probíhá zřejmě zcela bez přispění protonů, jak je patrné z grafu na obr. 1B. Zároveň byl ale pozorován poměrně zásadní vliv použitého pufru – v acetátovém byla

hodnota ET3 přibližně o 100 mV vyšší než v HEPES a MES pufru. Je nicméně známo, že nižší karboxylové kyseliny působí jako inhibitory lakázy [5].

Potenciál oxidace (ET2A; obr. 1C) a redukce (ET2C; obr. 1D) T2 centra vykazuje v téměř celém rozsahu výraznou závislost na pH, nicméně stejně jako při ET1 lze pozorovat při pH 8 zlom. To poukazuje na vliv cysteinu, v úvahu by ovšem mohl připadat pouze Cys457 (ligand T1 Cu). Je tedy evidentní, že elektrochemické vlastnosti aktivního centra jsou ovlivňovány redoxním stavem sousedících center a tedy i jejich ligandy. Uvedený zlom při pH 8 byl zjištěn při ET2A i ET2C závislosti, při redukci bylo navíc stejně jako u T1 zjištěn nulový vliv pH v kyselé oblasti. To poukazuje na rozdílnou elektrochemii enzymu v plně redukovaném a plně oxidovaném stavu.

Poděkování

Tato publikace vznikla díky podpoře v rámci operačního programu Výzkum a vývoj pro projekt: Centrum excelentnosti pro bílo-zelenou biotechnologii, ITMS 26220120054, spolufinancovaný ze zdrojů Evropského fondu regionálního rozvoje.

Literatura

- [1] Shleev S., Tkac J., Christenson A., Ruzgas T., Yaropolov A. I., Whittaker J. W., Gorton L. (2005) *Biosen. Bioelectron.*, 20, 2517
- [2] dos Santos L., Climent V., Blanford C.F., Armstrong F.A. (2010). *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12, 13962
- [3] Shleev S., Andoralov V., Falk M., Reimann C.T., Ruzgas T., Srnc M., Ryde U., Rulíšek L. (2012). *Electroanalysis*, 24, 1524
- [4] Filip J., Šefčovičová J., Gemeiner P., Tkac J. (2012). *Electrochem. Acta*, article in press, DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.09.054>
- [5] Ters T., Kuncinger T., Srebotnik E. (2009). *J. Mol. Cat. B*, 61, 261

On-line monitorovanie glycerolu počas biotechnologického procesu s využitím jednoduchého odberu vzoriek

Tkáč Ján*, Katrlík Jaroslav, Šefčovičová Jana, Gemeiner Peter

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-94976 Nitra

*Jan.Tkac@savba.sk

Kľúčové slová

Biosenzor, glyceroldehydrogenáza, ampérometrické stanovenie, glycerol, biotechnologický process

Úvod

Enzýmy sú biokatalyzátormi proteínovej (polypeptidovej) povahy, ktoré špecificky katalyzujú chemické reakcie s vysokou rýchlosťou, pričom počas reakcie nie sú spotrebúvané. Ich veľmi komplikovaná 3-D štruktúra je výsledkom skladania polypeptidového reťazca počas procesu translácie s aktívnym miestom lokalizovaným väčšinou blízko povrchu enzýmu (prístupnosť substrátu) tvoreným 5-10 aminokyselinami. Aktívne miesto je prístupné kavitou, ktorej veľkosť a povaha určuje substrátovú preferenciu a aktívne miesto určuje, aký typ reakcie je enzýmom katalyzovaný. Následkom toho sú enzýmy oveľa selektívnejšie katalyzátory v porovnaní s chemickými katalyzátormi a sú schopné katalyzovať procesy s kontrolou veľkosti, polarity, funkčných skupín prípadne stereoorientácie substrátu. Výnimkou sú niektoré enzýmy schopné využívať širokú paletu substrátov, avšak katalyzujúcich len jeden typ reakcie (napr. hydrolýzu fosfodiesterovej väzby). Najväčšou skupinou enzýmov sú oxidoreduktázy plniace v bunke hlavne úlohu v primárnom metabolizme a bioenergetike. Prakticky všetky oxidoreduktázy si vyžadujú prítomnosť kofaktorov na správnu činnosť (NADH, FAD, PQQ) a podľa toho sa delia do rôznych podskupín.^{1,2} V tejto práci je enzým glyceroldehydrogenáza využitý pri unikátnom on-line monitorovaní koncentrácie glycerolu s jednoduchým odoberaním vzoriek.

Materiály a metódy

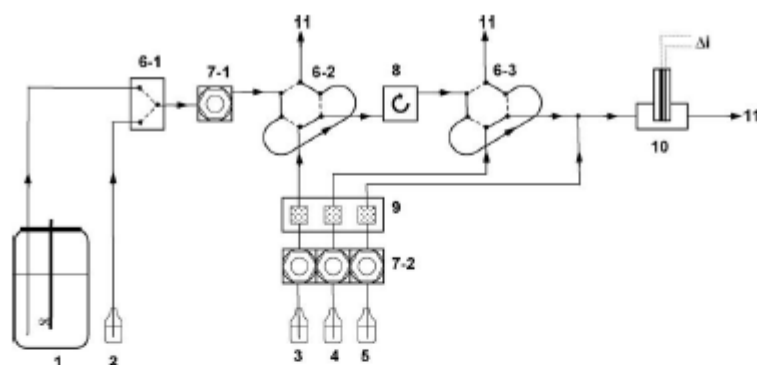
Všetky použité chemikálie ako glyceroldehydrogenáza, dialyzačná membrána a ďalšie pomocné látky boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko).

Výsledky a diskusia

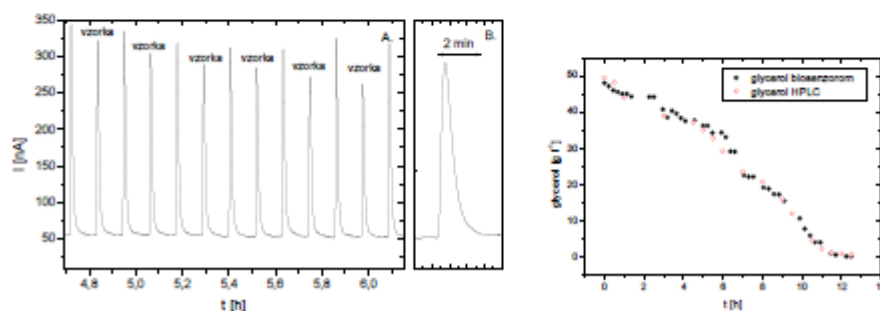
On-line monitorovanie procesu je spojené s kontinuálnym vzorkovaním z bioreaktora, čo je častokrát komplikovaný proces, pretože okrem toho, že musí byť zachovaná sterilita odberu, počas fermentácie by sa nemal meniť tok komponentov média cez vzorkovacie zariadenie (filtračná alebo dialyzačná príoba). Dialyzačná príoba nie je preferovanou voľbou kvôli zmene toku cez membránu adsorbovanými látkami z fermentačného média (bunky, prípadne proteíny), pričom s časom kultivácie je tento problém markantnejší, keďže sa zvyšuje koncentrácia buniek a proteínov v bioreaktore.

Filtračná príoba pri odbere nenarieduje vzorku jej zmiešaním s ďalším paralelným tokom mobilnej fázy, ako je tomu v prípade dialyzačnej príoby a aj preto sa častejšie využíva. Problémom je však tiež zanášanie povrchu filtračného zariadenia, čo spôsobuje nasávanie bublín, ktoré negatívne ovplyvňujú, prípadne znemožňujú analýzu vzoriek.

Keď je biosenzor pripravený s vysokou citlivosťou, je možné vzorku po odobratí z bioreaktora značne nariediť bez ovplyvnenia reprodukovateľnosti stanovenia. Takýto prístup nielen minimalizuje vplyv interferentov na analýzu, ale dokonca umožňuje pracovať aj v prítomnosti buniek. Ak je celý proces analýzy biosenzorom vedený v prietokovom systéme FIA, čas kontaktu so vzorkou obsahujúcou bunky je krátky (cca minúta) a vysoký laterálny tok neumožňuje, aby sa bunky na povrch biosenzora viazali, negatívne ovplyvňujúc jeho funkciu. Všetky tieto predpoklady boli vzaté do úvahy pri konštrukcii prvého vzorkovacieho zariadenia na on-line monitorovanie bioprocessu, ktoré sa nezanáša, keďže neobsahuje žiadnu membránu a na tento účel bola použitá hadička (Obr. 1). Na výrazné a reprodukovateľné nariadenie vzorky (500x) pred nástrekom do FIA systému bola využitá zmiešavacia komora. Výsledky on-line monitorovania glycerolu boli vo veľmi dobrej zhode s referenčnou HPLC metódou s akceptovateľnou operačnou stabilitou a rýchlosťou odozvy (Obr. 2).



Obr. 1: Experimentálne usporiadanie na on-line monitorovanie bioprocessu zjednodušeným odberom vzorky: (1) bioreaktor, (2) štandard glycerolu, (3) destilovaná voda na nariadenie vzorky, (4) tlmivý roztok s NAD⁺, (5) tlmivý roztok s mediátorom, (6-1) ventil, (6-2 a 6-3) injekčné ventily, (7-1 a 7-2) peristaltické pumpy, (8) zmiešavacia komora, (9) odvzdušňovač, (10) prietoková cela s biosenzorom a (11) odpad.



Obr. 2: Operačná stabilita glycerolového biosenzora a jeho čas odozvy pri využití na on-line monitorovanie bioprocessu (vľavo) a porovnanie on-line analýz glycerolu biosenzorom s HPLC metódou (vpravo).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Tkac J., Svitel J., Sturdik E.: *Chem. Listy* **1999**, 93, 518.
- 2 Tkac J., Svitel J., Sturdik E.: *Chem. Listy* **1999**, 93, 563.

Bioprístupnosť niklu v závislosti od fyzikálno-chemických vlastností pôdy

Tomáš Tóth, Alena Vollmannová, Dana Urminská

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, SR
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-949 76 Nitra, Slovensko*

Úvod

Zaťaženie pôd perzistentnými stopovými látkami sa stalo v posledných rokoch jedným z najvýznamnejších problémov ochrany životného prostredia. Ťažké kovy, ako jedna zo skupín stopových prvkov, majú veľký ekologický význam, daný ich ekotoxicitou a schopnosťou akumulácie. Poznanie väzieb ťažkých kovov v pôde je kľúčom k hodnoteniu ich bioprístupnosti ako aj z pohľadu hľadania možností ovplyvňovania ich mobility.

Ťažkým kovom, ktoré vyznačujú ako biogénny esenciálny prvok pre niektoré zvieratá a na niektoré rastliny pôsobí priaznivo v nepatrných koncentráciách (Scheffel, Schachtschabel, 1989) patrí nikel.

Kabata – Pendias, Pendias (1984) zaraďujú Ni spolu s Hg, Cu, Pb, Co a Cd medzi najtoxickejšie rizikové prvky pre vyššie rastliny a niektoré mikroorganizmy.

Priemerný obsah Ni v zemskej kôre sa pohybuje okolo 45 mg.kg^{-1} . V pôdach s pôdotvorným substrátom bohatým na Ni sa však môžu vyskytovať aj extrémne vysoké obsahy Ni ($100 - 7000 \text{ mg.kg}^{-1}$). Takéto pôdy obsahujú tiež nezvyčajne vysoké množstvá Cr, Mg a Fe a malé množstvá Ca a Si. Významným faktorom antropogénnej kontaminácie pôdy Ni je spaľovanie pohonných hmôt a zvyškov olejov, spaľovanie uhlia, ťažba a spracovanie nikelnatých rúd.

Symptómy toxicity sa v rastlinách objavujú obvykle pri prekročení koncentrácie 50 mg Ni.kg^{-1} sušiny v tkanivách vegetatívnych častí (Adriano, 1986).

Mechanizmus fytoxicity niklu nie je dostatočne objasnený. Pri nadbytku tohto kovu sa prejaví u rastlín zníženie rastu, prípadne dlhodobé poškodenie rastlinných tkanív. Vysoký obsah Ni spôsobuje chlorózu, zabránenie rastu koreňa, brzdenie metabolizmu v rastlinách, obmedzenie absorpcie niektorých iných prvkov a brzdenie fyziologických procesov. Cataldo a kol. (1978) predpokladajú, že správanie sa niklu v rastlinách môže byť regulované utilizačnými mechanizmami pre ióny živín podobne ako u Cu^{2+} a Zn^{2+} .

Materiál a metóda

Cieľom tejto práce je v modelových podmienkach získať poznatky o sorpcii niklu monitorovanými pôdnymi typmi a formulovať závislosť medzi mierou sorpcie niklu a pôdnymi parametrami.

Odberové miesta pôdných vzoriek :

1. ČAc – Dolný Štál (čiernice karbonátové)
2. ČMc – Trnovec nad Váhom (černozem karbonátová)
3. RM – Veľké Leváre (regozem)
4. LMg – Tomašovce (luvizem pseudoglejová)
5. KMm – Chvojníca (kambizeme)
6. PGi – Čičarovce (pseudogleje luvizemné)
7. FMc – Imeľ (fluvizeme karbonátové)

Vzorky boli odobraté z troch hĺbok 0,0 – 0,1m; 0,2 – 0,3 m; 0,35 – 0,45 m v súlade s metodikou pre Čiastkový monitoring pôd Slovenska (Linkeš, 1995)

Pre celkovú východiskovú charakteristiku použitých pôd boli určené niektoré parametre pôdných vlastností a stanovený totálny obsah Ni, obsah Ni vo výluhu 2M HNO_3 , vo výluhu 0,05M EDTA a 0,01M CaCl_2 .

V simulovaných prírodných podmienkach premyvného režimu pôd bola sledovaná translokácia jednotlivých frakcií chrómu. Rozoberateľné kolóny z PVC boli naplnené 0,5 kg pôdy a po predbežnom navlhčení použitej pôdy na maximálnu vodnú kapacitu premývané roztokom, ktorý obsahoval 70 mg niklu (čo je dvojnásobná dávka referenčnej limitnej hodnoty A pre Ni). Nikel sa vo vodnom prostredí nachádzal vo forme rozpustných solí, a to $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Mobilný resp. mobilizovateľný (potenciálne aj aktuálne) obsah Ni z prvých troch častí kolón (výška vrstvy 0,05 m o priemere 0,05m) boli extrahované 2M HNO_3 , 0,01M CaCl_2 a 0,05M EDTA po dvojhodinovej kinetickej extrakcii za studena a následne stanovené metódou AAS (tab).

Výsledky a diskusia

Celkový obsah Ni v použitých pôdach sa pohyboval v rozmedzí 8,2 – 45,8 mg Ni.kg^{-1} pôdy. Z toho potenciálne mobilizovateľné formy Ni (výluh v 2M HNO_3) predstavovali približne 10-35%, aktuálne mobilizovateľné (výluh v 0,5M EDTA) 5-10% a mobilné (výluh v 0,01M CaCl_2) 0,5- 1% z celkového množstva.

Extrahovateľnosť zvýšeného obsahu Ni po simulovaní prírodných podmienok premyvného režimu v jednotlivých extrahovadlách vykazovala značné rozdiely v závislosti od typu testovanej pôdy. Obsah niklu vo výluhu 2M HNO_3 v uvedených pôdnych typoch klesal v poradí $\text{RM} > \text{FMc} > \text{KMm} > \text{LMg} > \text{ČMc} > \text{PGL} > \text{ČAc}$. Obsah niklu v eluátoch 0,05M EDTA a 0,01M CaCl_2 klesal v analogickom poradí ako vo výluhu 2M HNO_3 .

Záver

Z výsledkov vyplýva, že extrahovateľnosť niklu je ovplyvnená fyzikálno-chemickými vlastnosťami pôd. A to hlavne pôdnou reakciou, obsahom a kvalitou humusu. Získanými výsledkami sa potvrdil aj predpoklad nízkej mobility niklu v pôdnom profile. Z uvedeného vyplýva, že ako najrizikovejšie pre rastlinnú produkciu sa javia pôdy kyslé, s nízkym obsahom humusu ako aj nízkym obsahom humínových kyselín a vysokým obsahom fulvokyselín.

Tab.1. Obsah Ni vo výluhoch (%)

Pôda	Sonda	2M HNO_3			0,05M EDTA			0,01M CaCl_2		
		I.	II.	III.	I.	II.	III.	I.	II.	III.
RM	0-10	100	0,13	0,00	81,31	0,16	0,30	56,90	0,01	0,01
	20-30	90,87	0,00	0,00	87,33	0,05	0,23	53,04	0,04	0,05
	35-45	90,86	0,07	0,21	85,73	0,10	0,23	46,20	0,05	0,06
ČMc	0-10	2,50	0,17	0,08	1,16	0,06	0,03	0,02	0,01	0,00
	20-30	4,90	0,05	0,01	1,88	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01
	35-45	48,22	0,04	0,05	18,40	0,00	0,01	0,34	0,03	0,02
FMc	0-10	57,26	0,25	0,02	22,39	0,00	0,01	0,98	0,01	0,01
	20-30	48,88	1,42	0,10	17,74	0,69	0,18	1,73	0,07	0,04
	35-45	46,91	0,01	0,01	19,22	0,02	0,15	1,54	0,06	0,05
PGL	0-10	1,28	0,17	0,09	3,10	0,29	0,35	0,07	0,09	0,08
	20-30	2,09	0,19	0,14	4,96	0,27	0,17	0,12	0,10	0,09
	35-45	2,50	0,24	0,26	7,42	0,42	0,51	0,15	0,17	0,14
LMg	0-10	19,65	6,05	4,39	18,19	5,55	3,88	2,54	0,94	0,40
	20-30	16,41	11,59	12,69	15,20	10,82	11,64	4,01	2,56	3,61
	35-45	10,29	1,38	0,21	9,41	0,87	0,15	5,21	0,35	0,08
ČAc	0-10	0,06	0,03	0,04	0,00	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00
	20-30	2,28	0,11	0,01	1,06	0,07	0,00	0,01	0,00	0,00
	35-45	2,12	0,01	0,00	0,73	0,04	0,11	0,02	0,00	0,00
KMm	0-10	27,29	0,05	0,04	25,55	0,04	0,01	7,85	0,00	0,00
	20-30	40,49	0,00	0,00	32,86	0,00	0,03	14,23	0,00	0,00
	35-45	55,58	0,24	0,02	36,94	0,01	0,01	12,13	0,00	0,00

(100% - najvyššie vylúhovateľné množstvo)

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Adriano, D.C. 1986. Trace elements in the terrestrial environment. New York : Springer Verlag, 1986. 516 s., ISBN 0-387-96158-5
2. Cataldo, D.A. – Gerland, T.R. – Wildurg, R.E. 1978. Plant Physiology, 62. P. 566-570
3. Kabata-Pendias, A. – Pendias, H. 1984. Trace elements in soil and plants. London: CRC Press, 1984
4. Linkeš, V. 1995. Monitoring pôd SR, ČMPS, VÚPÚ Bratislava, 1995, 128 s.

Kontaktná adresa : Tomáš Tóth, Katedra chémie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU, 949 01 Nitra, e-mail: Tomas.Toth@uniag.sk

Zhodnotenie obsahu ťažkých kovov na vybraných pôdných typoch a pestovaných plodinách v Podtatranskej oblasti

Tomáš Tóth, Dana Urminská, Juraj Miššik

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, SR
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-949 76 Nitra, Slovensko*

Abstrakt

Ťažké kovy sú dôležité z niekoľkých dôvodov : mnohé sa používajú priemyselne v technologicky vyspelých krajinách, niektoré sú fyziologicky dôležité pre rastliny a zvieratá, mnohé sú významné ako polutanty ekosystému po celom svete. Významný podiel na znížení hygienickej kvality pôdy majú agrochemikálie. Ich intenzívna aplikácia agrochemikálií do pôd má za následok zvýšenie kyslosti pôd a zvýšený výskyt toxických látok. Sledovanie rizikových prvkov v pôdach a pestovaných poľnohospodárskych plodinách sa uskutočnilo na parcelách PD Štrba v okrese Poprad, ktoré leží v nadmorskej výške 850 m. n. m. na úpätí Vysokých a Nízkyh Tatier. Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že stav pôdnej hygieny v tomto regióne je značne ovplyvnený činnosťou chemického podniku Chemosvit, ktorý je výrazným producentom rizikových látok, čo sa prejavuje na stave pôdnej hygieny, ako aj kvalite dopestovaných rastlinných produktov.

Z hodnotenia obsahu sledovaných ťažkých kovov (Cd, Co, a Ni) v pôdach vyplýva, že najmä obsah kadmia a niklu v tomto regióne je dôležitým kontaminačným faktorom pôdy. Zvýšenú pozornosť treba venovať aj kobaltu, ktorého obsah poukazuje na jeho zvýšenú kumuláciu v pôde.

Úvod

Priemerné obsahy ťažkých kovov v pôdach Slovenska získané analýzou súboru pôdných sond signalizujú, že pôdy boli vystavené záťaži ťažkými kovmi a inými znečisťujúcimi látkami. Negatívne dôsledky zvýšeného prísunu škodlivých látok sa výrazne prejavujú na znížení priemerného dožitého veku, ktorý je zvlášť u mužov jedným z najnižších v Európe, zvýšení frekvencie kardiovaskulárnych, nádorových a alergických ochorení.

Ťažké kovy sú dôležité z niekoľkých dôvodov : mnohé sa používajú priemyselne v technologicky vyspelých krajinách, niektoré sú fyziologicky dôležité pre rastliny a zvieratá - a tak majú priamu súvislosť s ľudským zdravím a poľnohospodárskou produkciou - a mnohé sú významné ako polutanty ekosystému po celom svete (Đurža, 1998). Významný podiel na znížení hygienickej kvality pôdy majú agrochemikálie. Ich intenzívna aplikácia agrochemikálií do pôd má za následok zvýšenie kyslosti pôd a zvýšený výskyt toxických látok (Uher, 1995; Filip, Bielek, 1996; Gábriš, 1997).

Dynamika ťažkých kovov v systéme pôda – rastlina je ovplyvnená mnohými faktormi, ako sú : zdroje kontaminácie, druh pestovaných plodín a ich kultivary, vek rastlín, vyplavovanie zrážkami, erózia a výpar. O množstve ťažkého kovu prijatého koreňom vo všeobecnosti rozhoduje obsah prvku v pôdnom roztoku, prísun pôdneho roztoku ku koreňovému systému a v neposlednom rade afinita koreňového systému vzhľadom k príjmu daného prvku.

Materiál a metódy

Sledovanie rizikových prvkov v pôdach a pestovaných poľnohospodárskych plodinách sa uskutočnilo na parcelách PD Štrba v okrese Poprad, ktoré leží v nadmorskej výške 850 m. n. m. na úpätí Vysokých a Nízkyh Tatier.

Z pokusných miest sme odobrali vzorky pôdy raz ročne (na jar), pedologickou sondou, a to z troch hĺbok : 0 – 0,10 m, 0,20 – 0,30 m a 0,35 – 0,45 m, podľa metodiky pre „Monitoring pôd SR“ (Linkeš, 1997). Priemerná odberová plocha pre plošný prieskum kontaminácie pôd v rámci poľnohospodárskeho podniku je približne 10 ha. V pôdach sme sledovali ťažké kovy : Co, Cd, Ni. Analýzy sme vykonali vo vzorkách pôdy, ktoré boli vytriedené na jemnozeme I (priemer 2 mm) a z tejto jemnozeme bola obobraná vzorka zeminy a preosiata cez sito s priemerom 0,2 mm (jemnozeme II). Obsahy ťažkých kovov sme sledovali v nasledujúcich výluhoch :

Celkový obsah - je jedným z hlavných kritérií posudzovania limitných hodnôt obsahov rizikových prvkov v pôde. Zahrňuje všetky formy, v ktorých sa určitý prvok v pôde vyskytuje.

Potenciálne mobilizovateľné formy – zahrňuje rôzne frakcie prvkov z hľadiska ich rozpustnosti. Vzorky rastlinného materiálu sme odobrali v plnej zrelosti a analyzovali nadzemnú biomasu, a to u obilnín zrno a slamu, u olejnín semeno a slamu a v prípade krmovín nadzemnú biomasu, odobratú pred prvou, druhou a treťou kosbou. V rastlinných vzorkách sme stanovili obsah sledovaných ťažkých kovov (Cd, Co, Ni) po predchádzajúcej mineralizácii suchou cestou plameňovou AAS. Pestované plodiny na sledovaných honoch sú uvedené v tabuľke 1.

Tab. 1. Pestované plodiny na sledovaných honoch

stanovište	Plodina
1	Jačmeň siaty jarný
2	Pšenica ozimná
3	Triticale
4	Ďatelina siata
5	TTP
6	Zemiaky

Výsledky a diskusia

Obsahy sledovaných ťažkých kovov v pôde poukazujú na zvýšenú ekologickú záťaž týchto pôd a z hľadiska hodnotenia pôdnej hygieny je im potrebné venovať zvýšenú pozornosť. Namerané hodnoty sme porovnávali s limitnými hodnotami pre celkový obsah prvku v pôde (hodnota A) a s limitnou hodnotou A1, ktorá je stanovená pre obsah potencióálne mobilizovateľných foriem ťažkých kovov vo výluhu 2M HNO₃ (Rozhodnutie MP SR č. 531/1994 – 100).

Najvyššia hraničná hodnota A pre kobalt je 20 mg.kg⁻¹. Na záujmových stanovištiach bola táto hodnota prekročená na stanovištiach 2, 4, 5 a 6 a to v priemere o 29,75 %. Na ostatných stanovištiach sme nenamerali hodnoty prekračujúce limitnú hodnotu A. Pre obsah kobaltu v pôde vo výluhu 2M HNO₃ (A1) nie je stanovená legislatívna hodnota.

Celkový obsah niklu v pôde bol vyšší ako je hodnota A (35 mg.kg⁻¹) na stanovištiach 2, 3, 4 a 5. Prekročenie bolo v priemere o 46 %. Obsah niklu stanovený vo výluhu 2M HNO₃, pre ktorý je stanovený najvyšší povolený obsah (A1) 10 mg.kg⁻¹ bol prekročený na stanovišti 5 o 34,46 %. Na ostatných stanovištiach bol obsah Ni pod limitnou hodnotou. Namerané obsahy ťažkých kovov v pôde sú uvedené v tabuľke 2.

Tab. 2 : Obsah sledovaných ťažkých kovov v pôde v mg.kg^{-1}

Stanovište	Hĺbka odberu (m)	Cd		Co		Ni	
		Celkový obsah	2M HNO_3	Celkový obsah	2M HNO_3	Celkový obsah	2M HNO_3
1	0 – 0,10	1,36	0,304	15,6	4,72	22,8	2,28
	0,2 – 0,3	1,64	0,264	12,8	4,18	23,6	2,12
	0,3 – 0,45	1,84	0,154	5,2	2,74	20,3	1,38
	Priemer	1,61	0,241	11,2	3,88	22,2	1,92
2	0 – 0,10	1,08	0,138	32,0	3,70	49,6	3,32
	0,2 – 0,3	1,44	0,252	24,4	5,90	48,0	5,60
	0,3 – 0,45	1,88	0,260	20,8	5,82	50,8	5,98
	Priemer	1,47	0,217	25,7	5,14	49,4	4,96
3	0 – 0,10	1,44	0,288	16,8	3,74	41,6	7,58
	0,2 – 0,3	1,88	0,244	14,4	2,94	45,2	5,24
	0,3 – 0,45	2,20	0,220	10,0	2,68	58,0	7,80
	Priemer	1,84	0,251	13,7	3,12	48,2	6,87
4	0 – 0,10	1,28	0,240	28,8	4,54	38,8	5,02
	0,2 – 0,3	1,84	0,248	22,8	4,68	40,0	5,10
	0,3 – 0,45	1,84	0,292	14,4	5,14	44,4	6,56
	Priemer	1,65	0,260	22,0	4,78	41,1	5,56
5	0 – 0,10	1,48	0,228	29,2	6,52	62,0	14,78
	0,2 – 0,3	1,76	0,204	29,6	4,98	69,6	13,24
	0,3 – 0,45	2,12	0,174	26,4	4,30	66,0	12,38
	Priemer	1,78	0,202	28,4	5,26	65,8	13,46
6	0 – 0,10	1,36	0,286	34,8	5,60	32,4	3,68
	0,2 – 0,3	1,44	0,248	27,6	4,16	30,0	2,98
	0,3 – 0,4	2,04	0,116	20,8	2,18	27,2	1,76
	Priemer	1,61	0,216	27,7	3,98	29,8	2,80

U ostatných plodín sme odobrali nadzemnú biomasu a analyzovali ťažké kovy zvlášť v slame a zvlášť v zrne, resp. semene pestovaných rastlín. U zemiakov sme hodnotili obsah sledovaných ťažkých kovov v nadzemnej biomase. Namerané obsahy ťažkých kovov sú uvedené v tabuľke č. 3, kde sme uviedli aj najvyššie prípustné množstvá sledovaných prvkov, ktoré sú determinované legislatívou – Vestník MP SR č. 1497/1997-100 o krmných surovinách a o hospodárskych krmivách, Vestník MZ 981/1996 – 100 Potravinový kódex SR. Na základe porovnania najvyšších prípustných množstiev v jednotlivých komoditách s nameranými obsahmi Cd, Co a Ni v rastlinách možno konštatovať, že obsah kadmia v nadzemnej biomase d'ateliny neprekročil legislatívne stanovené obsahy a obsah kadmia bol na úrovni 80,4 % z NPM. Analýza biomasy TTP poukazuje na zvýšený obsah kadmia v tejto krmovine, v porovnaní s NPM sme namerali prekročenie o 63 %. U pestovaných obilnín (pšenica, jačmeň, triticales) bol obsah kadmia v zrne prekročený vo všetkých vzorkách. V porovnaní s NPM Cd v zrne ($0,07 \text{ mg.kg}^{-1}$) sme u jačmeňa namerali 131 % prekročenie NPM. V zrne pšenice bolo prekročenie tejto hodnoty o 70 % a u triticales až o 300 %. V prípade hodnotenia obsahu kobaltu v rastlinných vzorkách treba konštatovať, že pre obsah kobaltu nie je stanovená hranica najvyššieho prípustného množstva pre požívatinu. U krmovín

to je $2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$, táto hranica však nebola prekročená ani v d'ateline, ani v TTP. Stanovením obsahu niklu v zrne obilnín vyplýva jeho veľmi nízke zastúpenie, a to 7 % u jačmeňa a pšenice a 14 % u triticales z najvyššieho prístupného množstva ($3,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) pre tento prvok v cereáliách. Obsah niklu v krmovinách (d'atelina a TTP) dosiahol 53,8 % z NPM ($5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$). Zvláštnu pozornosť treba venovať pestovaným zemiakom v tomto regióne, nakoľko obsah kadmia aj niklu v nadzemnej biomase vykazuje veľmi vysokú kumuláciu.

Tab. 3. Obsah ťažkých kovov v pestovaných plodinách a porovnanie s najvyššími prístupnými množstvami (NPM) v mg.kg^{-1} .

ST	Plodina	Cd	NPM	Co	NPM	Ni	NPM
1	Jačmeň – slama	0,463	-	0,323	-	0,646	-
	Jačmeň – zrno	0,162	0,07	0,108	-	0,215	3,0
2	Pšenica – slama	0,506	-	0,216	-	0,323	-
	Pšenica – zrno	0,119	0,07	0,001	-	0,215	3,0
3	Triticale – slama	0,927	-	0,431	-	0,646	-
	Triticale – zrno	0,280	0,07	0,431	-	0,431	3,0
4	Ďatelina – 1.kosba	0,916	1,0	1,293	2,0	1,724	5,0
	Ďatelina – 2.kosba	0,711	1,0	0,969	2,0	3,125	5,0
	Ďatelina – 3.kosba	0,785	1,0	0,647	2,0	3,232	5,0
5	TTP	1,638	1,0	0,647	2,0	2,047	5,0
6	Zemiaky	1,875	0,05	1,939	-	4,31	0,5

Záver

Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že stav pôdnej hygieny v tomto regióne je značne ovplyvnený činnosťou chemického podniku Chemosvit, ktorý je výrazným producentom rizikových látok, čo sa prejavuje na stave pôdnej hygieny, ako aj kvalite dopestovaných rastlinných produktov.

Z hodnotenia obsahu sledovaných ťažkých kovov (Cd, Co, a Ni) v pôdach vyplýva, že najmä obsah kadmia a niklu v tomto regióne je dôležitým kontaminačným faktorom pôdy. Zvýšenú pozornosť treba venovať aj kobaltu, ktorého obsah poukazuje na jeho zvýšenú kumuláciu v pôde.

Na základe hodnotenia obsahov ťažkých kovov v rastlinnom materiáli vyplýva, že zvýšený obsah ťažkých kovov v pôde indikoval aj zvýšené obsahy ťažkých kovov v rastlinných komoditách. Najmä u pestovaných obilnín bol nameraný zvýšený obsah kadmia v zrne pšenice, jačmeňa a triticales, ale aj TTP. U pestovanej d'ateliny sa zvýšená kumulácia a prekročenie najvyšších prípustných množstiev nepreukázalo. Zvláštnu pozornosť treba venovať pestovaným zemiakom v tomto regióne.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Použitá literatúra

1. BIELEK, P. 1996. Ochrana pôdy v environmentálnej a regionálnej politike u nás a v štátoch EÚ. In: Zborník referátov z vedeckej konferencie „Ochrana pôdy – výživa pre budúcnosť“. Nízke Tatry – Tále 6.-8.11.1996. VÚPÚ Bratislava, s.53-64

2. DOMAŽLICKÁ, E. 1992. Tolerancia rastlín k ťažkým kovom. Úroda, č.11, 1992, s.525
3. FILIPINSKIJ, M. 1989. Pflanzenaufnahme und Losbarkeit von Schwermetallen aus Boden hoher Anreicherung und zusätzlicher Belastung. (Diss.) Georg – August Universität, Göttingen, 1989
4. KABATA-PENDIAS, A. – PENDIAS, H. 1992. Trace Elements in Soil and Plants. 2. vydanie. London. CRC Press, 1992, s.365
5. MAKOVNÍKOVÁ, J. 1998. Distribúcia kadmia, olova, medi a zinku v hlavných pôdnych predstaviteľoch Slovenska a jej hodnotenie so zreteľom na potenciály a bariéry transportu kovov do rastlín. Doktorandská dizertačná práca. VÚPÚ Bratislava. 1998
6. MOOLENAAR, S.W. – LEXMOND, T.M. 1998. Heavy metal of agro-ecosystems in The Netherlands. In: Neth. Journal of Agricultural Science. No. 46, 1998, s.171-192

Kontaktná adresa : Tomáš Tóth, Katedra chémie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU, 949 01 Nitra, e-mail: Tomas.Toth@uniag.sk

On-line dezintegrácia fermentačných vzoriek na analýzu rekombinantného proteínu

Tkáč Ján*, Jozef Nahálka

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-94976 Nitra

[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)

Kľúčové slová

Biosenzor, protilátky, povrchová plazmónová rezonancia (SPR), DnaK rekombinantný biotechnologický proces

Úvod

Jedným z najčastejšie využívaných prevodníkov pri charakterizácii biorozpoznávania je technika SPR (z anglického Surface Plasmon Resonance). Je to veľmi účinný analytický nástroj poskytujúci meranie interakcie väzbových partnerov v reálnom čase, čo umožňuje získať kinetické parameter (asociačnú a disociačnú konštantu) a tým aj afinitnú konštantu interakcie.¹ Okrem toho táto technika umožňuje merať v tzv. „label-free“ formáte bez nutnosti značenia (fluorescenčne prípadne enzýmovo) jedného z väzbových partnerov za účelom detekcie tejto interakcie². Táto technika meria skutočne interakciu oboch väzbových partnerov neovplyvnenú negatívnym značením jedného z nich. Pri meraní sa vyhodnocuje zmena v indexe lomu v blízkosti vodivého povrchu (do 100 nm) ako následok interakcie a táto zmena je priamo úmerná zmene koncentrácie analytu v roztoku prípadne zmene množstva analytu na povrchu po jeho viazaní. Táto technika bola úspešne použitá pri optimalizácii procesu imobilizácie biorozpoznávacích elementov ako aj pri optimalizácii jednotlivých krokov modifikácie a aktivácie povrchu v procese imobilizácie.

Produkcia rekombinantných proteínov tvorí v súčasnosti značný podiel na trhu rozličných biotechnologických a farmaceutických firiem. Aj keď je to už veľmi dobre zvládnutá technológia, je veľmi potrebné pochopiť procesy vedúce k produkcii rekombinantných proteínov za účelom vyššej efektivity ich prípravy. Na tento účel bola využitá technika SPR s imobilizovanými protilátkami voči rekombinantnému rhSOD proteínu (využívaný na terapeutické účely)³ s on-line dezintegračným procesom odoberania vzoriek počas biotechnologického procesu.

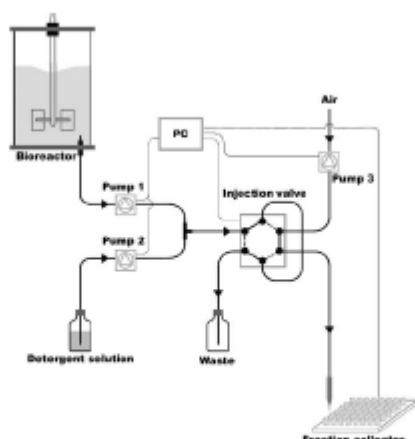
Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie ako protilátky, blokovacie látky a ďalšie pomocné látky v procese imobilizácie a celkového merania boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Optické merania technikou SPR sa uskutočnili na prístroji Biacore (Švédsko).

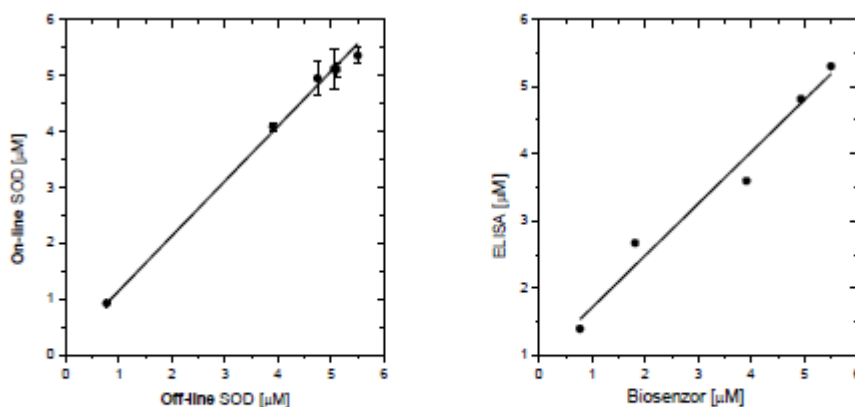
Výsledky a diskusia

Tento spôsob on-line dezintegrácie umožňoval plne automatické odoberanie vzorky, dezintegráciu vzorky a jej uloženie na mikrotitračnú platničku (Obr. 1). Jedinou ručnou operáciou bolo prenesenie platničky do miestnosti s SPR prístrojom. Tu je dôležité podotknúť, že teoreticky bolo možné predpripravenú vzorku z fermentora ukladať na mikrotitračnú platničku uloženú priamo v SPR prístroji, prakticky však kvôli bezpečnostným pravidlám to nebolo možné. Rekombinantné kmene sa považujú za kategóriu dva („safety level 2“) mikrobiologickej bezpečnosti a je preto možné s nimi pracovať len v na to určených laboratóriách. V princípe tento systém je možné využiť na plne automatické sledovanie

koncentrácie intracelulárneho proteínu počas celého bioprocesu. To by v budúcnosti malo viesť k plne automatickým on-line analyzátorom, schopným napomôcť nielen monitorovaniu, ale i riadeniu bioprocsov. On-line dezintegrácia buniek bola validovaná voči off-line manuálnej dezintegrácii tých istých vzoriek s veľmi dobrou zhodou (smernica 0,98, $R^2=0,999$) (Obr. 2). Výsledná analýza rekombinantného proteínu on-line vzorkovaním a on-line dezintegráciou s at-line SPR meraním bola validovaná s referenčnou ELISA metódou. Výsledok porovnania ukazuje na veľmi dobrú koreláciu ($R^2=0,963$), SPR metódou však bolo namerané väčšie množstvo analytu ako ELISA metódou, na čo poukazuje smernica 0.77 ± 0.08 . Celkovo však meranie ELISA metódou bolo zaťažené oveľa väčšou chybou (priemerná RSD 16,2%) v porovnaní s SPR meraním (priemerná RSD 3,0%), čo sa mohlo odraziť na nižšej korelácii týchto dvoch metód (Obr. 2).



Obr. 1: Konfigurácia pre on-line vzorkovací a dezintegračný protokol.



Obr. 2: Validácia on-line dezintegrácie buniek porovnaním s off-line dezintegráciou buniek vyjadrenou ako množstvo uvoľneného intracelulárneho rekombinantného rhSOD proteínu (vľavo) a validácia at-line analýzy rhSOD proteínu (s on-line vzorkovaním a dezintegráciou) porovnaním s referenčnou ELISA metódou (off-line dezintegrácia buniek) (vpravo).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1 Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B., Johnsson B., Karlsson R., Lundh K. a kol., *Biotechniques* **1991**, 11, 620. Malmqvist M., *Nature* **1993**, 361, 186.

- 2 Homola J., *Chem. Rev.* **2008**, 108, 462. Cooper M.A., *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, 1, 515.
Rich R.L., Myszka D.G., *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 54.
- 3 Ertl P., Unterladstaetter U., Bayer K., Mikkelsen S.R., *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4949.

Elektrochemická charakteristika enzymu bilirubin oxidáza adsorbovaného na nanostрукturovaném elektrodovém rozhraní

Jaroslav Filip, Ján Tkáč*

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-94976 Nitra

[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)

Klíčová slova

bilirubin oxidáza, redukce kyslíku, aktivní centra

Úvod

Bilirubin oxidáza (BOD) patří mezi oxidoreduktázy disponující třemi aktivními centry tvořenými atomy mědi. Tzv. T1 aktivní místo (1 Cu atom) je zodpovědné za vázání substrátu a jeho oxidaci, zatímco na tzv. T2 (1 Cu atom) a T3 (2 Cu atomy) aktivních místech dochází k navázání molekuly O₂ a její redukce na vodu pomocí elektronů uvolněných při oxidaci substrátu, resp. přenesených z povrchu elektrody na T1, přičemž mechanismus redukce doposud není zcela objasněn. Díky schopnosti přímého elektronového transferu (DET) mezi aktivními centry enzymu a pevným povrchem elektrody a díky efektivní redukci kyslíku při vysokém potenciálu je BOD často využívána jako katodický biokatalyzátor při konstrukci biopalivových článků [1,2,3].

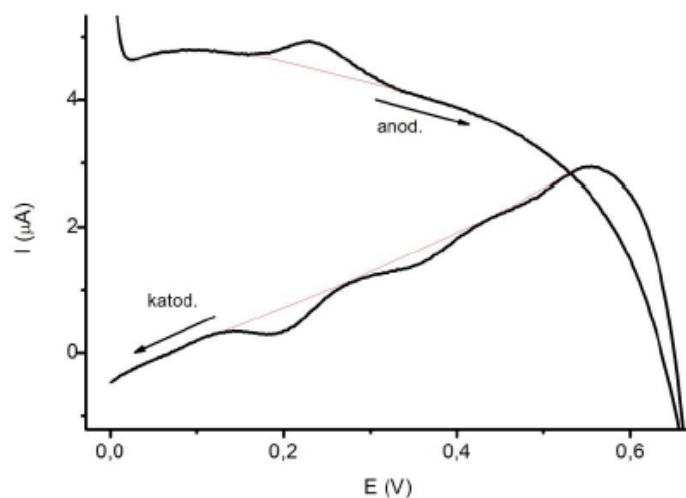
Pro konstrukci efektivních biokatod je nutné spřesnit poznatky o mechanismu redukce kyslíku na aktivních centrech BOD, čímž se zabývá několik podrobných studií kombinujících převážně elektrochemické a spektroskopické metody, z prvně jmenovaných typicky cyklickou voltametrii (CV) [4,5]. Pomocí CV lze detekovat změny redoxních stavů (tedy oxidaci nebo redukci) analytů, resp. jednotlivých aktivních center. V naší předchozí studii [6] byla BOD adsorbována na nanostрукturované elektrodové rozhraní takovým způsobem, že v rámci jednoho CV skenu lze detekovat tři samostatné redoxní procesy, lze tedy předpokládat, že všechna aktivní centra jsou schopna přímého elektronového transferu. V této práci je sledován vliv měnících se parametrů (skenovací rychlost, velikost horního potenciálu) CV na elektrochemickou transformaci jednotlivých aktivních míst imobilizované BOD, což vypovídá o kinetice přenosu náboje nejen mezi elektrodou a enzymem, ale - díky možnosti detekovat separátně všechna aktivní centra - i mezi těmito jednotlivými Cu atomy.

Materiál a metody

Uhlíkové nanotrubičky ($d = 1.1 \text{ nm}$, $l = 0.5\text{--}100 \text{ }\mu\text{m}$, čistota $> 90\%$), BOD (izolováno z *Myrothecium verrucaria*), chitosan (CHI, MW = 50-190 kDa) – Sigma Aldrich; St. Louis, USA. KetjenBlack EC 600-JD (Akzo Nobel Polymer Chemicals B.V., Amersfoort, Nizozemsko) darováno firmou Biesterfeld Silcom s.r.o. (Praha, Česká republika). Ostatní chemikálie čistoty p.a. Modifikované uhlíkové elektrody (GCE; BAS) byly charakterizovány na potenciostatu PGSTAT 128N (Ecochemie, Utrecht, Nizozemsko) s tříelektrodovým uspořádáním (Ag/AgCl referenční, disková platinová jako pomocná a modifikovaná uhlíková jako pracovní elektroda). BOD biokatody byly připraveny podle protokolu publikovaného v [6]: na povrch přečištěné GCE bylo deponováno 5 μl disperze KB (4,3 mg ml⁻¹) a CNT (0,67 mg ml⁻¹) dispergovaných v chitosanu (0,1% v 0,3% kyselině octové), ta byla nechána zaschnout a takto připravená elektroda byla po opláchnutí v pufru inkubována 8 h s roztokem BOD (0,25 U na elektrodu; 0,1M acetátový pufr, pH 6). Jako elektrolyt byl použit rovněž 0,1M acetátový pufr, pH 6, deaerovaný pomocí N₂, případně probubláván vzduchem.

Výsledky, diskuze

Na obr. 1 je zobrazen voltamogram biokatody s BOD naměřený v nepřítomnosti a korigovaný o pozadí. V katodické části jsou zřetelné tři píky, jejichž přiřazení k jednotlivým aktivním centrům bylo diskutováno v předchozí studii [6]. Redukce při nejvyšším potenciálu (493 mV) je připisována T1 centru, v souhlasu s údaji uváděnými v literatuře. Redoxní proces při potenciálu 374 mV je pak podle údajů v literatuře možné přiřadit T3, přičemž oba píky jsou detekovatelné nejen v nepřítomnosti kyslíku, ale i na CV v aerovaném elektrolytu. Tím je dále prokázáno, že obě centra jsou schopna přímé elektronové komunikace s elektrodou. Katodický pík při 203 mV má anodický protipík při 239 mV a tento proces může být připisán elektrochemické transformaci buď T2 centra, elektrochemicky aktivních bočních řetězců některých aminokyselin (Tyr), případně kombinaci obou [6].

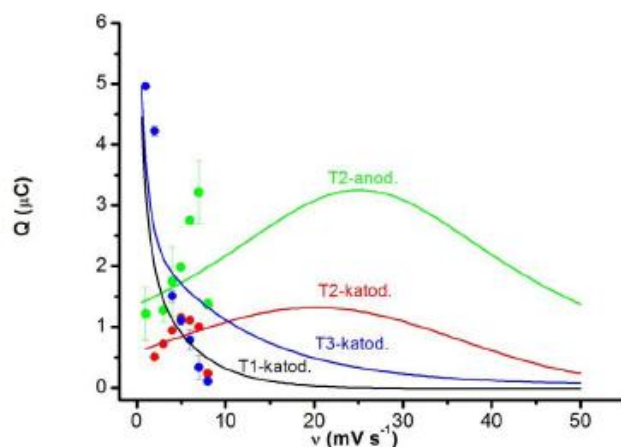


Obr. 1: anodické a katodické části CV sestavené biokatody korigované o pozadí zjištěné v deaerovaném 100 mM acetátovém pufru pH 6,0 s vyznačenými anodickými a katodickými píky.

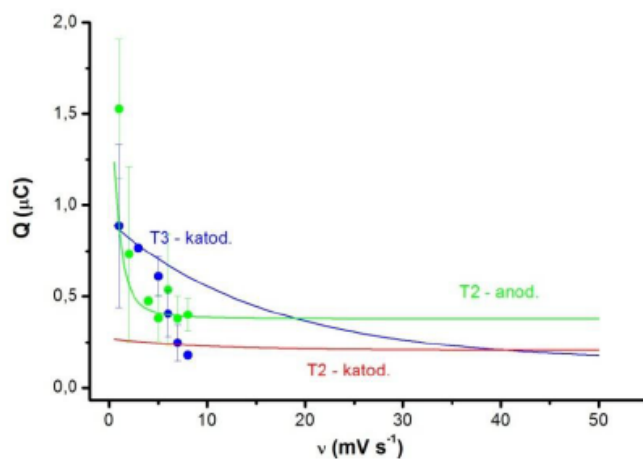
Sledováním změny prošlého elektrického náboje pro konkrétní elektrochemický proces (tedy integrovaná plocha CV píku) se změnou rychlosti CV skenování lze usoudit na povahu limitu přenosu náboje (reakční rychlost enzymu nebo limitace difuzí látky, resp. substrátu). V našem případě byly testovány biokatody pomocí CV se skenovací rychlostí 0,5 - 50 mV s⁻¹. Na obr. 2 je vidět závislost prošlého náboje pro katodické procesy T1, T2 a T3 a anodický T1 proces. Z uvedené závislosti je patrná odlišná povaha centra T2 na jedné a T1 a T3 na druhé straně. Prvně jmenované vykazují maximální elektrický náboj prošlý (jak pro anodický, tak katodický proces) při skenovací rychlosti 25 mV s⁻¹. Při této hodnotě již T1 a T3 prakticky nevykazují závislost Q na skenovací rychlosti, což naznačuje jinou povahu limitace přestupu náboje pro T1 a T3 redukci oproti T2, kde lze předpokládat, že rozdíl by mohl být způsoben zprostředkovanou výměnou elektronů mezi T2 a elektrodou s tyrosinovými rezidui jako mediátory. Maximum při skenovací rychlosti 25 mV s⁻¹ pak může být důsledek změny elektronové výměny; po dosažení rychlostního limitu T1 a T3 centra začne čím dál tím víc elektronů proudit efektivnější cestou, čímž je umožněno další zvyšování QT2 s rostoucí skenovací rychlostí.

Velmi rozdílnou elektrochemii u stejným způsobem nasorbované BOD lze sledovat při aplikaci sníženého rozsahu potenciálu (0 - 420 mV), kdy horní hodnota byla nižší než zjištěný redoxní potenciál pro T1, měli bychom tedy detekovat pouze elektrochemii T2 a T3 center. Z grafu závislosti elektrického náboje jednotlivých redoxních procesů na skenovací rychlosti (obr. 2) je vidět, že efektivita elektrochemické transformace T2 centra není téměř závislá na skenovací rychlosti, z čehož lze odvodit, že oxidace a redukce T1 centra aplikovaným napětím má zásadní vliv na kinetiku transformace ostatních center. Průběh závislosti QT3 na

skenovací rychlosti je shodný u obou skenovacích rozsahů, při širším potenciálovém rozsahu však pozorujeme při pomalém skenování daleko vyšší hodnotu náboje. Lze předpokládat, že tento nárůst je způsoben neustálou intramolekulární elektronovou výměnou iniciovanou aplikací vyššího potenciálu, resp. vynucenou elektrochemickou transformací T1. Ta je po redukci elektrodovým potenciálem reoxidována T2/T3 centrem, jehož opětovná oxidace je zajištěna vkládaným napětím.



Obr. 2: závislost elektrického náboje prošlého při anodickém T2 a katodickém T1, T2 a T3 procesu na skenovací rychlosti. CV měřeno v potenciálovém rozsahu 0 - 700 mV v 0,1M acetátovém pufru, pH 6, deaerovaném dusíkem.



Obr. 3: závislost elektrického náboje prošlého při anodickém T2 a katodickém T2 a T3 procesu na skenovací rychlosti. CV měřeno v potenciálovém rozsahu 0 - 420 mV v 0,1M acetátovém pufru, pH 6, deaerovaném dusíkem.

Závěr

Aplikací škály skenovacích rychlostí při CV připravené biokatody s BOD byly zjištěny rozdíly v povaze aktivních center tohoto enzymu, kdy T1 a T3 vykazovaly poměrně rychlý pokles efektivity detekované elektrochemické transformace s rostoucí skenovací rychlostí, oproti tomu T2 vykazovala maximální efektivitu až při rychlosti 25 mV s⁻¹. To lze připsat změně povahy elektronového transferu při dosažení limitu rychlosti výměny u T1 a T3. Propojení jednotlivých aktivních center bylo dále potvrzeno CV skenováním ve sníženém potenciálovém rozsahu, kdy T2 centrum vykazovalo daleko menší závislost množství

prošlého náboje na skenovací rychlosti než v případě, kdy skenovací potenciál byl dostatečný i na oxidaci/redukci T1.

Rovněž katodická transformace T3 byla méně efektivní, což opět potvrzuje zásadní vliv T1 na chování celého systému, resp. na propojenost a vzájemnou ovlivnitelnost jednotlivých aktivních míst bilirubin oxidázy.

Poděkování

Tato publikace vznikla díky podpoře v rámci operačního programu Výzkum a vývoj pro projekt: Centrum excelentnosti pre bílo-zelenou biotechnologii, ITMS 26220120054, spolufinancovaný ze zdrojů Evropského fondu regionálního rozvoje.

Literatura

- [1] Mizutani K., Toyoda M., Agara K., Takahashi N., Sato A., Kamitaka Y., Tsujimura S., Nakanishi Y., Sugiura T., Yamaguchi S., Kano K., Mikami B. (2010). *Acta Crystallogr., Sect.F*, 66, 765
- [2] Shleev S., Tkac J., Christenson A., Ruzgas T., Yaropolov A.I., Whittaker J.W., Gorton L. (2005) *Biosen. Bioelectron.*, 20, 2517
- [3] Opallo M., Bilewicz R. (2011). *Adv. Phys. Chem.*, 2011, Article ID 947637
- [4] Ivniński D.M., Khripin C., Luckarift H.R., Johnson G.R., Atanasov P. (2010). *Electrochim. Acta*, 55, 7385
- [5] Christenson A., Shleev S., Mano N., Heller A., Gorton L. (2006). *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1757, 1634
- [6] Filip J., Šefčovičová J., Gemeiner P., Tkac J. (2012). *Electrochem. Acta*, article in press, DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2012.09.054>

ZDROJE SELÉNU VO VÝŽIVE OBYVATEĽSTVA

Tomáš Tóth, Dana Urminská, Juraj Miššík, Alena Vollmannová, Július Árvay

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, SR
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-949 76 Nitra, Slovensko*

Úvod

Výrazné zmeny v kvalite života, ktoré nastali hlavne v 19 storočí, ako aj zmeny v stravovacích

návykoch a v životospráve, majú za následok vzostup civilizačných chorôb. Vysoká chorobnosť a úmrtnosť na kardiovaskulárne a onkologické ochorenia, diabetes a obezita sú priamym dôsledkom stresu, fajčenia, konzumácie alkoholu a zlej životosprávy človeka modernej doby. Faktory vonkajšieho prostredia, fajčenie a stres sú príčinou vzniku voľných radikálov v organizme, ktorých prítomnosť v organizme môže byť štartérom onkologických ochorení. Hoci ľudský organizmus má obranné mechanizmy na ich elimináciu, na zvýšenie obranyschopnosti je nevyhnutné prijímať v potrave antioxidanty, ktoré chránia organizmus pred civilizačnými chorobami. Medzi významné antioxidanty patria vitamín C, E, fenolové kyseliny, flavonoidy, karotenoidy, glykozidy a zo stopových prvkov selén. Problematiku potenciálnych zdrojov selénu vo výžive obyvateľstva rieši v súčasnosti kolektív autorov vo výskumnom projekte VEGA 1/1325/04

Výskyt selénu

Nízky obsah selénu v ľudskom organizme je v dôsledku jeho nízkeho obsahu v pôdach Slovenska, a tým aj v rastlinných a živočíšnych organizmoch a samozrejme aj v potravinách. Selén sa vyskytuje v zemskej kôre spolu so sírou, v prírodných vodách a v atmosfére. Obsah Se v jednotlivých regiónoch a lokalitách sveta, kontinentov a štátov je veľmi rozdielny. Zdrojom rôzneho množstva selénu sú aj potraviny (tab. 1).

**Tab. 1. Obsah selénu v niektorých potravinách konzumovaných na Slovensku
v r.1997(Kadrová, Jet al. 2003)**

Potravina	min	max	priemer	Počet meraní
	µg/100g			
mäso				
hovädzie plece	1,73	3,12	2,34	10
hovädzí močing (lýtko)	3	6,67	5,72	5
hovädzia hrud'	1,04	2,61	1,83	4
hovädzia pečeň	5,81	15,48	9,56	10
hovädzie pľúca	3	3,34	3,19	4
hovädzie srdce	4,7	5,52	5,15	4
hovädzia roštenka	2,03	3,57		2
bravčové plece	10,21	10,56	10,56	4
bravčové stehno	5,53	9	7,77	4
bravčový krk	5,73	16,43	9,96	6

bravčová pečeň	20,48	25,5	23,09	3
jahňacie stehno	4,47	4,8		2
kuracie stehno	9,43	21,51	14,01	7
kuracie prsia	11,62	13,2	12,32	3
kuracia pečeň	32,34	46,48	39,83	5
kačacie stehno	1,8	1,91		2
kačacia pečeň	7,3	7,8		2
filé z morských rýb (mrazené)	50,5	52,07		2
kapor	20,4	27,25	24,33	4
pstruh	19,61	20,7		2
mäsové výrobky				
bravčová šunka	6,05	8,34	6,87	3
bravčové párky	4,47	5,53		2
saláma	2,36	4,15	3,2	7
hydinová saláma	9,2	9,4		2
vajcia				
slepačie vajce celé	18,92	23,34	21,52	5
slepačí žltok	28,17	44,3	34,22	12
slepačí bielok	8,16	10,88	8,75	12
mliečne výrobky				
pasterizované kravské mlieko	0,4	1,16	0,71	10
čerstvé kozie mlieko	0,75	0,95		2
ovocný jogurt	0,4	0,75		2
tvaroh	2,44	3,17	2,76	3
tavený syr	1,92	2,72	2,25	4
eidam	3,86	4,14	4,05	4
cereálne výrobky				
pšeničná múka	1,5	3,23	2,51	11
ovsené vločky	1,22	1,62		2
biely chlieb	1,43	2,15	1,76	6
ražný chlieb	1,55	1,85	1,65	3
rožky	1,59	2,6	2,12	12
vaječné cestoviny	5,3	5,9	5,68	3
ryža	2,35	3,4		2
kukurica	1,28	2,23	1,8	4
zelenina				
cibuľa	0,07	2,19	0,58	6
cesnak	0,14	12,9	5,79	8
pór	0,16	0,26		2

zelený hrášok	0,31	2,72	1,35	7
sušený hrach	3,25	5,05	4,35	4
fazuľa (biela a hnedá)	1,92	8,2	3,75	6
šošovica	2,75	7,97		2
sója	2,84	5,06		2
hlávkový šalát	0,05	0,13	0,09	3
mrkva	0,07	0,26	0,13	6
petržlen	0,07	0,32	0,2	5
red'kovka	0,07	0,07		2
paradajky	0,03	0,07	0,05	3
paprika	0,06	0,07	0,07	3
kaleráb	0,07	0,31	0,21	5
karfiol	0,12	0,47	0,22	4
zemiaky	0,05	0,57	0,35	8
kapusta hlávková	0,2	1,66		3
huby				
kuriatka	1,28	2,01		2
masliaky	17,55	23,98		2
šampiňóny pestované	5,05	9,52		2
ovocie				
jahody	0,31	0,33		2
višne	0,11	0,13		2
jablká	0,08	0,25	0,14	6
pomaranče	0,08	0,13		2
mandarínky	0,16	0,2		2
banány	0,58	0,79		3
nápoje				
čaj	0,07	0,08		2
káva	0,06	0,08		2
ovocná limonáda	0,06	0,1		2
kola nápoj	0,07			1
pivo	0,07	0,2		2

V potravinách sa nachádza len vo forme jeho organických zlúčenín, najmä selénmetionín (v potravinách rastlinného pôvodu), selénocysteín (v potravinách živočíšneho pôvodu) ale aj vo forme peptidov, nukleových kyselín s derivátmi Se. Anorganické formy selénu sa nachádzajú v potravinách vo forme výživových doplnkov alebo kontaminantov.

Význam selénu

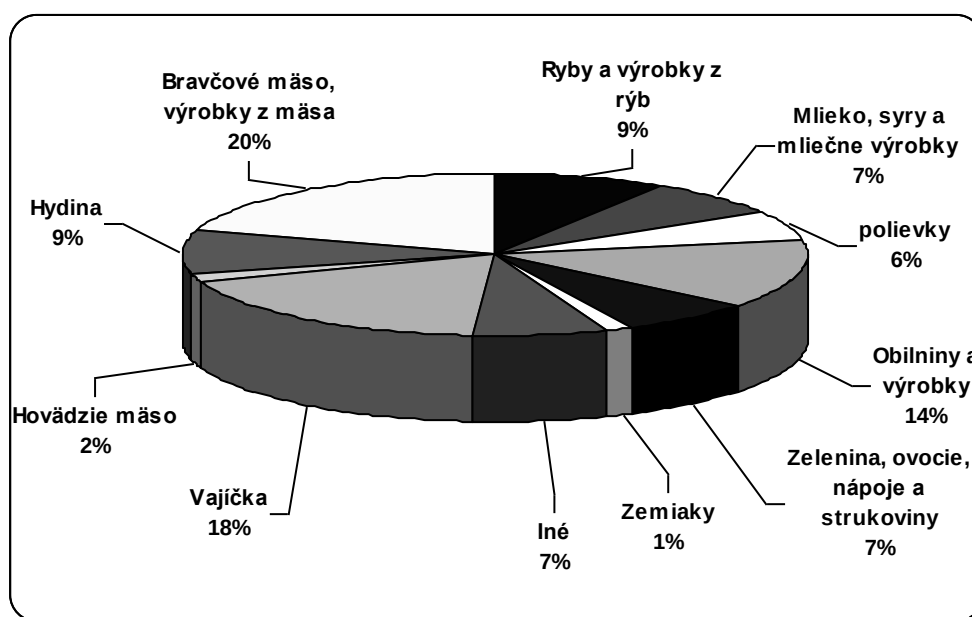
Selén zohráva dôležitú úlohu pri ochrane nášho zdravia. Spomaľuje proces starnutia tkanív a neutralizuje účinky niektorých rakovinotvorných látok. Je nevyhnutný pre činnosť pankreasu a prispieva k pružnosti tkanív. Užívanie selénu má veľmi dobré účinky na organizmus žien v menopauze, pretože zmierňuje návaly horúčavy a nevoľnosti. Muži však

potrebujú selén ešte viac, pretože veľa tejto látky sa sústreďuje v semenných žľazách a veľké množstvo odchádza z tela so spermiami. Selén a vitamín E účinkujú synergicky, zosilňovaním vzájomných účinkov prispievajú k správnej funkcii srdca a k produkcii ochranných teliesok v krvi.

Nízke koncentrácie selénu sú esenciálne pre ľudský a živočíšny organizmus. Jeho vysoké koncentrácie však pôsobia toxicky. Je dôležitou súčasťou enzymatických systémov. Enzýmy glutationperoxidáza, jód-5-deiodináza chránia bunky pred oxidáciou. Pôsobí ako katalyzátor metabolizmu v pečeni, inhibítor toxických kovov v organizme za vzniku nerozpustných selenidov. V ľudskom organizme sa nachádza 5 – 10 mg selénu, z ktorého polovica je zhromaždená v pečeni. Ďalej sa nachádza v obličkách a v štítnej žľaze. V krvi by mala jeho koncentrácia dosahovať 0,1 mg.l⁻¹.

Pri jeho nedostatku v organizme výrazne klesá aktivita enzýmu glutationperoxidázy, čo dôsledkom je znížená antioxidačná schopnosť organizmu. Mnohé štúdie potvrdili dôležitý účinok na imunitný systém ľudského organizmu. Nedostatok selénu okrem zníženia imunity súvisí aj s rozvojom nádorových ochorení, ochorení obličiek, cirhózou pečene, svalovou dystrofiou, očným zákalom, srdcovo-cievnyimi ochoreniami atď. Na druhej strane dlhodobé testy potvrdili jeho preventívne antikarcinogénne účinky hlavne proti nádorom prostaty, pľúc a prsníkov.

Nedostatočnému príjmu selénu sú vystavené najmä tieto skupiny populácie : mladí ľudia, ktorí nekonzumujú výživnú stravu (študenti), vegetariáni, starí ľudia, tehotné a dojčiace ženy, fajčiari, chronicky chorí jedinci.



Obrázok 1. Príjem selénu z jednotlivých potravín

Toxicita selénu

Selén pri vyšších dávkach (nad 1000 µg denne) pôsobí na organizmus toxicky. Jeho toxicita sa prejavuje zápalom dýchacích ciest, edémom pľúc, zvýšená krvácanosť, kožnými zmenami, depresiami. Vážne otravy môžu viesť k cirhóze pečene, vypadávaniu vlasov, zlyhaniu obličiek. Vysoký príjem selénu spôsobuje okrem akútnej toxicity organizmu aj mutagénne a teratogénne účinky v organizme.

Záver

V súčasnosti sa venuje zvýšená pozornosť vplyvu výživy na zdravie v súvislosti s príjmom antioxidantov zabráňujúcim tvorbe škodlivých oxidačných produktov v organizme, ako sú

vitamíny a esenciálne stopové prvky – napr. selén, ktorý je súčasťou antioxidantných enzýmov. Jeho nedostatok môže spôsobiť mnohé ochorenia a je nevyhnutný pre ľudský imunitný systém. Príjem selénu potravinami je na Slovensku nízky, čo súvisí aj z jeho nízkym obsahom v pôde. Jeho nedostatok sa dá nahradiť požívaním výživových doplnkov, alebo preparátov so zvýšeným obsahom selénu. Pozornosť by sa však mala venovať aj konzumácii selénu, ktorá je prirodzenou súčasťou potravín rastlinného a živočíšneho pôvodu. Medzi potraviny bohaté na selén patria vlašské orechy, cesnak, hríby, pečeň, vajcia, ryby a vnútornosti.

Kontaktná adresa : Tomáš Tóth Katedra chémie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra. e-mail : tomas.toth@uniag.sk

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

OBSAH KADMIA, OLOVA A NIKLU V POĽNOHOSPODÁRSKÝCH PLODINÁCH V BLÍZKOSTI CHEMICKÉHO ZÁVODU CHEMKO STRÁŽSKE

Tomáš Tóth, Dana Urminská, Juraj Miššík, Alena Vollmannová, Július Árvay
*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, SR
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-949 76 Nitra, Slovensko*

Úvod

Poľnohospodárska prvovýroba ako jedna zo zložiek trvalo udržateľného rozvoja je výrobcom produktov, ktoré priamo poskytujú surovinovú základňu pre výrobu potravín. Od podmienok prvovýroby je závislá aj kvalita produkcie a kvalita vyrobených potravín.

Podmienky stanovišťa, lokalita hospodárenia a vplyv priemyselnej výroby v okolí poľnohospodárskej výroby sa výraznou mierou podpisuje pod kvalitu dopestovaných produktov. Kvalita dopestovaných produktov následne úzko koreluje aj s výrobou zdravotne nezávadných potravín. Hlavne sa to týka oblastí, kde vplyvom priemyselnej výroby je narušená kvalita životného prostredia.

Kontaminácia pôd je integrálnou súčasťou životného prostredia, je súčasne aj zdrojom pre znečistenie ostatných zložiek životného prostredia a potravinového reťazca. Kontaminácia rastlín cudzorodými látkami je jedným z hlavných činiteľov, ktoré sa podieľajú na zdravotnom stave obyvateľstva. Z hľadiska záťaže patria k najproblematickejším z anorganických kontaminantov kadmium, olovo a ortuť, z organických polychlórované bifenyly a reziduá chlórovaných pesticídov.

Priemerné obsahy ťažkých kovov v pôdach Slovenska získané analýzou súboru pôdnych sond signalizujú, že pôdy boli vystavené záťaži ťažkými kovmi a inými znečisťujúcimi látkami. Negatívne dôsledky zvýšeného prísunu škodlivých látok sa výrazne prejavujú na znížení priemerného dožitého veku, ktorý je zvlášť u mužov jedným z najnižších v Európe, zvýšení frekvencie kardiovaskulárnych, nádorových a alergických ochorení.

Výskyt ťažkých kovov v rastlinách súvisí s ich prítomnosťou v pôdach. Miera účinku ťažkých kovov na produkčný a bioenergetický potenciál rastlín závisí od ich množstva a povahy. V prirodzených podmienkach je obsah ťažkých kovov v rastline podmienený genetickým potenciálom rastliny, no súčasne vysoké a často nekontrolovateľné antropogénne znečisťovanie môže viesť k zvýšeniu ich obsahu v rastlinách a k následnému možnému inputu ťažkých kovov do potravinového reťazca (Alloway, 1990).

Kadmium

Kadmium patrí medzi priemyselne využívané kovy. Kontaminácia potravinového reťazca kadmiumom súvisí s kontamináciou všetkých zložiek prostredia a to predovšetkým pôdy. Vyskytuje sa vo všetkých typoch pôd, viaže sa v horných častiach pôdneho profilu, v poľnohospodárskych pôdach v orničnej a podorničnej vrstve.

Výsledky prác viacerých autorov potvrdili, že na kontaminácii rastlín má významný podiel znečistené ovzdušie. Uvádza sa, že rôzne druhy rastlín môžu prijímať priamo z atmosféry 10 – 60 % z celkového obsahu Cd v rastline, pričom určujúci vplyv na prienik Cd do pletív majú vodorozpusťné komponenty.

Olovo

Olovo nepatrí medzi mikroživiny a neplní ani žiadnu biologickú funkciu pre rastliny a živočchy. Pre rastliny je charakteristická akumulácia olova v koreňovom systéme, v ktorom sa nachádza až 90 % z jeho celkového obsahu v rastline. V nadzemných častiach rastlín sú obsahy olova aj pri silne zamokrených pôdach pomerne nízke. Obsahy olova v rastlinách sa pohybujú medzi 0,2–5,0 mg.kg⁻¹(Beneš, 1994). Rastlina kumuluje Pb z pôdy hlavne

v koreňoch a minimálne sa translokuje do nadzemných častí (Chreneková, 1994).

Nadzemná časť rastlín je kontaminovaná predovšetkým olovom zo znečistenej atmosféry. Pri prevahe mimokoreňového príjmu klesá obsah olova v jednotlivých častiach rastliny v poradí : nadzemná časť > korene > plody.

Olovo je v pôde veľmi imobilné. Transport a vymývanie Pb je v dôsledku jeho nízkej rozpustnosti veľmi malý. Okolo 80 % Pb celkovo obsiahnutého v imisiách zostáva v orníčnej vrstve pôdy.

Nikel

Nikel je dôležitým a nepostrádateľným esenciálnym prvkom pre rastliny a niektoré živočíchy. V prírode sa vyskytuje prevažne vo forme sulfidov a kremičitanov. Nadbytok pôsobí fytotoxicky.

Z hľadiska karcinogénneho účinku sú najnebezpečnejšie sulfidy a oxidy niklu (Bencko a i., 1995). Organická hmota v pôde má veľkú schopnosť Ni adsorbovať, keď dokáže mobilizovať Ni z uhličitanov a znižuje jeho sorpciu ílmi. Na mobilitu Ni vplyvajú aj oxidy Fe a Mn, ako aj pH. Všeobecne platí, že rozpustnosť Ni je nepriamo úmerná hodnote pH, najviac je rozpustný v pôdach s pH 6,5 – 7,0. Priemerné hodnoty v pôdach sa pohybujú medzi 30 – 80 mg.kg⁻¹.

Materiál a metódy

Sledovanie obsahu kadmia, olova a niklu v dopestovaných poľnohospodárskych komoditách sa uskutočnilo na Agrodrúžstve Staré (stanovište 1-4) a Roľníckom družstve Voľa (stanovište 5-9) v okrese Michalovce, ktoré sa nachádzajú v okruhu 10 km od chemického závodu Chemko Strážke, významného producenta cudzorodých látok a kontaminantov, ktoré majú priamy vplyv na kvalitu poľnohospodárskych produktov v tomto regióne.

Analýze rastlinného materiálu predchádzal rozbor pôdy na obsah ťažkých kovov, kde sme zistili prekroenie obsahu Cd v pôde o 42 %, obsah Pb bol prekročený o 10 % a obsah Ni o 39 % prekračoval limitné hodnoty pre ich obsah v pôde (Rozhodnutie MP SR č. 531/1994-100). Zdrojom ťažkých kovov v pôde je činnosť chemického závodu v Strážskom.

Vzorky rastlinného materiálu sme odoberali v plnej zrelosti a analyzovali nadzemnú biomasu, a to u obilnín zrno a u olejníkov nažky a šesule. Obder vzoriek rastlinného materiálu sme uskutočnili z toho istého miesta, z ktorého sme odobrali pôdne vzorky. Vzorky boli vysušené a pred analyzovaním pomleté. V rastlinných vzorkách sme stanovili obsah sledovaných ťažkých kovov (Cd, Pb, Ni) po predchádzajúcej mineralizácii suchou cestou plameňovou AAS(atómová absorpčná spektrofotometria). Pestované plodiny na sledovaných honoch sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Pestované plodiny na sledovaných honoch

stanovište	Plodina
1	Kapusta repková pravá (<i>Brassica napus</i> L.)
2	Jačmeň siaty jarný (<i>Hordeum vulgare</i> L.)
3	Pšenica letná forma ozimná (<i>Triticum aestivum</i> L.)
4	Pšenica letná forma ozimná (<i>Triticum aestivum</i> L.)
5	Pšenica letná forma ozimná (<i>Triticum aestivum</i> L.)
6	Slnečnica ročná (<i>Helianthus annuus</i> L.)
7	Pšenica letná forma ozimná (<i>Triticum aestivum</i> L.)
8	Jačmeň siaty jarný (<i>Hordeum vulgare</i> L.)
9	Pšenica letná forma ozimná (<i>Triticum</i>

Výsledky a diskusia

Na stanovenie obsahu sledovaných ťažkých kovov v rastlinách sme použili vzorky pestovaných plodín, ktoré sme odobrali v plnej zrelosti. Namerané obsahy ťažkých kovov sú uvedené v tabuľke č. 2, kde sme uviedli aj najvyššie prípustné množstvá sledovaných prvkov, ktoré sú determinované legislatívou – Vestník MZ 981/1996 – 100 Potravinový kódex SR. Na základe porovnania najvyšších prípustných množstiev (NPM) v jednotlivých komoditách s nameranými obsahmi Cd, Pb a Ni v rastlinách možno konštatovať, že obsah kadmia v semene repky a slnečnice neprekročil legislatívne stanovené obsahy. U pestovaných obilnín (pšenica, jačmeň) bol obsah kadmia v zrne prekročený vo všetkých vzorkách. Najvyššie prípustné množstvo kadmia v zrne obilnín je $0,07 \text{ mg.kg}^{-1}$, v našich vzorkách bol obsah kadmia v rozmedzí $0,169 - 0,883 \text{ mg.kg}^{-1}$, priemerná hodnota za celý súbor bola $0,429 \text{ mg.kg}^{-1}$. NPM bolo prekročené o viac ako 6 násobok tejto hodnoty. V prípade niklu v rastlinných produktoch ani v jednej vzorke nebolo prekročené najvyššie prípustné množstvo pre tieto prvky.

Namerané obsahy olova úzko korešpondujú z obsahom kadmia v rastlinných vzorkách. U olejnín bolo NPM prekročené v semene repky o 2,81 násobok v porovnaní s NPM ($1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$) pre Pb, vo vzorkách slnečnice obsah olova bol pod touto hodnotou. Vzorky obilnín obsahovali vyššie množstvo olova, ako je NPM ($0,7 \text{ mg Pb.kg}^{-1}$). Priemerný obsah olova v rastlinných vzorkách bol $1,16 \text{ mg.kg}^{-1}$. Zo siedmich vzoriek obilnín bolo prekročené NPM v 5 vzorkách, dve vzorky boli pod touto hodnotou. Najvyšší nameraný obsah bol $2,43 \text{ mg.kg}^{-1}$ a najnižší $0,21 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Tabuľka 2: Obsah ťažkých kovov v pestovaných plodinách a porovnanie s najvyššími prípustnými množstvami (NPM) v mg.kg^{-1}

ST	Plodina	Cd	NPM	Pb	NPM	Ni	NPM
1	Repka – šešule	0,300	0,5	2,81	1,0	1,00	-
2	Jačmeň – zrno	0,243	0,07	2,43	0,7	0,42	3,0
3	Pšenica – zrno	0,247	0,07	0,96	0,7	1,30	3,0
4	Pšenica – zrno	0,883	0,07	1,59	0,7	1,49	3,0
5	Pšenica – zrno	0,709	0,07	0,64	0,7	0,86	3,0
6	Slnečnica – nažky (obaly)	0,421	-	0,21	-	1,10	-
	Slnečnica – nažky (jadro)	0,423	0,5	0,70	1,0	5,40	-
7	Pšenica – zrno	0,169	0,07	1,17	0,7	1,16	3,0
8	Jačmeň – zrno	0,421	0,07	0,21	0,7	1,47	3,0
9	Pšenica – zrno	0,343	0,07	1,18	0,7	0,75	3,0

NPM – najvyššie prípustné množstvo v mg.kg^{-1} (Potravinový kódex SR)

Záver

V práci sme sa zaoberali problematikou pôdnej hygieny, obsahmi ťažkých kovov v produkčných častiach rastlín na lokalitách Agro družstva Staré a Roľníckeho družstva Voľa v okrese Michalovce, nachádzajúcich sa v blízkosti chemického podniku Chemko Strážske. Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, stav pôdnej hygieny je v tomto regióne značne ovplyvnený činnosťou chemického podniku Chemko Strážske, ktorý je výrazným producentom rizikových látok, čo sa prejavuje na stave pôdnej hygieny, ako aj kvalite dopestovaných rastlinných produktov.

Na základe hodnotenia obsahov ťažkých kovov v rastlinnom materiáli vyplýva, že zvýšený obsah ťažkých kovov v pôde indikoval aj zvýšené obsahy ťažkých kovov v rastlinných komoditách. Najmä u pestovaných obilnín bol nameraný zvýšený obsah kadmia v zrne pšenice a jačmeňa. U pestovaných olejnín sa zvýšená kumulácia

a prekročenie najvyšších prípustných množstiev nepreukázalo.

Podmienky pestovania a výroby potravín, ako je zrejmé, značne ovplyvňujú kvalitu produktov v závislosti od stanovištných podmienok. Antropickou činnosťou človeka v tomto regióne sa vytvorili zhoršené podmienky, ktorých výsledkom je aj produkcia surovín pre výrobu potravín so zvýšeným obsahom ťažkých kovov v komoditách určených na spracovanie potravinárskym priemyslom.

V sledovanej oblasti je nutné venovať zvýšenú pozornosť vstupu rizikových prvkov do pôdy, do rastlín a následne do potravinového reťazca, ako aj eliminovať účinnosť a mobilitu ťažkých kovov v pôde a to najmä úpravou pôdnej reakcie vápnením a pestovaním metalofilných rastlín na kontaminovaných pôdach.

Zoznam použitej literatúry

1. ALLOWAY, B.J. 1990. Heavy metal in soil. Blackie and son Ltd., Glasgow, 1990, s. 1-339.
2. BENCKO, V. a i. 1995. Toxické kovy v životnom a pracovnom prostredí človeka, Grada Publishing, 1995, s. 12- 281.
3. BENEŠ, S. – PABIANOVÁ, J. 1987. Přirozené obsahy, distribuce a klasifikace prvků v půdách. VŠZ. VN MON Praha, 1987, 205 s.
4. BENEŠ, S. 1994. Obsahy a bilance prvků ve svérách životního prostředí. I., II., část. Praha, Ministerstvo zemědělství ČR, 1993, 1994.
5. CHRENEKOVÁ, E. a i. 1994. Pôdne vklady odpadmi a formy Cr^{III} a Cr^{IV} v rastlinách. Rastlinná výroba. 1994. s.841-850.
6. Rozhodnutie MP SR č. 531/1994-540 O najvyšších prípustných hodnotách škodlivých látok v pôde. Vestník MP SR, čiastka 1, ročník XXVI, január 1994.
7. Vestník MZ SR č. 981/1996-100. Potravinový kódex Slovenskej republiky. Čiastka 9-13., ročník 44, zo dňa 15.7.1996

Kontaktná adresa : Tomáš Tóth, Katedra chémie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU, 949 01 Nitra, e-mail: Tomas.Toth@uniag.sk

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Možnosti využitia zwitteriónov pri príprave biosenzora

Bertók Tomáš*, Kasák Peter, Tkáč Ján

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra
[*chemtobe@savba.sk](mailto:chemtobe@savba.sk)

Kľúčové slová

Biosenzor, lektín, biofouling, zwitterión, glykoproteín, elektrochemická impedančná spektroskopia

Úvod

Biosenzory a biočipy tvoria významnú oblasť bioanalytického a biomedicínskeho výskumu. S využitím rôznych metód, v súčasnosti najmä elektrochemických a optických, sa kladie dôraz na prípravu citlivých zariadení na detekciu rôznych ochorení z biologických vzoriek. Elektrochemické (voltametrické a impedančné) biosenzory patria medzi najcitlivejšie, dosahujúce atto- až yoktomolárne detekčné limity pre rôzne analyty, od nukleových kyselín a proteínov až po relatívne malé molekuly, ako napr. pesticídy. V tejto práci predstavujeme afinitný, impedimetrický biosenzor – schopný detekcie glykánových štruktúr v neznačenom móde, ktorým je možné stanovenie glykánov viazaných na proteínový nosič až k femtomolárnym koncentráciám¹.

Okrem hustoty a orientácie biorozpoznávacích elementov je v procese prípravy biosenzora, resp. biočipu kľúčovým krokom blokovanie nešpecifických interakcií, a to najmä v prípade analýzy komplexných, biologických vzoriek (krv, sérum). Štandardne využívané v mnohých technikách (ELISA) je využívanie komerčných blokovacích činidiel, prípadne aj čistých látok (mliečne proteíny, sérový albumín, niektoré oligo-/polyméry). Pri využití tzv. samousporiadaných monovrstiev (SAM) je možnosť okrem aplikácie takýchto činidiel použitie alkántiolových derivátov priamo vo vrstve, nesúcich rôzne funkčné skupiny podieľajúce sa na tomto blokovaní (biofouling). Látkami študovanými a často používanými v tomto smere sú deriváty betaínu – zwitteriónu (N,N,N-trimetylglycínu)^{2,3}. V tejto práci sa na povrchu zlatých elektród vytvárali zmesné SAM vrstvy (11-merkaptoundekánová kyselina, MUA a betaínový derivát na báze kyseliny lipoovej v pomere 1:1). Po následnej aktivácii karboxylov pomocou systému EDC/NHS a kovalentnej imobilizácii lektínu sa sledovala odpoveď pripraveného biosenzora na sledované glykoproteíny. Pre demonštráciu použitia pre rôzne glykány v molekulách glykoproteínov pomocou lektínov sa použili tri systémy lektín-glykoproteín – SNA-I lektín a system fetuín/asialofetuín, RCA lektín a systém asialofetuín/fetuín, a Con A lektín a system invertáza/transferín. Takýto biosenzor má potenciál využitia aj pri detekcii glykánov terapeutických proteínov pripravených biotechnologicky rekombinantnými technikami.

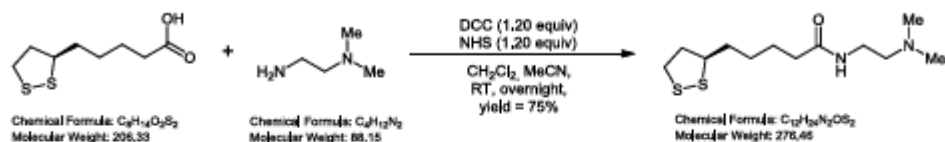
Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie, vrátane roztokov rôzne veľkých zlatých nanočastíc v citrátovom pufri boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Lektín SNA-I bol zakúpený v spoločnosti Gentaur (Belgicko), ostatné v Sigma Aldrich. Zlaté elektródy a zlaté čipy použité v tejto práci sú zo spoločnosti BAS (USA), resp. Litcon (Švédsko). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko). Pri príprave

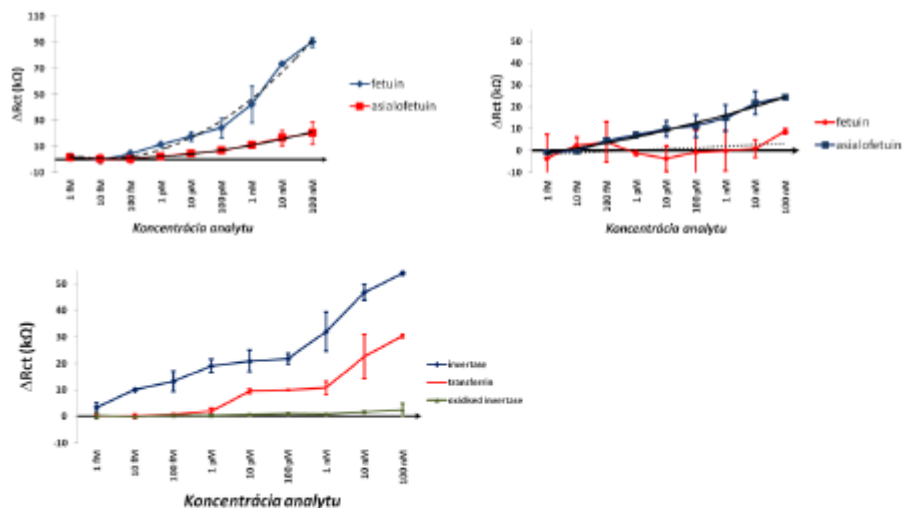
SAM vrstiev sa použili anaeróbne pripravené 1 mM roztoky alkántiolov v etanole pre UV/VIS spektroskopiu (Slavus, Bratislava).

Výsledky a diskusia

Deriváty kyseliny lipoovej a betaínu boli pripravené podľa Lawrence, L. J.; Eisenberg, R. L. US 2007/0083054 A1, čo je naznačené v nasledujúcej schéme.

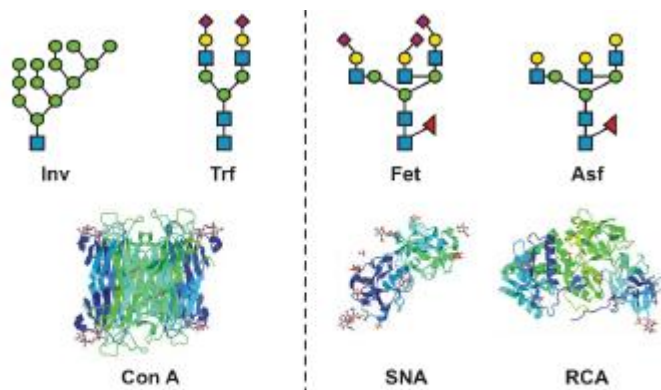


Vyššie uvedený systém bol vyhodnotený s využitím Nyquistovho plotu s použitím okruhu R(C{RW}) pre tri skúmané lektíny (Obr. 1,2 a 3).

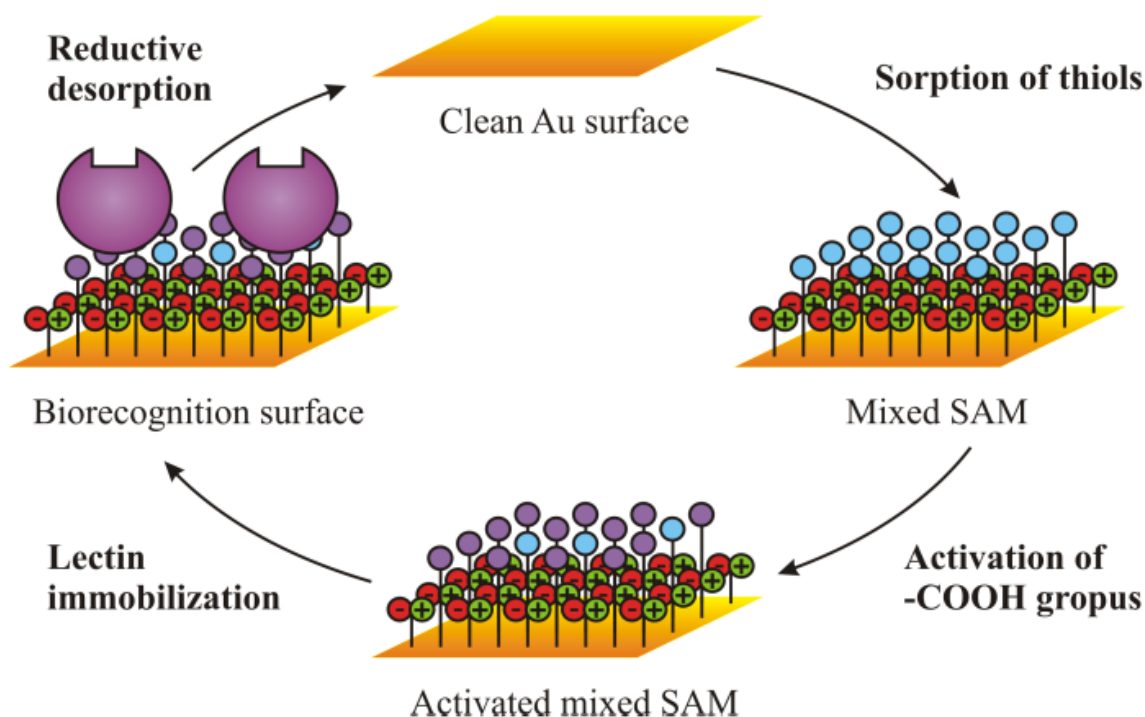


Obr.1.: Kalibračné krivky pre tri sledované lektíny – zľava hore SNA I, RCA a Con A.

V prípade Con A slúžil ako nešpecifický analyt transferín, ktorý aj napriek tomu že neobsahuje manózu v koncových častiach glykánu s lektínom pomerne silno interaguje. Z toho dôvodu bola na vyšetrenie nešpecifických interakcií použitá chemicky oxidovaná invertáza.



Obr.2.: Glykánové štruktúry sledovaných glykoproteínov spolu so štruktúrami použitých lektínov.



Obr.3.: Postupná schéma prípravy povrchu biosenzora na detekciu rôznych glykoproteínov, vrátane redukčnej desorpcie tiolov na regeneráciu zlatých povrchov pri aplikácii negatívneho potenciálu.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Bertok T., Sediva A., Katrlík J., Gemeiner P., Mikula M., Tkáč J.: Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles, Talanta, zaslané
- 2 Huang Ch.-J., Li Y., Jiang S.: Zwitterionic polymer-based platform with two-layer architecture for ultra low fouling and high protein loading, Analytical Chemistry 84 (2012)3440-3445
- 3 Yang W., Xue H., Carr L.R., Wang J., Jiang S.: Zwitterionic poly(carboxybetaine) hydrogels for glucose biosensors in complex media, Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) 2454-2459

Možnosti využitia lektínov v glykomike a diagnostike

Tkáč J.*, Bertók T., Katrlík J., Šefčovičová J., Šedivá A., Mislovičová D.,
Gemeiner P.

*Oddelenie Glykobiotechnológie, Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 845 38,
Bratislava, Slovensko*

Stanovenie glykánov

Problémy

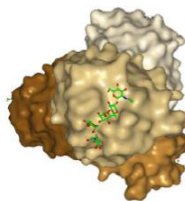
- Podobné fyz.-chem. vlastnosti

Inštrumentálna analýza

- MS (rozličné formáty)
- CE
- LC
- NMR

Bioanalýza s lektínmi

- ELLA
- SPR
- Lektínové biočipy
- Lektínové biosenzory

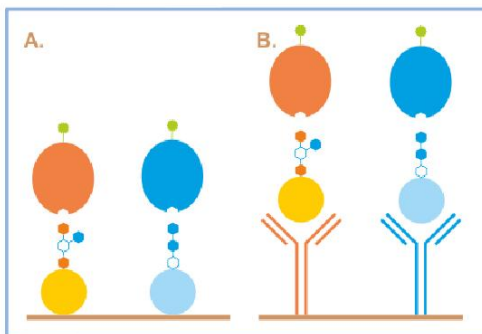


Obr 1: 3-D štruktúra Con A so 4
subjednotkami pri interakcii s
glykánom

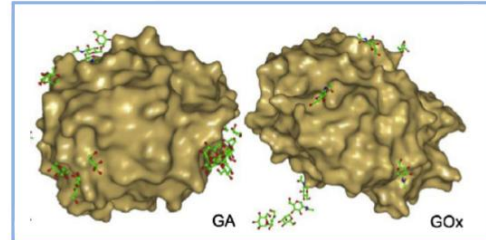
ELLA (Enzyme-linked lectin assays)

- princíp analýzy ako v prípade ELISA
- rozličné konfigurácie
- jednoduchá a univerzálna
- vysoká reprodukovateľnosť

- nutnosť používať značky



Obr 2: Dve konfigurácie ELLA



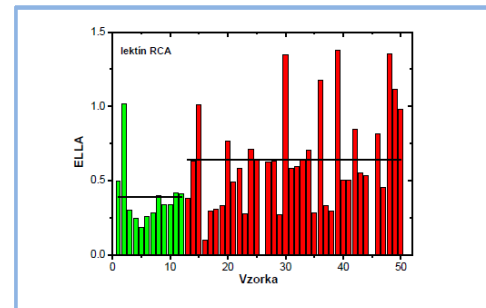
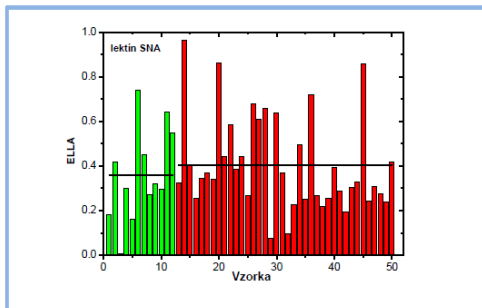
Obr 3: Štruktúra dvoch glykoproteínov

Metóda poskytna

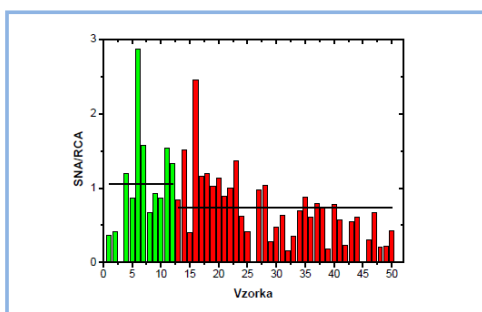
- K_D porovnateľné s literatúrou
- údaje o kooperativite väzby
- K_D hodnoty v súlade s počtom Man jednotiek ako i jej dostupnosťou

Mislovičová et al. Colloids Surf. B: Biointerf. 94 2012 163

ELLA – vzorky RA



Obr 4: Analýza krvi ľudí s RA pomocou ELLA.

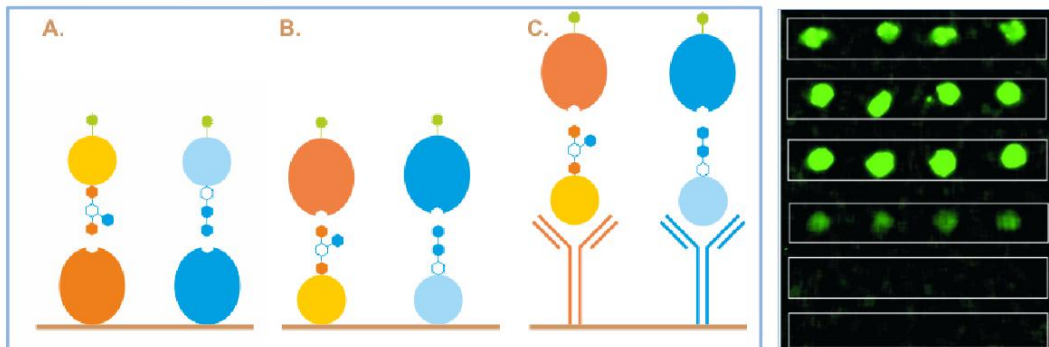


Metóda umožňuje

- analýzu mnohých vzoriek
- vidieť rozdiely v glykoproteíne

Nutnosť využiť viacero lektínov alebo predseparáciu

Lektínové biočipy (lectin microarrays)



Obr 5: Tri konfigurácie lektínových biočipov (vľavo) a typický výsledok analýzy glykoproteínov (vpravo)

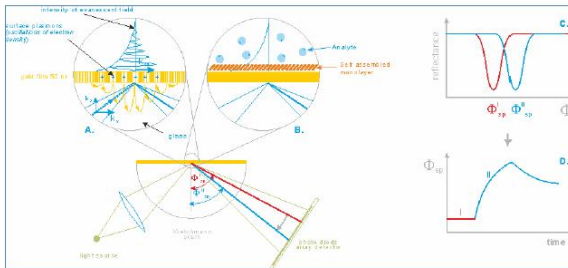
- malá spotreba lektínov/vzoriek
- rozličné konfigurácie
- vysoko-paralelné merania
- vysoká reprodukovateľnosť

- nutnosť používať značky
- relatívne nízka citlivosť – DL pM – nM
- nutnosť predúpravy vzorky

Gemeiner et al., Biotechnol. Adv. 27 2009 1

Katřík et al., Med. Res. Rev. 30 2010 394

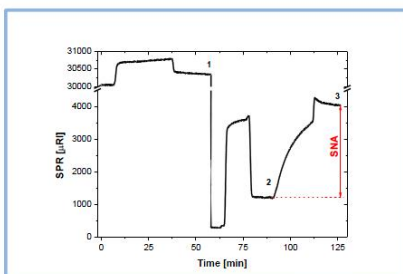
SPR – Surface Plasmon Resonance



Obr 6: Princíp činnosti SPR a sensorgram

- analýza bez značky
- absolútne množstvo proteínov
- analýza afinitných konštánt
- analýza v reálnom čase

- drahý prístroj
- nízka citlivosť
- merania v ultratenkej vrstve
- úzky rozsah povrchov



Obr 7: Určenie množstva lektínu

Table 1

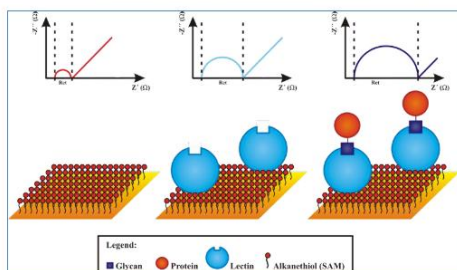
Dissociation constants of glycoprotein - lectin interactions from SPR assays.

Analyte	K_D^a (μM)		K_D^b (μM)	
	ConA	LCA	ConA	LCA
INV	0.3	0.1	0.8	0.1
GA	2.6	1.4	3.0	4.8
TRF	1.2	6.5	13.5	24.2
GO	0.8	0.3	1.3	1.6
BAM	2.7	0.5	8.8	1.2

INV – invertase; GA – glucoamylase; TRF – transferrin; GO – glucose oxidase; BAM – albumin, α-D-mannopyranosylphenyl isothiocyanate, ConA – concanavalin A, LCA – Lens culinaris agglutinin.

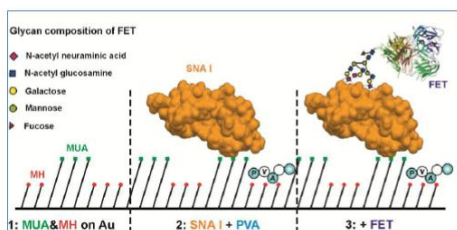
Katřík et al., Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp. 382 2011 198

EIS – Elektrochemická impedančná spektroskopia



Obr 8: Činnosti biosenzora na báze EIS

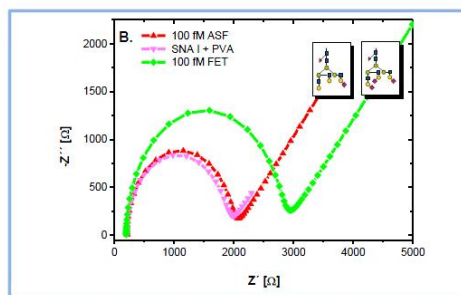
Bertók et al., Microchim. Acta, v tlači



Obr 9: Modifikácia povrchu pre EIS meranie

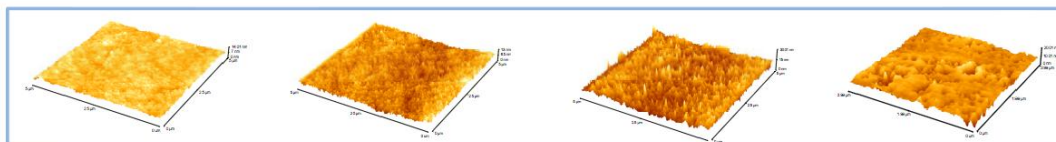
- analýza bez značky
- lacný prístroj
- ultravysoká citlivosť
- krátky čas analýzy
- vysoká flexibilita modifikácií
- kontrola merania v reálnom čase

- komplikovanejší array formát
- kompatibilná s vodivým povrchom

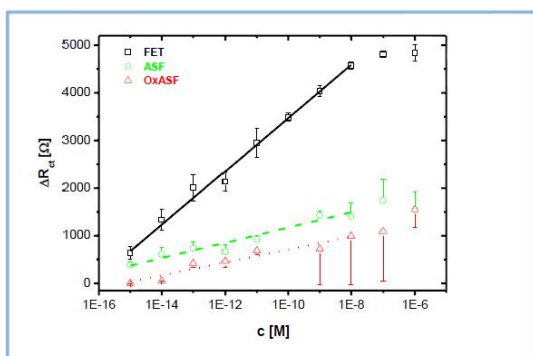


Obr 10: Reálny záznam EIS merania

EIS – kontrola imobilizácie v nanoškále



Obr 11: Zmena povrchu počas prípravy biosenzora: 1. zlato, 2. SAM (self-assembled monolayer), 3. lektín a 4. blokovanie



Obr 12: Kalibrácia biosenzora

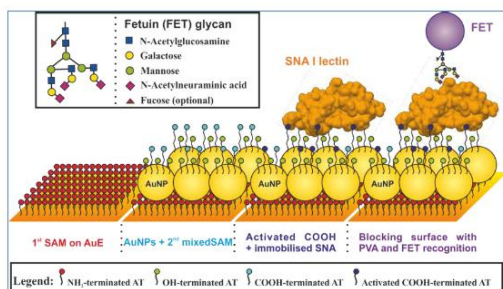
Charakteristiky biosenzora

Rozsah: 7 poriadkov
DL: 1 fM (24 000 molekúl v 40 μ l)
Čas: 30 min vrátane inkubácie
Kvantitatívne stanovenie SA

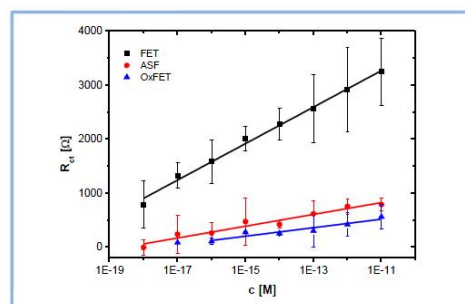
Vysoké nešp. interakcie
Jednorazové použitie

Bertók et al., Microchim. Acta, zaslané

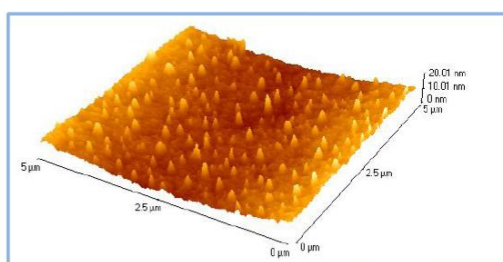
EIS – využitie zlatých nanočastíc



Obr 13: Príprava biosenzora



Obr 15: Kalibrácia biosenzora



Obr 14: Zlaté nanočastice na povrchu biosenzora

Charakteristiky biosenzora

Rozsah: 7 poriadkov

DL: 1 aM (24 molekúl v 40 μl)

Čas: 30 min vrátane inkubácie

Kvantitatívne stanovenie SA

Bertók et al., Anal. Chem, zaslané

Pod'akovanie

Výskum bol podporený:

VEGA 2/0127/10

ŠF: Príspevok bol vytvorený realizáciou projektu Centrum pre Materiály, vrstvy a systémy pre Aplikácie a Chemické procesy v extrémnych podmienkach - Etapa I/II, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre Glykomiku, ITMS 26240120031, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Problematika bude riešená :

ERC Starting grant, APVV projektu a ITN projektu

Oddelenie Glykobiotechnológie na ChU SAV

Vám za pozornosť

Galaktózový biosenzor založený na polysacharidovom nanokompozite

Tkáč Ján*

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-94976 Nitra

[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)

Kľúčové slová

Biosenzor, galaktózaoxidáza, ampérometrické stanovenie, interferencie, uhlíkové nanorúrky (CNT)

Úvod

V súčasnom svete, ktorý je charakterizovaný prudkým nárastom miery poznania vecí a dejov s veľkým vplyvom rýchle sa rozvíjajúcich technológií je pre každého z nás stále dôležitým aspektom zvyšovanie kvality života a produktivity práce. S tým ide ruka v ruke vývoj nových metód, ktoré nám umožnia vplyv týchto dejov sledovať po stránke kvalitatívnej i kvantitatívnej. Jednou z oblastí, ktorá má výrazným spôsobom napomôcť vyrovnáť sa s týmto náporom je vývoj a praktické využívanie nových a robustných analytických techník s dosahom na rôzne oblasti akými sú biotechnológia, zdravotníctvo, potravinárstvo, farmaceutický priemysel, klinická diagnostika, sledovanie kvality životného prostredia a ďalšie. Dôležitými parametrami takýchto analytických zariadení sú najmä presnosť, spoľahlivosť, rýchlosť, vysoká citlivosť, simultánnosť analýz s možnosťou miniaturizovať analytické zariadenia, tak aby boli prenosné s možnosťou ich využitia prakticky kdekoľvek.

V súčasnosti je trendom príprava zariadení, ktoré integrujú spracovanie vzorky s jej účinnou analýzou vo formáte čipov (lab on a chip), prípadne umožňujú vysoko paralelnú analýzu vzorky na povrchoch s vysokou hustotou biorozpoznávacích elementov (microarray formát analýzy). Dôraz je v dnešnej dobe kladený na kontrolu imobilizácie v nanoškále, prípadne na modifikáciu povrchov s kontrolou ich vlastností a funkčnosti s integráciou nanotechnológií (využitie nanoštruktúr prípadne ich príprava a manipulácia s nimi).

Jedným z moderných a veľmi perspektívnych prístupov spĺňajúcich tieto požiadavky je vývoj a aplikácia bioanalytických zariadení prípadne biosenzorov. Biosenzory predstavujú perspektívnu alternatívu k tradičným analytickým technikám, pretože s eleganciou kombinujú špecifitu a citlivosť biomolekúl (enzýmy, DNA, protilátky, bunky, bunkové štruktúry, aptaméry a peptidové aptaméry) so silou a účinnosťou mikroelektroniky pri príprave jednoduchých, rýchlych, citlivých, špecifických a cenovo nenáročných analytických systémov¹. Prevádzkové náklady sú relatívne nízke a variabilita konštrukčných riešení umožňuje vysokú flexibilitu systému, keď je možné jednoduchou modifikáciou dosiahnuť špecifitu analýzy širokého spektra analytov ako i rozličných typov vzoriek, vrátane biotechnologických.

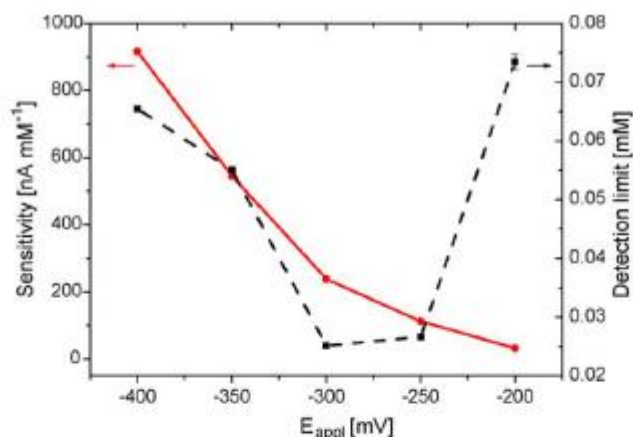
Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie ako galaktózaoxidáza (GalOD), uhlíkové nanorúrky (CNT), dialyzačná membrána a chitozán boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko).

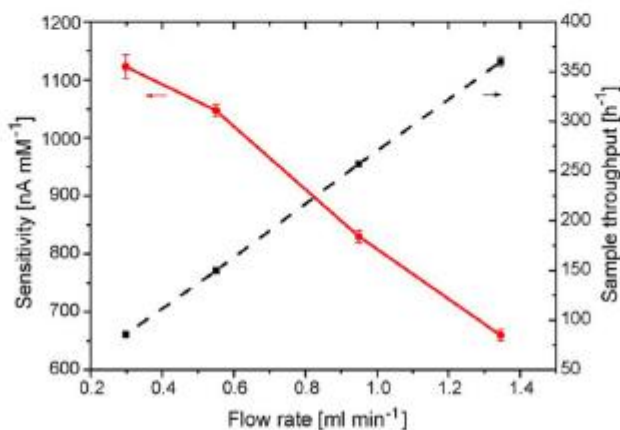
Výsledky a diskusia

Chitozán bol použitý na prípravu CNT disperzie využitej pri konštrukcii GalOD biosenzora. Chitozán je vysoko biokompatibilný polymér používaný na imobilizáciu enzýmov a širokú škálu biomedicínskych a biotechnologických aplikácií.^{2,3} Bol vyšetrovaný vplyv rozličných parametrov, ako povaha vnútornej a vonkajšej vrstvy; sieťovanie enzýmového filmu;

pracovný potenciál a prietok vo FIA formáte na citlivosť, selektivitu a detekčný limit stanovenia (Obr. 1). Finálna konfigurácia biosenzora bola natoľko mechanicky stabilná, že odolala vysokým prietokovým rýchlostiam až $3,75 \text{ ml min}^{-1}$ počas premývania prietokovej cely a bolo skutočne ťažké ju pri mechanickom čistení elektródy odstrániť. Po optimalizácii vplyvu pracovného potenciálu na selektivitu stanovenia galaktózy v prítomnosti kyseliny askorbovej (vitamín C) a vplyvu prietokovej rýchlosti na citlivosť a čas analýzy (Obr. 2) bolo možné skonštruovať robustný biosenzor schopný detegovať galakózu aj v krvnej plazme s extrémne vysokou rýchlosťou analýzy (150 vzoriek za 1 h).



Obr.1.: Vplyv pracovného potenciálu na citlivosť (sensitivity) a detekčný limit (detection limit) biosenzora.



Obr.2.: Vplyv prietoku na citlivosť (sensitivity) biosenzora a na množstvo analyzovateľných vzoriek (sample throughput) v prietokovom systéme.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Turner A.P.F., *Science* **2000**, 290, 1315.
- 2 Krajewska B., *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, 35, 126.
- 3 Rinaudo M., *Prog. Polym. Sci.* **2006**, 31, 603.

Konstrukce fruktóza-kyslíkové biobaterie s využitím uhlíkových nanomateriálů

Jaroslav Filip, Ján Tkáč*

*Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra*

*[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)*

Klíčová slova

biobaterie, fruktóza dehydrogenáza, bilirubin oxidáza, KetjenBlack, uhlíkové nanotrubičky, chitosan

Úvod

V konvenčních palivových článcích je jednodívkově transformována část chemické energie dodávaného paliva na energii elektrickou pomocí anorganických katalyzátorů, především na bázi vzácných kovů. V poslední dekádě je však především díky rozvoji nanotechnologií dosahováno čím dál větší efektivity při konstrukci tzv. biopalivových článků (BFC, biobaterií), ve kterých jsou anorganické katalyzátory nahrazeny biokatalyzátory – jak čistými enzymy, tak celými buňkami, popř. jejich částmi [1].

Pro dosažení co nejvyšší efektivity biopalivového článku je důležité imobilizovat maximální množství biokatalyzátoru (v tomto případě enzymu) na povrch anody a katody. Za tímto účelem se zvyšuje povrch elektrody jejím strukturováním v nanoškále, např. deponováním vodivých nanočástic (kovových nebo uhlíkových). Jako velmi efektivní se ukázaly např. modifikace vodnou disperzí zlatými nanočásticemi [2] nebo sférickými uhlíkovými nanočásticemi (KetjenBlack) dispergovanými v hydrofobních fluorovaných polymerech [3,4]. Pozitivní vliv na efektivitu bioelektrokatalýzy má přítomnost uhlíkových nanotrubiček (CNT), jež zvyšují celkovou vodivost nanokompozitů. Jako jedno z disperzních činidel pro CNT byl s dobrými výsledky testován i chitosan – ekonomicky výhodný polysacharid na bázi biopolymeru chitinu [5].

V této práci je testována kombinace KetjenBlack (KB) jako nanomateriálu s dobrými adsorpčními vlastnostmi a CNT jako nanomateriálu zvyšující celkovou vodivost pro přípravu nanostrukturované anody a katody a po adsorpci příslušných enzymů (fruktóza dehydrogenáza – FDH – jako anodický a bilirubin oxidáza – BOD – jako katodický, kyslík redukující biokatalyzátor), jejich využití v konfiguraci fruktózo-kyslíkového jednokomorového biopalivového článku spolu s voltamperometrickou charakteristikou samostatných elektrod i sestaveného BFC. Jako disperzní činidlo KB a CNT je použit chitosan, čímž se sníží výrobní cena a zvýší biokompatibilita zařízení.

Materiál a metody

CNTs ($d = 1.1 \text{ nm}$, $l = 0.5\text{--}100 \text{ }\mu\text{m}$, čistota $> 90\%$), BOD (8 U mg^{-1} , *Myrothecium verrucaria*), chitosan (CHI, MW = 50-190 kDa) – Sigma Aldrich; St. Louis, USA. FDH – Sorachim; Paříž, Francie. KetjenBlack EC 600-JD (Akzo Nobel Polymer Chemicals B.V., Amersfoort, Nizozemsko) darovány firmou Biesterfeld Silcom s.r.o. (Praha, Česká republika). Ostatní chemikálie čistoty p.a. Modifikované uhlíkové elektrody (GCE; BAS) byly charakterizovány pomocí cyklické voltamperometrie (CV) na potenciostatu PGSTAT 128N (Ecochemie, Utrecht, Nizozemsko) s tříelektrodoým uspořádáním (Ag/AgCl referenční, Pt pomocná a modifikovaná uhlíková jako pracovní elektroda). GCE byly modifikovány pomocí chitosanových disperzí s různým obsahem KB a CNT a následně nechány uschnout na volném vzduchu a opláchnuty destilovanou vodou. KB-CHI disperze (13 mg ml^{-1}) byla

připravena homogenizací chitosanu (0,1% v 0,3% kyselině octové) s KB, CNT-CHI (5 mg ml⁻¹) připravena dispergací CNT v chitosanu pomocí ultrazvukové lázně (Bandelin DT 102 H, Bandelin electronics, Berlin, Německo). Výsledná KB/CNT-CHI směs byla připravena smíšením KB-CHI, CNTCHI a chitosanu v optimalizovaném poměru. Připravené elektrody (GCE||dKB/CNT-CHI) byly následně inkubovány (8 h, 4°C) s roztokem BOD (0,25 U; 100 mM acetátový pufr pH 6) nebo FDH (15 U; 100 mM acetátový pufr pH 5), čímž byla finalizována příprava bioanody (GCE||dKB/CNT-CHI||FDH) a biokatody (GCE||dKB/CNT-CHI||FDH).

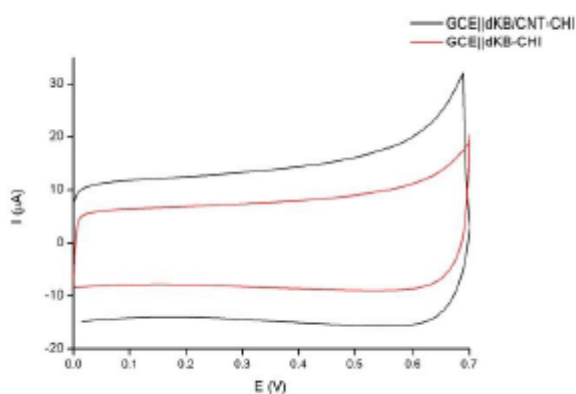
Výsledky

Prvním krokem k optimalizaci elektrodového rozhraní bylo zajištění mechanické stability nanokompozitu po zaschnutí. Při aplikaci 10 μ l disperze s obsahem KB 13 mg ml⁻¹ na elektrodu se po zaschnutí část kompozitu ponořením elektrody do pufru odplavila. Koncentrace KB byla proto snížena zředěním disperze roztokem chitosanu v poměru KB-CHI:chitosan = 1:2 (dKB-CHI) a rovněž bylo sníženo množství disperze aplikované na elektrodu (5 μ l). Tím bylo dosaženo stabilní modifikace GCE uhlíkovými nanočásticemi.

V dalším kroku byl zjišťován vliv integrace CNT do dKB-CHI. Na obr. 1 jsou cyklické voltamogramy elektrod modifikovaných dKB-CHI a dKB/CNT-CHI disperzemi, přičemž v druhém případě byly zjištěny vyšší kapacitní proudy svědčící o větší elektrochemicky aktivní ploše povrchu elektrody.

Následně byl optimalizován poměr CNT a KB v modifikační disperzi porovnáváním biokatalytické odezvy v přítomnosti kyslíku poté, co GCE||dKB/CNT-CHI elektrody připravené ze směsí s různými koncentracemi KB a CNT byly inkubovány s roztokem BOD. Nejvyšší proudová odezva byla dosažena s GCE||dKB/CNT-CHI||BOD připravené z disperze obsahující 0,67 mg ml⁻¹ CNT a 4,3 mg ml⁻¹ KB. U takto připravené biokatody byla porovnáním CV měřených v deaerovaném a aerovaném pufru zjištěna maximální proudová hustota 272 μ A cm⁻² při potenciálu 0 mV (viz obr. 2).

GCE||dKB/CNT-CHI byla použita i na konstrukci bioanody, bez další optimalizace na bioelektrokatalytickou aktivitu FDH vzhledem k tomu, že za limitující faktor pro účinnost BFC bývá považován transport náboje na/z povrch biokatody. Po inkubaci s FDH byla u takto připravené bioanody pomocí porovnání CV v čistém elektrolytu a v přítomnosti 200 mM fruktózy zjištěna maximální proudová hustota 451 μ A cm⁻² při potenciálu +300 mV (viz obr. 2).

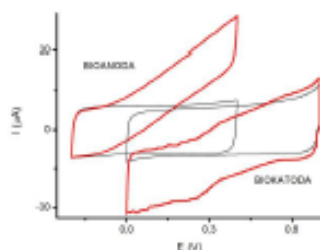


Obr. 1: CV elektrod modifikovaných dKB-CHI (červená křivka) a dKB/CNT-CHI (černá křivka). Skenovací rychlost 10 mV s⁻¹, měřeno v 100 mM acetátovém pufru pH 6.

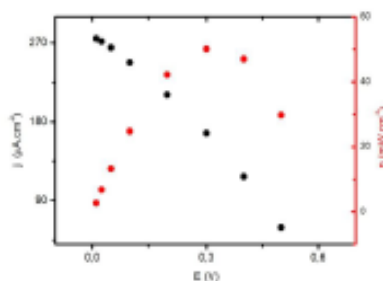
Optimalizovaná GCE||dKB/CNT-CHI||BOD a GCE||dKB/CNT-CHI||FDH byly následně použity jako elektrody jednokomorového biopalivového článku, pracujícího v 5 ml 100 mM acetátového pufru pH 6 s obsahem 200 mM fruktózy (anodický substrát) a probublávaného

vzduchem (kyslík jako katodický substrát). Pro zkonstruovanou biobaterii byly zjišťovány základní operační charakteristiky:

Voltamperometrická charakteristika je znázorněná na obr. 3, stejně jako závislost výkonu na napětí biobaterie. Z grafu na obr. 3 je rovněž patrné, že maximální výkon zařízení ($50 \mu\text{W cm}^{-2}$) byl dosažen při vloženém napětí 300 mV.



Obr. 2: CV GCE/KB/CNT-CHI/BOD a GCE/KB/CNT-CHI/FDH v pH 7,4 (červená křivka) a napětí (černá křivka) substrátu



Obr. 3: Voltamperometrická charakteristika biopelivového článku (•) a závislost výkonu na vloženém napětí (•)

Poděkování

Tato publikace vznikla díky podpoře v rámci operačního programu Výzkum a vývoj pro projekt: Centrum excelentnosti pro bílo-zelenou biotechnologii, ITMS 26220120054, spolufinancovaný ze zdrojů Evropského fondu regionálního rozvoje.

Literatura

- [1] Opallo M., Bilewicz R. (2011). *Adv. Phys. Chem.*, 2011, Article ID 947637
- [2] Murata K., Suzuki M., Kajiya K., Nakamura N., Ohno H. (2009). *Electrochem. Commun.*, 11, 668
- [3] Miyake T., Oike M., Yoshino S., Yatagawa Y., Haneda K., Kaji H., Nishizawa M. (2009). *Chem. Phys. Lett.*, 480, 123
- [4] Habrioux A., Servat K., Tingry S., Kokoh K. B. (2009). *Electrochem. Commun.*, 11, 111
- [5] Filip, J., Sefčovičová, J., Tomčík, P., Gemeiner, P., Tkac, J. (2011). *Talanta*, 84, 355

Monitorovanie dihydroxyacetónu počas biotechnologickej konverzie z glycerolu

Tkáč Ján*, Nahálka Jozef, Gemeiner Peter

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-94976 Nitra

[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)

Kľúčové slová

Biosenzor, galaktózaoxidáza, ampérometrické stanovenie, glycerol, dihydroxyacetón, biotechnologický process

Úvod

Galaktózaoxidáza (GalOD) je veľmi zaujímavým enzýmom, ktorého aktívne centrum bolo veľmi dlho záhadou, s unikátnou kombináciou kovu (Cu^{+2}) s tyrozínovým radikálom.¹ Tento enzým nie je substrátovo špecifický a dokáže okrem galaktózy oxidovať aj ďalšie látky ako polyoly (dihydroxyacetón) prípadne vyššie molekulové sacharidy s terminálnou galaktózou (napr. laktóza).

Biosenzory na rozdiel od klasickej inštrumentálnej techniky analytického laboratória využívajú biorozpoznávacie molekuly, čo je koncept, ktorý má svoje výhody a nevýhody. Výhodou je zvýšená selektivita stanovenia a väčšinou aj rýchlosť meraní s jednou veľkou nevýhodou – problémom so stabilitou biorozpoznávacích elementov. Tento fenomén pútal veľkú pozornosť od počiatku konštrukcie biosenzorov. Skladovacia (biosenzor nie je používaný) a operačná (počas používania biosenzora) stabilita do značnej miery určuje užitočnosť týchto zariadení. Inaktivácia biorozpoznávacích elementov je komplexným fenoménom s celkovou zmenou 3-D štruktúry, čo sa nakoniec prejaví v zmene štruktúry biorozpoznávacej časti. Značnou komplikáciou je, že technika stabilizácie účinná pre jeden biorozpoznávací element nie je efektívna pre stabilizáciu iných. Vyššie molekulové látky - polyelektrolyty stabilizujú proteíny prostredníctvom elektrostatických interakcií.

Tento koncept stabilizácie proteínov (enzýmov) pri príprave biosenzorov bol rozvinutý v 90- rokoch Gibsonom² a bol úspešne využitý aj dizertantom v kombinácii s enzýmami prípadne mikrobiálnymi bunkami. Kombinácia viacerých polyelektrolytov a polyolov, ktoré výrazným spôsobom zvýšili skladovaciu stabilitu pri laboratórnej teplote (30°C) bola použitá aj v tejto práci. Jedna z kombinácií (inozitol s polyetylénimínom) zvýšila polčas životnosti galaktózového biosenzora takmer o jeden poriadok.

Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie ako zložky médií pre baktérie, galaktózaoxidáza, dialyzačná membrana a ďalšie boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda ($3 \square \text{S}$). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko).

Výsledky a diskusia

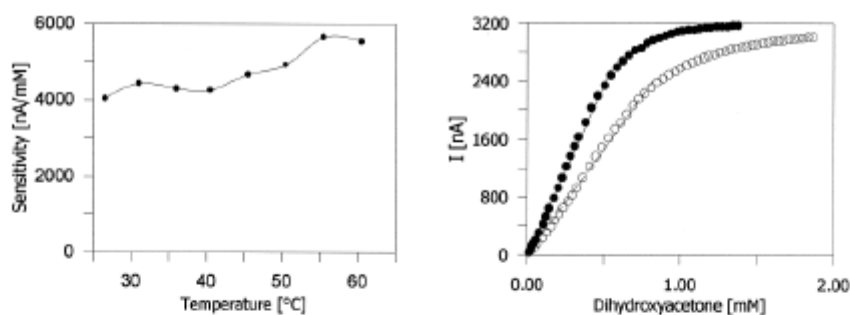
Na zvýšenie citlivosti meraní bol použitý pomocný enzým HRP, ktorý slúžil na odstránenie peroxidu vodíka produkovaného GalOD. Pridaný mediátor ferocén zase s vysokou efektivitou regeneroval HRP na elektróde, čo dovoľovalo využiť nízky takmer ideálny pracovný potenciál (0 mV vs. SCE). Elektróda bola ferocénom modifikovaná z jeho roztoku v

parafrinovom oleji, čo potlačilo kapacitný prúd a teda aj šum merania, čo znížilo aj detekčný limit.

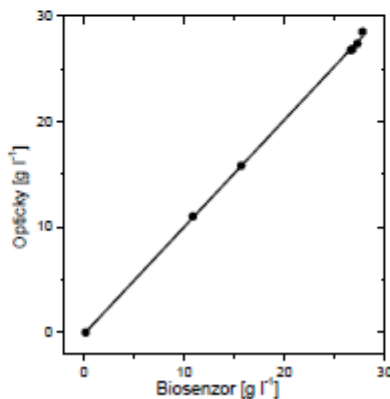
Dihydroxyacetón (DHA) sa používa pri výrobe samoopaľovacích krémov, prípadne ako nutričný doplnok. DHA je možné vo vysokých výťažkoch pripraviť oxidáciou glycerolu viacerými kmeňmi octových baktérií (*Gluconobacter* alebo *Acetobacter*) a tento biotransformačný proces bol off-line monitorovaný galaktózaoxidázovými biosenzormi. Biosenzor bol veľmi citlivý na svoj analyt s vysokou stabilitou voči zvýšenej teplote s detekčným limitom $0,8 \mu\text{M}$ a lineárnym rozsahom po $0,5 \text{ mM}$ (Obr. 1).

Táto metóda umožňuje vzorku výrazne nariediť, čo znižuje koncentrácie možných interferujúcich látok.

Pri ampérometrickom stanovení DHA je citlivosť na glycerol len 0,2% citlivosti na DHA, čím počiatočná koncentrácia glycerolu 50 g l^{-1} dáva koncentračný ekvivalent DHA $0,2 \text{ g l}^{-1}$. V prípade ampérometrického biosenzora bola korelácia vysoká s $R^2=0,999$ (Obr. 2).



Obr.1.: Odozva biosenzora na zvýšenie teploty počas analýzy (vľavo) a typická kalibračná krivka v dvoch rozličných typoch tlmivého roztoku (napravo).



Obr.2.: Validácia biosenzora referenčnou analytickou metódou s využitím spektrofotometrického stanovenia.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Whittaker J.W., *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2347.
- 2 Gibson T.D., Hulbert J.N., Parker S.M., Woodward J.R., Higgins I.J., *Biosens. Bioelectron.* **1992**, 7, 701.

Monitorovanie etanolovej fermentácie mikrobiálnym biosenzorom

Tkáč Ján*, Nahálka Jozef, Gemeiner Peter

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra

[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)

Kľúčové slová

Biosenzor, *Gluconobacter oxydans*, ampérometrické stanovenie, etanol, biotechnologický process

Úvod

Trh biosenzorov v roku 2003 bol podľa dvoch nezávislých zdrojov od 6,1 po 7,3 miliardy amerických dolárov s rastom na 10 miliárd v roku 2007 alebo 8,2 miliardy v roku 2009.¹ Ďalší zdroj odhaduje cenu trhu biosenzorov na 6,1 miliardy v roku 2012.² Trhmi, kde sa biosensory uplatňujú sú vo farmaceutickom/biotechnologickom priemysle, potravinárskom a vo vojenskom sektore.^{3,4}

Mikrobiálne bunky sa s obľubou používajú pri príprave biosenzorov, najmä kvôli tomu, že enzýmy nemusia byť pracne izolované, enzýmy sa nachádzajú vo svojom prirodzenom prostredí a kofaktory a aktivátory sú taktiež prítomné. To z nich robí veľmi lacnú alternatívu k enzýmovým biosenzorom. Ich nevýhodou je však nízka selektivita stanovenia kvôli lokalizácii celej sady rôznych (interferujúcich) enzýmov a pomalá odozva kvôli prítomnosti difúzných bariér (cytoplazmatická membrána). Aj kvôli tomu sa často využívajú v aplikáciách, v ktorých je z tejto nevýhody razom veľká výhoda napr. stanovenie sumárnych parametrov (biologická spotreba kyslíka, asimilovateľné sacharidy atď.), prípadne konštrukcia biopalivových článkov. V tejto práci sú využité najmä bakteriálne bunky *Gluconobacter oxydans*, vyznačujúce sa unikátnou organizáciou respiračného reťazca s lokalizáciou viacerých dehydrogenáz v cytoplazmatickej membráne s orientáciou aktívnych centier enzýmov smerom k periplazme. Takáto orientácia aktívnych centier enzýmov je výhodná pri konštrukcii biosenzorov s rýchlou odozvou a vysokou citlivosťou stanovení. Takýto biosenzor bol využitý na monitorovanie etanolu počas biotechnologického procesu.

Materiály a metódy

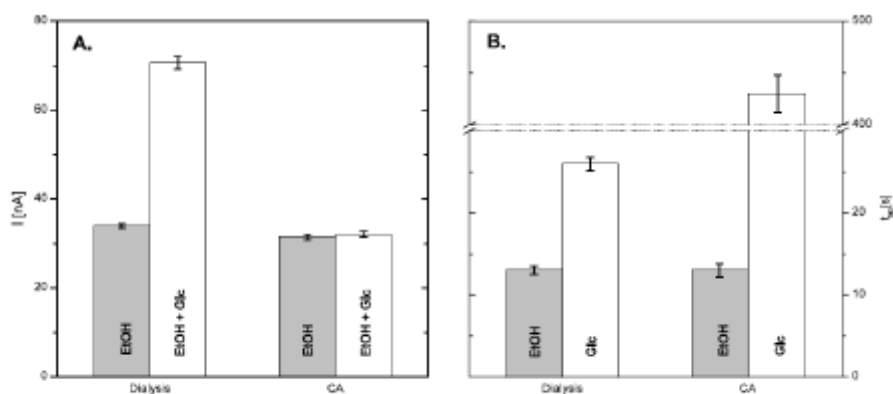
Všetky použité chemikálie ako celulóza cetát, dialyzačná membrána a zložky médií pre baktérie boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko).

Výsledky a diskusia

Typická nevýhoda mikrobiálnych biosenzorov – ich nízka selektivita je v literatúre riešená viacerými prístupmi, ako napr. indukciou, prípadne inhibíciou transportných/metabolických dráh; inkorporáciou plazmidov na vnesenie vhodných enzýmov; prípadne výberom vhodného prevodníka; či pH merania.⁵ Ďalšie nové techniky, ako uvoľnenie kofaktorov z bunky, nadexpresia enzýmov bunke prirodzených alebo cudzích, prípadne zvýšenie afinity analytu boli tiež popísané. Tieto techniky sú viac, či menej časovo a technicky náročné, a preto predmetom jednej našej štúdie bolo využitie jednoduchého a univerzálneho princípu – použitie membrány so „size-exclusion“ efektom (priepustná pre molekuly s molekulovou veľkosťou do 100 Da) pripravenej z acetátu celulózy. Výhodou tejto metódy je, že

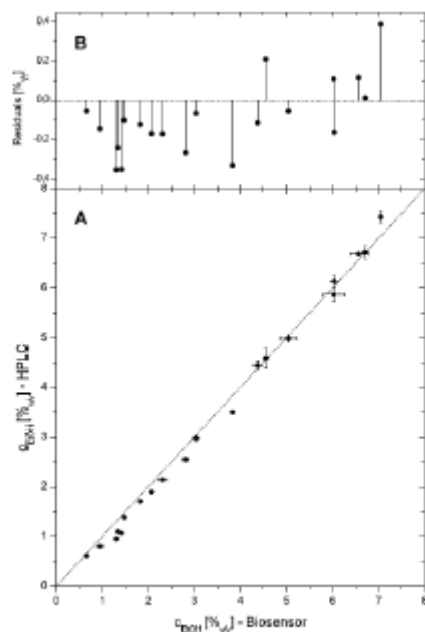
mikroorganizmy nie je nutné „upraviť“ akýmkoľvek spôsobom, ale využijú sa intaktné nemodifikované bunky, ktoré sa len prekryjú acetát celulózovou membránou, čo je veľmi jednoduchá, cenovo nenáročná a rýchla procedúra (40 min). Takto pripravený biosenzor bol porovnávaný s biosenzorom, kde vrstva buniek bola prekrytá len dialyzačnou membránou (priepustná pre molekuly do 12 kDa). Analýza výsledkov odhalila, že acetát celulózová membrána nie je limitujúcim faktorom pri difúzii etanolu (EtOH, 46 Da), zatiaľ čo difúzia glycerolu (Gly, 92 Da) bola ovplyvnená súdiac podľa zmeny faktora citlivosti EtOH/Gly z hodnoty 183 (dialyzačná membrána) na hodnotu 1367 (acetát celulózová membrána) (7,5-násobok) (Obr. 1A). Difúzia glukózy (Glu, 180 Da) bola výraznejším spôsobom limitovaná so zmenou faktoru citlivosti EtOH/Glu z hodnoty 9,3 na 541 (58-násobok).

Typický čas odozvy 13 s (Obr. 1B) a detekčný limit pod 1 μ M bol lepší alebo porovnateľný s najlepšimi enzýmovými biosenzormi na stanovenie etanolu.



Obr.1.: Selektivita stanovenia etanolu v prítomnosti glukózy mikrobiálnym biosenzorom s dialyzačnou alebo acetát celulózovou vonkajšou membránou (A) čas odozvy takéhoto biosenzora (B).

Analýza etanolu biosenzorom bola porovnaná s referenčnou analytickou metódou (HPLC) na vzorkách z etanolovej fermentácie s veľmi dobrou zhodou ($R^2=0,996$, $b=1,06$) i napriek tomu, že v počiatočných hodinách fermentácie bola glukóza prítomná v koncentráciách až 200 g l⁻¹ (Obr.2). Mikrobiálny biosenzor mal ďalšiu výhodu oproti enzýmovým biosenzorom, že jeho citlivosť môže byť modulovaná do značnej miery substrátom, ktorý je na prípravu mikrobiálnych buniek použitý, čo môže byť veľmi účinným nástrojom hlavne pri detekcii neobvyklých napr. chirálnych substrátov.⁶



Obr. 1.: Validácia biosenzora referenčnou analytickou metódou – HPLC.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Luong J.H.T., Male K.B., Glennon J.D., *Biotechnol. Adv.* **2008**, 26, 492.
- 2 <http://www.azonano.com/news.asp?newsID=8571>
- 3 Lim M., Ye H., Panoskaltsis N., Drakakis E.M., Yue X.C., Cass A.E.G. a kol., *Biotechnol. Adv.* **2007**, 25, 353.
- 4 Ahmed M.U., Hossain M.M., Tamiya E., *Electroanal.* **2008**, 20, 616.
- 5 Racek, J., **1994**. Cell-Based Biosensors. Technomic Publishing Co, Lancaster. Riedel K., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1991**, 25, 19.
- 6 Gao K.L., Wei D.Z., *Appl. Microb. Biotechnol.* **2006**, 70, 135.

Monitorovanie skvasiteľných sacharidov počas biotechnologického procesu

Tkáč Ján*, Nahálka Jozef, Gemeiner Peter

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava
Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2,
SK-94976 Nitra
[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)

Kľúčové slová

Biosenzor, *Gluconobacter oxydans*, ampérometrické stanovenie, skvasiteľné sacharidy, biotechnologický proces

Úvod

Biosenzory na rozdiel od klasickej inštrumentálnej techniky analytického laboratória využívajú biorozpoznávacie molekuly, čo je koncept, ktorý má svoje výhody a nevýhody. Výhodou je zvýšená selektivita stanovenia a väčšinou aj rýchlosť meraní s jednou veľkou nevýhodou – problémom so stabilitou biorozpoznávacích elementov. Tento fenomén pútal veľkú pozornosť od počiatku konštrukcie biosenzorov. Skladovacia (biosenzor nie je používaný) a operačná (počas používania biosenzora) stabilita do značnej miery určuje užitočnosť týchto zariadení. Inaktivácia biorozpoznávacích elementov je komplexným fenoménom s celkovou zmenou 3-D štruktúry, čo sa nakoniec prejaví v zmene štruktúry biorozpoznávacej časti. Značnou komplikáciou je, že technika stabilizácie účinná pre jeden biorozpoznávací element nie je efektívna pre stabilizáciu iných. V praxi sa tento problém rieši väčšinou systémom pokus/omyl využitím viacerých prístupov ako napr. výber vhodnej imobilizačnej metódy (kovalentná, adsorpcia, prekrytie membránou, inkorporácia do vhodného matrixu prípadne zosietenie)^{1,2}, aplikácia proteínového inžinierstva (cielená evolúcia, prídavok peptidového reťazca, mutagenéza, „rational design“)³, využitie rozličných stabilizujúcich molekúl (polyelektrolytov a polyolov) a najnovšie aj využitie širokej palety nanoštruktúr (nanočastice, nanovlákná/nanorúrky, mezoporézny materiál)⁴.

Pravdepodobná funkcia nízkomolekulových aditív (sacharidy, polyoly) je v ich interakcii so solvatačným obalom proteínov a zvýšením povrchového napätia vody, čo má za následok zníženie pravdepodobnosti denaturácie proteínu (zvýšenie povrchu proteínu), keďže toto je energeticky nevýhodný stav. Vyššie molekulové látky - polyelektrolyty stabilizujú proteíny prostredníctvom elektrostatických interakcií. Tento koncept stabilizácie proteínov (enzýmov) pri príprave biosenzorov bol rozvinutý v 90-rokoch Gibsonom⁵ a bol úspešne využitý aj dizertantom v kombinácii s enzýmami prípadne mikrobiálnymi bunkami. V tejto práci boli nevýhody využitia relatívne nízko stabilných enzýmov odstránené využitím mikrobiálnych buniek, ktoré boli ešte dodatočne stabilizované ďalšími pomocnými látkami počas skladovania biosenzora.

Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie ako zložky médií pre baktérie, dialyzačná membrána a ďalšie boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 □S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko).

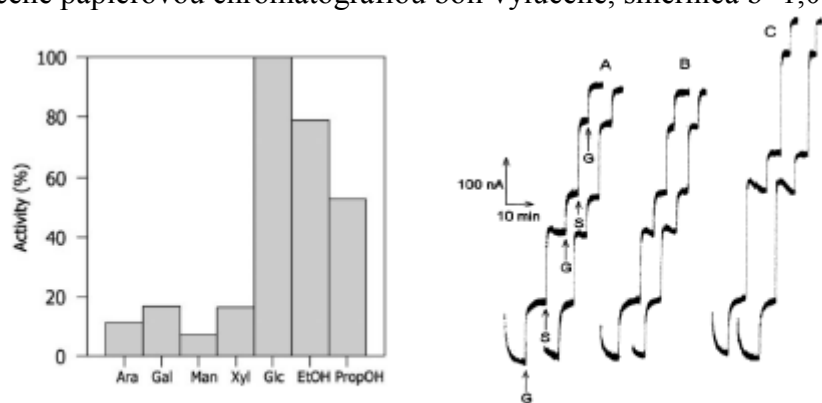
Výsledky a diskusia

Relatívne veľkou výzvou bola analýza skvasiteľných (utilizovateľných) sacharidov vo vzorkách odobratých z fermentácie lignocelulóзовého hydrolyzátu. Je to dané tým, že

lignocelulózový hydrolyzáť, ktorý je obnoviteľným zdrojom na prípravu alternatívnych zdrojov energie (bioetanol)⁶, je veľmi komplexnou zmesou látok obsahujúcou okrem sacharidov aj mnohé inhibítory zo skupiny aromatických aldehydov. Tieto inhibítory je pri úspešnom použití enzýmových biosenzorov nutné pracne odstrániť úpravou vzorky s následnou separáciou napríklad kvapalinovou chromatografiou.⁷ Aj preto boli veľmi často na analýzu sacharidov v lignocelulózovom hydrolyzáte využívané neselektívne metódy ako stanovenie redukujúcich sacharidov. Baktérie *G. oxydans* sú kvôli prítomnosti viacerých enzýmov schopné detoxikovať tieto inhibítory oxidatívne.⁸ Nízka citlivosť (50 nA mM^{-1}) mikrobiálneho *G. oxydans* biosenzora na báze stanovenia kyslíka bola vylepšená využitím ferrikyanidu (hexakynoželezitan draselný) ako mediátora. Vyššia citlivosť bola skutočne nutná, pretože koncentrácia sacharidov prítomných vo vzorkách lignocelulózového hydrolyzátu je nízka ($1\text{--}30 \text{ g l}^{-1}$).

Citlivosť sa podarilo výrazným spôsobom zvýšiť ($20\times$), čo umožnilo využiť biosenzor aj na analýze nízkych koncentrácií sacharidov s detekčným limitom v rozmedzí od $0,9\text{--}19,3 \text{ mg l}^{-1}$ v závislosti od sacharidu. Navyše bolo zistené, že aj keď prítomnosť lignocelulózového hydrolyzátu mierne znižuje odozvu biosenzora, tento pokles citlivosti je úplne reverzibilný a po výmene roztoku v meracej nádobke bola citlivosť biosenzora na glukózu rovnaká ako pred prídavkom vzorky hydrolyzátu. Na kompenzáciu tejto inhibície bola použitá metóda štandard-vzorka-štandard. Reprodukovateľnosť meraní vzorky (priemerná RSD $4,0\%$) ako aj operačná stabilita biosenzora bola veľmi dobrá (Obr. 1).

Skladovacia stabilita bola zvýšená použitím trehalózy ako polyolu. Výsledky analýzy vzoriek lignocelulózového hydrolyzátu boli vyjadrené ako arabinózový ekvivalent, keďže tento sacharid nie je skvasiteľný a je prítomný v rovnakej koncentrácii počas celého bioprocesu. Výsledky analýzy biosenzorov boli vo veľmi dobrej zhode s výsledkami získanými referenčnou metódou (papierová chromatografia) s korelačným koeficientom $0,968$ (všetky vzorky, smernica $b=1,11$) alebo $0,997$ (vzorky s nemonotónnym poklesom koncentrácie sacharidov určené papierovou chromatografiou boli vylúčené, smernica $b=1,06$).



Obr.1.: Odozva biosenzora na rozličné substráty, vrátane skvasiteľných sacharidov (vľavo) a typický reálny záznam merania vzoriek (napravo).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 D'Souza S.F., *Curr. Sci.* **1999**, 77, 69.
- 2 Chaniotakis N.A., *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 89.
- 3 O'Fagain C., *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, 33, 137.
- 4 Kim J., Grate J.W., Wang P., *Chem. Eng. Sci.* **2006**, 61, 1017.

- 5 Gibson T.D., Hulbert J.N., Parker S.M., Woodward J.R., Higgins I.J., *Biosens. Bioelectron.* **1992**, 7, 701.
- 6 Xu Q., Singh A., Himmel M.E., *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, 20, 364.
- 7 Persson P., Andersson J., Gorton L., Larsson S., Nilvebrant N.O. a kol., *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5318. Buchert J., Niemela K., Puls J., Poutanen K., *Proc. Biochem.* **1990**, 25, 176.
- 8 Buchert J., Niemela K., *J. Biotechnol.* **1991**, 18, 1.

Monitorovanie vzniku 1,3-propándiolu z glycerolu počas biotechnologického procesu mikrobiálnym biosenzorom

Tkáč Ján*, Katrlík Jaroslav, Šefčovičová Jana, Gemeiner Peter

Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-94976 Nitra

[*Jan.Tkac@savba.sk](mailto:Jan.Tkac@savba.sk)

Kľúčové slová

Biosenzor, *Gluconobacter oxydans*, ampérometrické stanovenie, 1,3-propándiol, biopalivá

Úvod

Baktéria *Gluconobacter oxydans* je schopná veľmi vysokými rýchlosťami a nešpecificky oxidovať širokú paletu organických látok ako cukry, alkoholy a polyoly (napr. aktivita fruktózadehydrogenázy oxidovať cca 3 000 molekúl substrátu za 1 s). Široké spektrum možných analytov je dané jednak viacerými enzýmami, ktoré sú v cytoplazmatickej membráne prítomné a jednak tým, že viacero enzýmov je nešpecifických (napr. alkoholdehydrogenáza alebo aldózádehydrogenáza). Okrem toho lokalizácia týchto redoxných enzýmov v cytoplazmatickej membráne s orientáciou aktívnych centier smerom do periplazmatického priestoru je veľmi vítanou vlastnosťou pri príprave biosenzorov. Je to dané tým, že periplazmatický priestor je ľahko prístupný difúzii nízkomolekulových látok smerom k enzýmom (cez poriny s veľkosťou umožňujúcou priepustnosť látok do 1000 Da) a produktov enzymatickej reakcie smerom z bunky von. Táto črta umožňuje konštrukciu mikrobiálnych biosenzorov s rýchlosťami odozvy a inými parametrami porovnateľnými s enzýmovými biosenzormi.¹ Okrem toho, aktívne miesto enzýmov je možné regenerovať nízkomolekulovými redoxnými látkami (mediátormi), čo zvyšuje citlivosť stanovení v porovnaní s konfiguráciou bez využitia mediátora (meranie respirácie baktérie detekciou v zmene v koncentrácii kyslíka). V tejto práci prezentujeme mikrobiálny biosenzor na stanovenie 1,3-propándiolu, čo je vychodisková surovina pri produkcii viacerých polymérov, počas biotechnologického procesu biosenzorom.

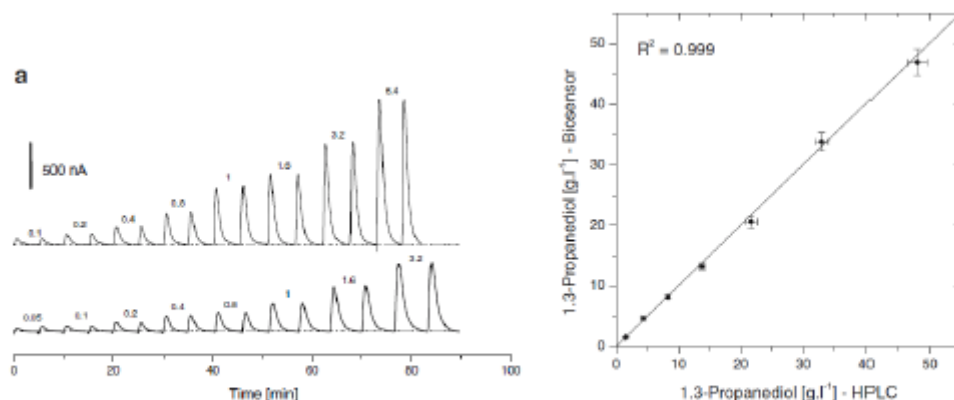
Materiály a metódy

Všetky použité chemikálie ako galaktózaoxidáza, dialyzačná membrána a ďalšie pomocné látky boli najvyššej možnej čistoty, zakúpené v Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Pri všetkých experimentoch sa používala sterilná, redestilovaná a filtrovaná voda (3 $\square$ S). Elektrochemické merania, vrátane procedúr spojených s regeneráciou zlatých povrchov sa uskutočnilo na laboratórnom potenciostate/galvanostate (Ecochemie, Holandsko).

Výsledky a diskusia

Výhoda využitia mikrobiálneho biosenzora sa naplno potvrdila pri monitorovaní 1,3 – propándiolu (1,3-PD), pretože dosiaľ nebol publikovaný žiaden enzýmový biosenzor na stanovenie tohto analytu (neboli informácie o tom, že by niektorý z enzýmov tento analyt vedel oxidovať). Pri jeho konštrukcii sa využila nešpecifita buniek *G. oxydans* oxidovať viaceré štruktúrne podobné molekuly. 1,3-PD je komerčne veľmi zaujímavý produkt, ktorý môže slúžiť na produkciu plastov – polyesterových živíc a vlákien so svetovou produkciou 1 000 t h⁻¹.² V 90-rokoch existovali tri technológie na prípravu tohto polyméru, dve z nich založené na chemickom princípe a jeden využívajúci glukózu ako prekursor.³ V súčasnosti je veľký záujem nahradiť klasické chemické technológie založené na petrochémií novými „zelenými“ technológiami s využitím obnoviteľných zdrojov energie.

Výťažok 1,3-PD z glukózy je nižší ako z glycerolu, ktorý je odpadnou surovinou v procese výroby bionafty a je teda veľmi lacnou surovinou s veľmi priaznivým ekonomickým dopadom na prípravu 1,3-PD.⁴ Na efektívne monitorovanie procesu transformácie glycerolu na 1,3-PD boli využité biosenzory na monitorovanie ako substrátu (glycerolu), tak i produktu (1,3-PD). V prípade monitorovania 1,3-PD boli využité dva prístupy založené na mediátoroch – rozpustný mediátor ferikaynid a redoxný polymér na báze komplexu Os. Druhý prístup je skutočne unikátnym vo svetovom meradle a po prvý krát bol popísaný kolegom Voštiarom počas stáže v Lunde.⁵ Tento koncept bol neskôr použitý aj na redoxné zosietenie ďalších bakteriálnych buniek s lokalizáciou enzýmov smerom do periplazmatického priestoru.⁶ Unikátnosť tohto prístupu spočíva v elektrickom prepojení intaktných buniek s elektródou týmto redoxným mediátorom, čím sú zabezpečené vysoké prúdové hustoty porovnateľné s konfiguráciou biosenzora pracujúceho s rozpustným mediátorom. Takto pripravené zariadenie je jednoduchšie v porovnaní s biosenzorom využívajúcim rozpustný mediátor s možnosťou integrácie pri konštrukcii jednoduchších a miniaturizovateľných biopalivových článkov a biosenzorov. V práci bolo postulované na základe praktických experimentov a teoretických informácií, že enzýmami zodpovednými za oxidáciu 1,3-PD sú alkoholdehydrogenáza a aldehyddehydrogenáza. Tieto dva enzýmy z *G. oxydans* boli purifikované⁷ a môžu v budúcnosti slúžiť na prípravu enzýmových biosenzorov na stanovenie 1,3-PD. Keďže však enzýmová aktivita glyceroldehydrogenázy je výrazne nižšia v porovnaní s alkoholdehydrogenázou (cca 180x), glycerol so stanovením 1,3-PD neinterferuje ani v prípade použitia buniek ako biorozpoznávacieho elementu. Biosenzor bol veľmi citlivý s detekčným limitom 0,4 mg l⁻¹ s lineárnym koncentračným rozsahom pokrývajúcim takmer 4 poriadky. Stabilita biosenzora bola vynikajúca, keď aj po 140 h kontinuálneho používania biosenzora výsledky stanovenia 1,3-PD boli vysoko reprodukovateľné. Validácia biosenzora referenčnou analytickou metódou (HPLC) dopadla veľmi dobre s korelačným koeficientom R²=0,998 a smernicou b=1,01 (Obr. 1).



Obr.1.: Reálny záznam analýzy 1,3-propándiolu dvomi rozličnými konfiguráciami biosenzora (vľavo) a validácia biosenzora s metódou HPLC (napravo).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- 1 Ikeda T., Kurosaki T., Takayama K., Kano K., Miki K., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 192.
- 2 Haas T., Jaeger B., Weber R., Mitchell S.F., King C.F., *Appl. Catal. A* **2005**, 280, 83.
- 3 Nakamura C.E., Whited G.M., *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 454.

- 4 Hirschmann S., Baganz K., Koschik I., Vorlop K.-D., *Landbauforschung Volkenrode* **2005**, 55, 261. Rahmat N., Abdullah A.Z., Mohamed A.R., *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, 14, 987. Willke T., Vorlop K., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, 110, 831.
- 5 Vostiar I., Ferapontova E.E., Gorton L., *Electrochem. Commun.* **2004**, 6, 621.
- 6 Timur S., Haghighi B., Tkac J., Pazarlıoğlu N., Telefoncu A., Gorton L., *Bioelectrochem.* **2007**, 71, 38.
- 7 Adachi O., Tayama K., Shinagawa E., Matsushita K., Ameyama M., *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42, 2045.
- Adachi O., Tayama K., Shinagawa E., Matsushita K., Ameyama M., *Agric. Biol. Chem.* **1980**, 44, 503.

Možnosti zhodnotenia banských a priemyselných odpadov na pigmenty

Marián Schwarz^{1,2}, Peter Sudovský¹, Petra Pulišová³

¹ *Fakulta ekológie a environmentalistiky, Technická univerzita vo Zvolene, T. G. Masaryka 24, SK-96053 Zvolen, Slovensko*

² *Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko*

³ *Ústav anorganické chemie AV ČR, v.v.i., Husinec-Řež č.p. 1001, CZ-250 68 Husinec-Řež, Česká Republika*

schwarz@vsld.tuzvo.sk

Kľúčové slová

Pigmenty, priemyselný odpad, AMD

Úvod

V súčasnosti predstavujú odpady z banskej a priemyselnej činnosti závažný celosvetový ekologický problém, pretože svojím množstvom a zložením ohrozujú životné prostredie. Často sú ukladané na skládky alebo odkaliská vo veľkých množstvách, veternou eróziou dochádza k značnému rozptylu pevného aerosólu do ovzdušia, dažďová voda a kyslé banské výtoky (ďalej AMD. z angl. Acid Mine Drainage) zvyšujú mobilitu toxických ťažkých kovov do vodného prostredia (Druschel, G. K. a kol., 2004) a riziko nedostatočne vybudovaných hrádzi v prípade extrémnych podmienok predstavuje hrozbu pre obyvateľstvo v blízkom okolí. Na Slovensku patria k takýmto lokalitám napr. Slovinky, Horná Ves, Štiavnický rudný revír, skládky nebezpečného priemyselného odpadu z výroby oxidu hlinitého v Žiari na Hronom, z výroby niklu v Seredi a mnohé ďalšie.

Jednou z možností využitia takýchto odpadov predstavuje výroba pigmentov, po ktorých sa svetový dopyt zvyšuje. Tieto odpady často predstavujú významný zdroj surovín, ktorých sekundárne zhodnotenie pomáha riešiť naznačené environmentálne problémy. Pigmenty tvoria farebné zlúčeniny nerozpustné vo vode a v spojivách, ktoré dodávajú farbu, transparentnosť, mechanickú tvrdosť a odolnosť médiu, v ktorom sú rozptýlené (Bendiganavale, 2008; Völz, 2011). Vhodnosť využitia priemyselných a banských odpadov pre takéto účely si však vyžaduje dokonalé štúdium ich chemických, mechanických, protikoroziívnych a iných fyzikálnochemických vlastností. Náš príspevok uvádza predbežné výsledky elementárnej, termálnej, fázovej a morfolologickej analýzy odpadových produktov uskutočnených v spolupráci s Ústavom anorganické chemie, AV ČR, v Řeži u Prahy.

Materiál a metódy

Ako vstupné suroviny na syntézu pigmentov boli analyzované:

1) Banské odpady: hydratované oxidy Fe^{+3} : prírodné AMD-produkty zo starých štôlní a odkalísk (označené ako H, V - vzorky zo starých štôlní v blízkosti Belianskej vodnej nádrže a Dolnohodrušskej vodnej nádrže; SE - vzorka z odkaliska Sedem Žien, ktorá sa nachádza v blízkosti Banskej Belej, SM - vzorka z odkaliska v blízkosti Smolnícka Huta severo-východne od ložiska medenej rudy).

2) Priemyselné odpady: označené ako LU - lúženec z haldy po výrobe Ni v Seredi a RMB - hnedý kal z odkaliska po výrobe oxidu hlinitého v Žiari nad Hronom.

Elementárna analýza surovín bola uskutočnená metódou ICP-ES po rozklade v kyselinách (HNO_3 , HClO_4 , HF a rozpusteného zvyšku v HCl) – analyzované v ACME Analytical Laboratories Ltd., Vancouver.

Vzorky boli mleté na guľovom mlyne FRITSCH Pulverisette 6 (výrobca FRITSCH GmbH, Germany, objem mlecej misky 150 cm^3 , priemer guľ 8 mm).

Termálna gravimetrická analýza (TG) a diferenciálna termálna analýza (DTA) boli uskutočnené na prístroji SETARAM SET-SYS Evolution-16-MS, výrobca SETARAM Instrumentation. Ohrev vzorky pri atmosférických podmienkach sa uskutočnil v intervale 20–1100 °C rýchlosťou $10 \text{ °C} \cdot \text{min}^{-1}$; množstvo vzorky cca 20 mg.

Fázová analýza sa uskutočnila na práškovom rtg difraktometri PANalytical X'PertPRO MPD (výrobca PANalytical B.V.), vybavenom konvenčnou röntgenovou trubicou (CoK α radiation, 40 kV, 30 mA, line focus) a viackanálovým detektorom X'Celerator s anti-scatter štítom. Meranie sa robilo v intervale od 10 do 95° 2θ s posunom o 0,0167° a s časovým intervalom 1050 sekúnd. Použilo sa klasické Bragg-Brentanovo usporiadanie s fixnou divergenčnou clonou a protirozptylovou clonou. Kvalitatívna analýza bola vykonaná s balíčkom software HighScorePlus ods PANalytical, Holandsko, verzia 3.0d) a JCPDS PDF-2 databázy.

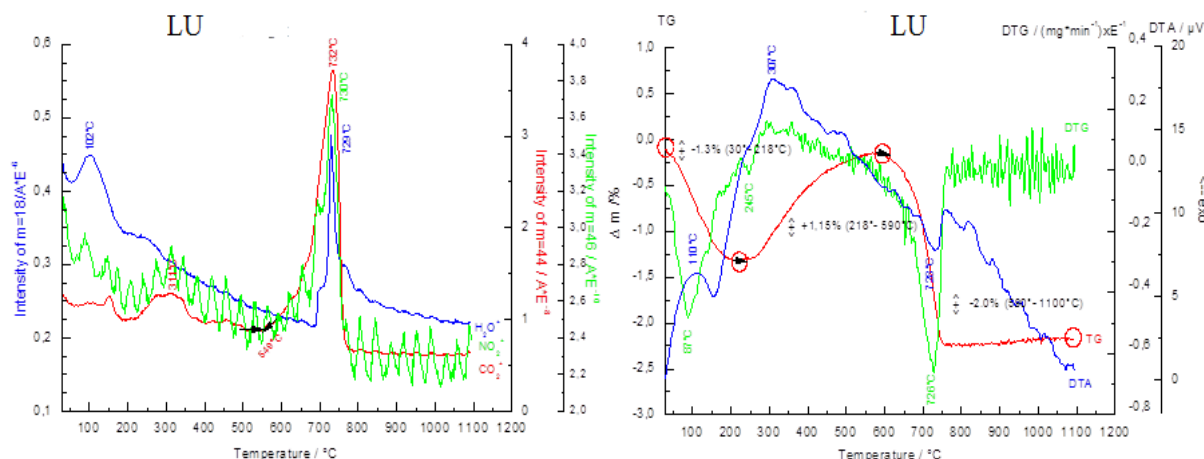
Štúdium morfológie bolo uskutočnené na skenovacom elektrónovom mikroskope (SEM) JEOL JSM-6510LV (výrobca JEOL Ltd.), vybavenom EDX (Energy Dispersive X-ray) a WDX (Wavelength Dispersive X-ray). Vzorky boli pred mikroskopovaním potiahnuté tenkou vodivou vrstvou zliatiny Au-Pd. Tento mikroskop umožňuje meranie v sekundárnych a späťne odrazených elektrónoch. Mikroskop pracuje ako vo vysokovákuovom, tak aj nízkovákuovom režime. Nízkovákuový režim umožňuje pozorovanie nevodivých vzoriek bez nutnosti pokovovania ich povrchu. K mikroskopu je pripojený EDS detektor SSD INCA od firmy Oxford Instruments, ktorý deteguje prvky od bóru po urán.

Výsledky a diskusia

Výsledky elementárnej analýzy potvrdili, že hlavnou zložkou banských odpadov (vzorky H, V, SE a SM) je železo s obsahom 42,3–47,3 %, podobne ako v prípade priemyselného odpadu LU, kde železo tvorilo 51,5 % podiel. U vzorky RMB bol podiel železa iba 16 % a majoritný podiel tvoril vápnik s obsahom 17,3 %.

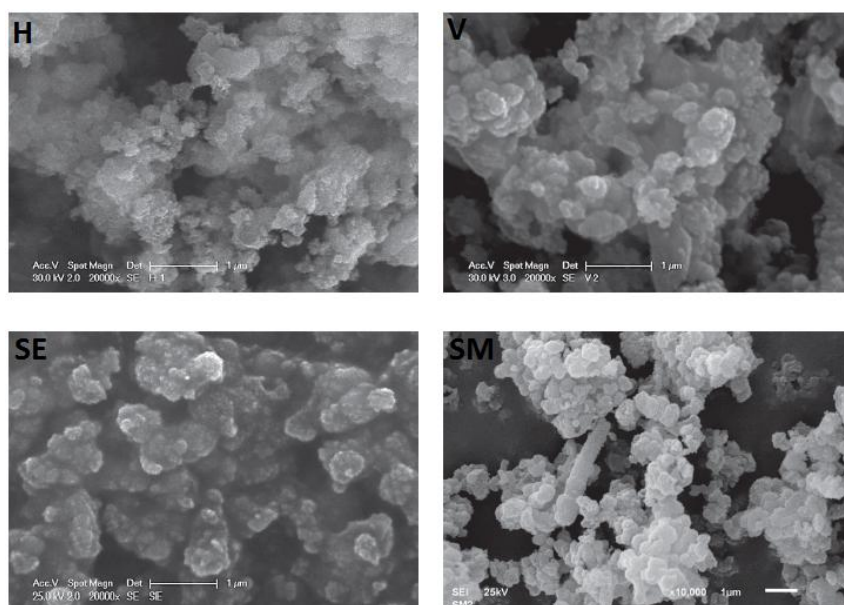
Fázová analýza vzoriek uskutočnená pred a po termálnej analýze umožňuje pozorovanie materiálových zmien vyvolaných pôsobením tepla. Pri vzorkách H, V, SE fázové zloženie po termálnej analýze preukazuje prítomnosť hematitu, ktorý pravdepodobne vznikol transformáciou (dehydroxyláciou) fáz goethitu, akaganéitu, schwertmanitu a ferrihydritu pôsobením tepla (Bigham, J. M., a kol. 1996), čo je typické mineralogické zloženie usadenín tvoriacich sa z kyslých banských výtokov (Gagliano W. B. a kol., 2004).

Termogravimetrickou (TG) a diferenciálnou termálnou analýzou (DTA) bolo zistené, že u všetkých sledovaných vzoriek k prvým poklesom hmotnosti dochádza v intervale teplôt od 110 – 152 °C, pričom v prípade LU a RMB ako priemyselných odpadov je to iba 1,3; resp. 7,2 % a v prípade banských odpadov sú to podstatne vyššie hodnoty (17,5–26 %). Uvedený pokles hmotnosti možno pripočítať na vrub straty fyzikálne viazanej vody v materiáli, ďalšie termické premeny pri vyšších teplotách môžu v prípade banských odpadov súvisieť s dehydroxylačnými reakciami a uvoľňovaním CO_2 a NO_x . Príklad TG a DTA analýzy vzorky priemyselného odpadu lúženca uvádza obr. 1. V tomto prípade je proces transformácie ukončený cca pri teplote 750 °C a celková zmena hmotnosti až do 1100 °C je relatívne nízka a neprevyšuje 2,1 %, na rozdiel od vzorky RMB, kde celková zmena hmotnosti dosiahla 23,1 % do teploty 780 °C, kedy bola tepelná transformácia ukončená.



Obr. 1 DTA/TG analýza vzorky LU

Morfológia vzoriek H,V SE, SM študovaná pomocou SEM je uvedená na obr. 1. Z obrázku je zrejmé, že všetky vzorky banských odpadov sú aglomerované do zoskupení s veľkosťou niekoľkých μm .



Obr. 2 SEM analýza vzoriek H, V, SE, SM

Záver

Z uskutočnených experimentov možno usudzovať, že produkty AMD sa dajú termicky transformovať na železité pigmenty (až na konečný hematit) a podľa kalcinačnej teploty, ktorú možno odhadnúť na základe termogravimetrickej analýzy, aj na rôzne odtiene. V tejto oblasti sa môžu v budúcnosti uplatniť aj mechanochemické transformácie (reakcie prebiehajúce v tuhej fáze), kde bude potrebné podrobne preskúmať experimentálne podmienky. Okrem pigmentov v prípade vhodnej farebnosti v náterových hmotách je však možné odpady z banskej a priemyselnej činnosti využiť aj v iných oblastiach, napr. ako zdroje ďalších cenných surovín, ako adsorbenty, katalyzátory, regulátory pH, modifikátory pri remediáciách pôd a pod.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (50 %) a vďaka podpore agentúry APVV pri riešení projektu APVV SK-CZ 0139-11 a projektu Ministerstva školstva, mládeže a športu ČR pod číslom 7AMB12SK155 (50 %).

Literatúra

- Bendiganavale, A. K. & Malshe, V. C., 2008: Infrared reflective inorganic pigments. Recent patents on chemical engineering, India-Mumbai, University institute of chemical technology, 67-69.
- Bigham, J. M., Schwertmann, U., Traina, S. J., Winland, R. L., Wolf, M., 1996: Schwertmannite and the chemical modeling of iron in acid sulfate waters, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60 (1996) 2111-2121.
- Druschel, G. K. Baker, B. J., Gihring, T. M., Banfield, J. F., 2004: Acid mine drainage biogeochemistry at Iron Mountain, California, *Geochemical Transactions*, 5 (2004) 13-32.
- Gagliano, W. B., Brill, M. R., Bigham, J. M., Jones, F. S., Traina, S. J., 2004: Chemistry and mineralogy of ochreous sediments in a constructed mine drainage wetland, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68 (2004) 2119-2128.
- Völz, H. G., 2011: Pigments, Inorganic, 1. General. In: Elves B. Ed, 2011: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*,. 7th Completely Revised Edition, Vol. 27, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, ISBN 978-3-527-32943-4

Pozitívna a negatívna ESI IT MSⁿ metyl 6-hydroxyhexanoyl α - a β -L-ramnozidov

Vladimír Pätoprstý^a, Vladimír Kováčik^a, Rina Saksena^b, Roberto Adamo^b, Pavol Kováč^b

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovensko

^bNIDDK, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20892-0815, USA

Kľúčové slová:

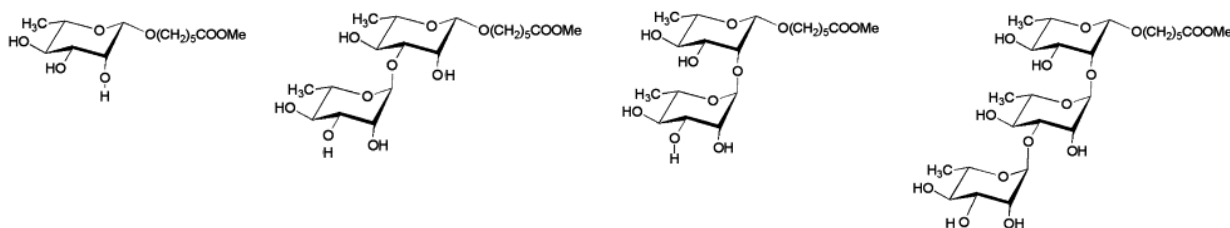
ESI, hmotnostná spektrometria, oligoramnozidy

Úvod

Stratégia na prípravu vakcíny proti patogénu *Bacillus anthracis* je založená na príprave oligosacharidov L-ramnózy na ktoré sa naviaže vhodný nosič a potom synteticky naviažu ďalšie komponenty. Boli pripravené metyl 6-hydroxyhexanoyl glykozidy ako látky vhodné na ďalšiu syntézu. Na sledovanie pokrokov syntézy a čistoty prekursorov sme sa snažili vyvinúť metódu vhodnú na tieto účely a použiteľnú pre rýchlu analýzu. Hmotnostná spektrometria je jedna z takýchto metód, pretože je rýchla, spoľahlivá a vyžaduje malé množstvo vzorky. Navyše, výsledky hmotnostnej spektrometrie sa dajú využiť pre stanovenie štruktúry biomolekúl.

Materiál a metódy

Skúmané látky:



Hmotnostná spektrometria: Na analýzu bol 1 mg látky rozpustený v 1 ml acetonitrilu a vody (1:1, v/v).

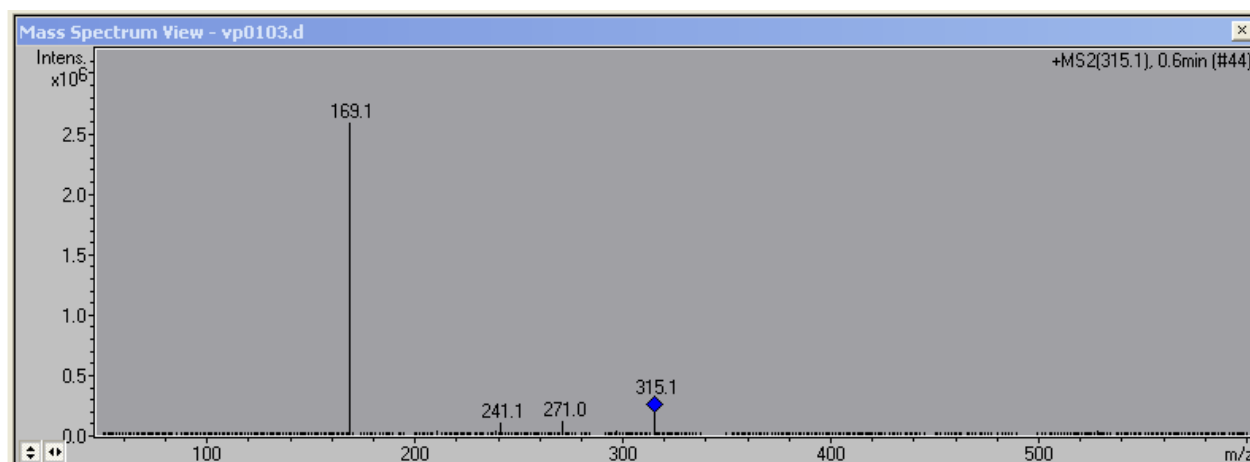
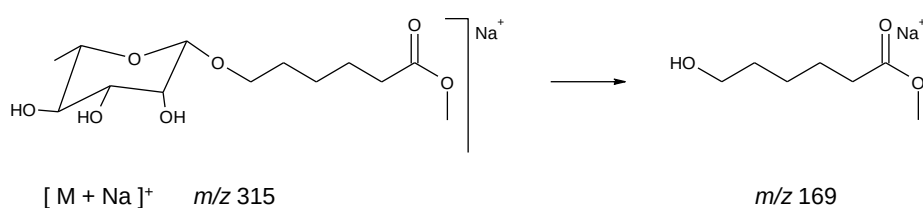
MS²⁻⁴ ESI analýza v pozitívnom i negatívnom móde bola vykonaná na prístroji Esquire 3000 ion-trap mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany).

Vzorka bola zavedená do ESI iónového zdroja prietokom 30 µL/min cez kovovú kapiláru pod vysokým napätím 3.5 kV. Ako sušiaci plyn bol použitý dusík o teplote 250 °C a prietoku 5 L/min,

Na interpretáciu hmotnostných spektier bol použitý softvér Mass Frontier 4.0, modul Fragments and Mechanisms.

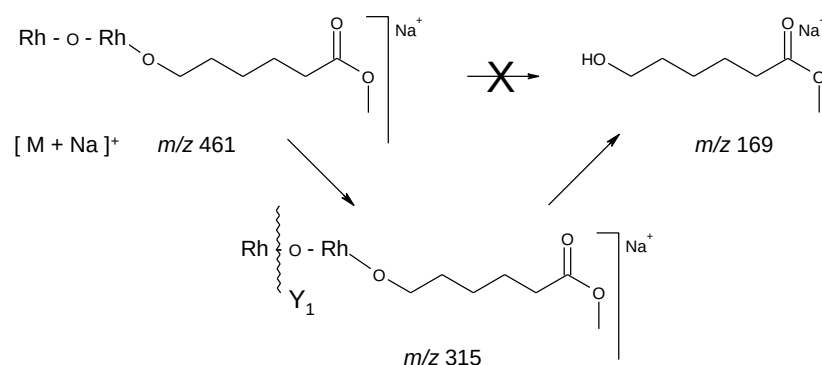
Výsledky a diskusia:

Hmotnostné ESI MSⁿ spektrá α- a β- monoramnozidov sú takmer rovnaké z hľadiska fragmentácie. Malé rozdiely, ktoré sú na spektrách viditeľné však nie sú vhodné na rozlíšenie jednotlivých anomérov. Dominancia v MSMS spektre základného píku m/z 169 je pekným dôkazom aduktu sodíka na metyl 6-hydroxyhexanoyl glykozid. Z kationizovanej molekuly sa uvoľní molekula vody [M+Na-H₂O]⁺, alebo acetaldehydu [M+Na-CH₃HO]⁺ a vzniknú fragmenty s m/z 297 a 271. Spektrá MS³ týchto dvoch druhov vytvárajú sekundárne fragmenty [M+Na-CH₃CHO-CH₂O]⁺ s m/z 241. Odštiepením glykozidu potom dostávame ión m/z 169.

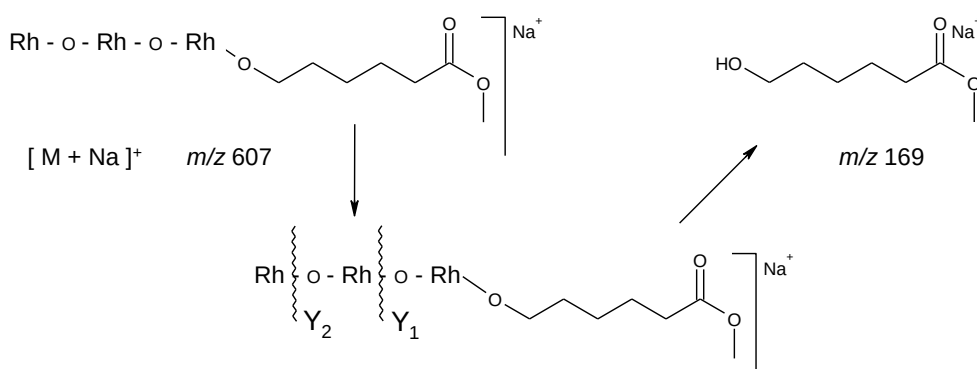


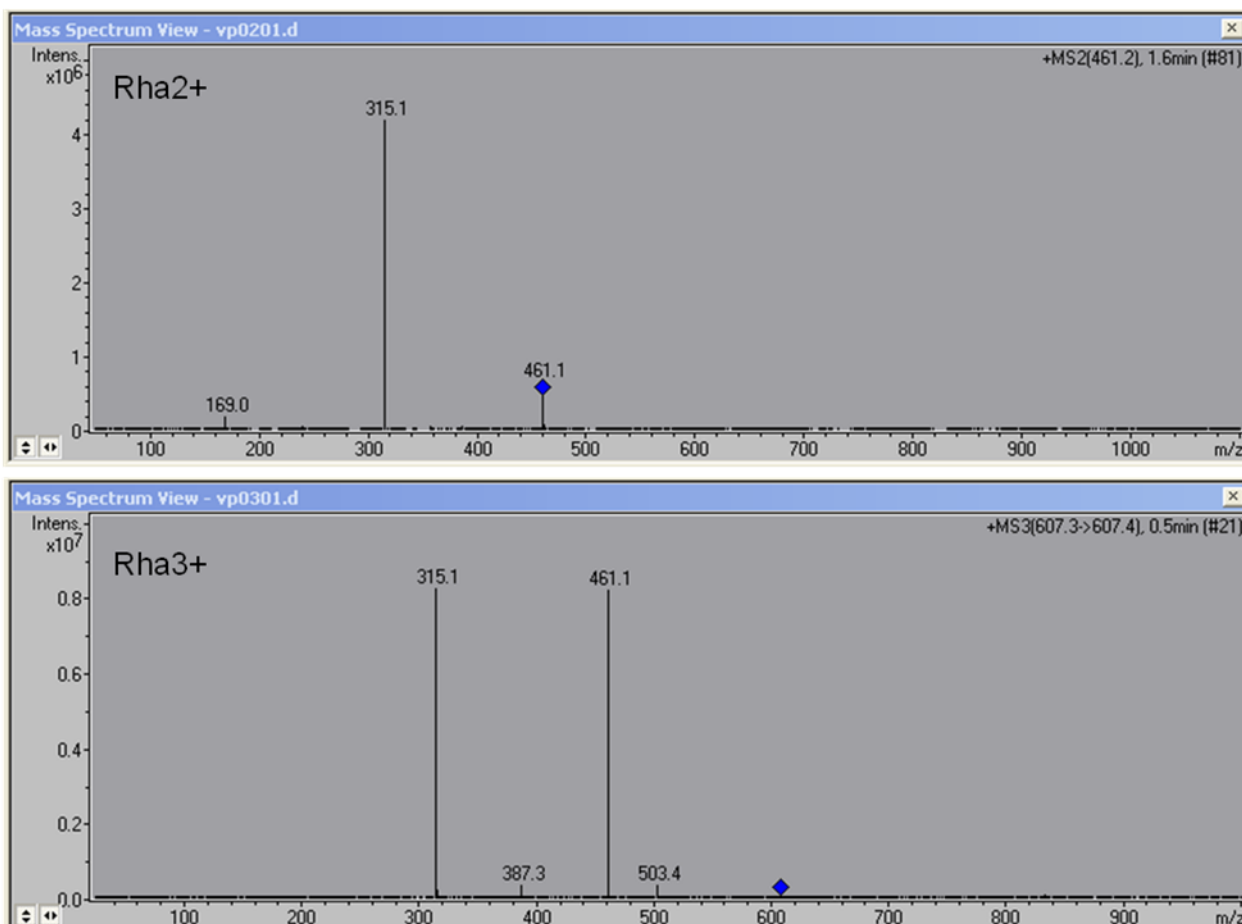
Obr.1: spektrum vzorky metyl 6-hydroxyhexanoyl L-ramnozidu, ESI MS² v pozitívnom móde

Hlavnou fragmentáciou u diramnozidov je skracovanie oligosacharidového reťazca pripomínajúca vznik iónov Y typu podľa nomenklatury Dommon a Costello. Týmto spôsobom je produkovaný monomér s kationom sodíka, čím vytvára hlavný pík spektra. V nasledujúcom fragmentačnom kroku je produkovaný sodíkový adukt metyl 6-hydroxyhexanoyl glycosidu (m/z 169) z monomérnych iónov m/z 315. Sodíkový adukt metyl 6-hydroxyhexanoyl glycosidu teda nevzniká hneď v prvom fragmentačnom kroku, ale až následne po eliminácii väzby medzi sacharidmi. Hmotnostné spektrá dimérov s rôznou interglykozidickou väzbou 1- >2 a 1->3 sú kvalitatívne identické a nevykazujú žiadne významné rozdiely, ktoré by boli vhodné na ich rozlíšenie.



U α a β anomérov triméru sú spektrá podľa očakávania prakticky identické. Nie je to prekvapením, pretože hlavná fragmentácia spočíva v skracovaní oligomérneho reťazca $[\text{M} + \text{Na}]^+$ bez ohľadu na anomérnu konfiguráciu, čím vzniká sodíkový adukt diméru a monoméru m/z 461 a 315. Fragmentácia MS^3 je potom podobná fragmentácii diméru a monoméru ako sú popísané vyššie.

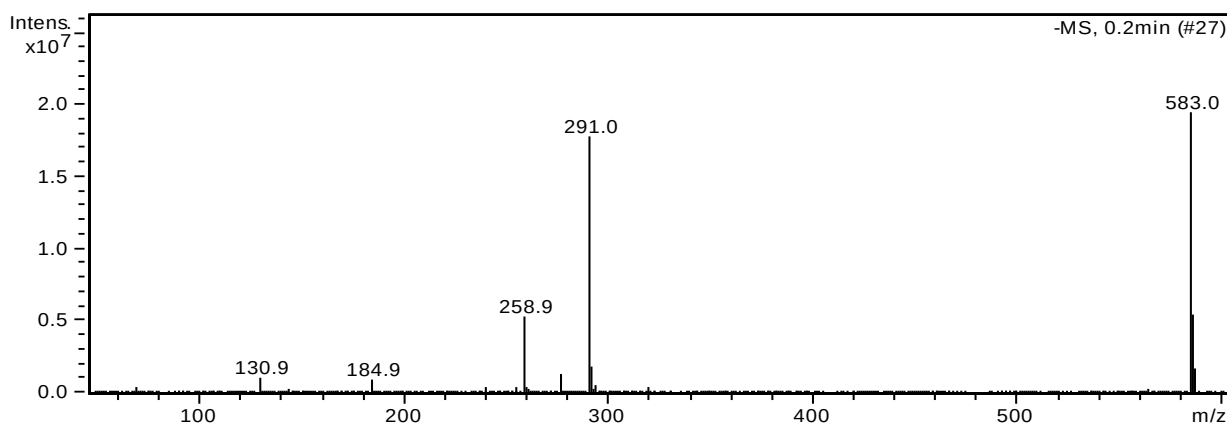




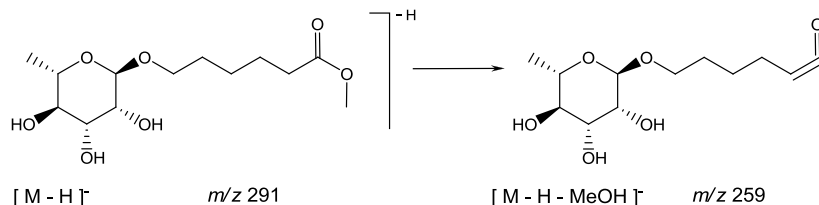
Obr 2: spektrá vzoriek a) metyl 6-hydroxyhexanoyl L-ramnobiozidu, ESI MS² v pozitívnom móde

b) metyl 6-hydroxyhexanoyl L-ramnotriozidu, ESI MS³ v pozitívnom móde.

Našou snahou bolo využiť na identifikáciu látok tohto typu aj hmotnostnú spektrometriu v negatívnom móde. V tomto móde mono a oligosacharidy produkujú ióny aniónových aduktov, deprotonovaných molekúl a ich fragmenty. Často sa stáva, že niektoré oligosacharidy nepodliehajú deprotonizácii ľahko, respektíve ich výťažok nie je dostatočný pre analýzu. Z tohto dôvodu sa často pridávajú vhodné aditíva na zvýšenie produkcie iónov. Väčšinou sa pridávajú rôzne anióny pre tvorbu $[M+A]^-$ iónov v ESI a MALDI hmotnostnej spektrometrii. V našom prípade sme ale nepridali žiadne aditíva, napriek tomu v spektrách sú viditeľné ióny $[M+HCl]^-$ vďaka prítomnosti stopového množstva chloridových aniónov v destilovanej vode, ktorá bola použitá na prípravu vzoriek. Tieto aniónové adukty sa celkom ľahko rozkladajú, pretože ESI process vnáša nadbytok energie a tým slabá väzba aniónového aduktu disociuje. V prípade glykozylovanej ramnózy hlavný pík v spektre m/z 291 reprezentuje deprotonizované ióny $[M-H]^-$. MS³ fragmenty je vidieť ako ióny $[M-H-MeOH]^-$ s m/z 259. Podobné fragmenty sa vytvárajú aj v prípade dimérov a triméru. Hmotnostná spektrometria látok takéhoto typu vykonaná v negatívnom móde teda prináša v spektrách viditeľné ióny $[M-H]^-$, $[M+HCl]^-$, $[M-H-MeOH]^-$. Prekvapujúco je v spektrách vidieť i iónovomolekulový produkt $[2M-H]^-$ kedy $[M-H]^-$ anión reaguje s neutrálnou molekulou.



Obr. 3: Negatívne ESI MS spektrum vzorky metyl 6-hydroxyhexanoyl L-ramnozidu.



Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a VEGA č. 2/0143/09.

Literatúra

B.Dommon and C.E.A. Costello, "Systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates", *Glycoconj. J.* **5**, 397 (1988).

R.Mistrík, Mass Frontier 4.0, www.highchem.com.

L.P. Brüll, V. Kováčik, J.E. Thomas-Oates, W. Heerma, J. Haverkamp, P. Kováč, "Loss of internal 1->6 monosaccharide residue from underivatized and per-O-methylated trisaccharides", *J.Am.Soc. Mass Spectrom.* **11**,1353(1997).

R.Saksena, R.Adamo, P.Kováč: „Synthesis of the tetrasaccharide side chain of the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium“, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **16**, 615 (2006).

Determination of Sodium Cation Adduct Positions to the Molecule of the Methyl 6-hydroxyhexanoyl Glycoside of Antrose.

Vladimír Pätoprstý^a, Vladimír Kováčik^a, Igor Tvaroška^a, Rina Saksena^b, Roberto Adamo^b, Pavol Kováč^b

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovensko

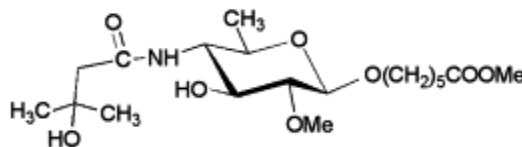
^bNIDDK, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20892-0815, USA

Introduction

Synthetic model, which is analog of the side chain of the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium, have been studied by electrospray ion trap mass spectrometry MSⁿ. The primary act effect of the ESI method is the attack by sodium cations, giving rise to the formation of [M+Na]⁺ adducts. The positions of attachment of sodium cations to the molecule of the methyl 6-hydroxyhexanoyl glycoside of antrose, and the structure and coordination behavior with sodium cation have been studied by quantum chemical calculations. The knowledge about position of sodium cation to the molecule is important for the correct interpretation of experimental mass spectra.

Experimental.

Compound investigated:



All quantum chemical calculations were carried out using the Jaguar program¹, version 5.5. The optimization of the geometry was done using the density functional method² (DFT). The hybrid functional B3LYP was used^{3,4} since it was found to provide reasonable results for structures of coordinate compounds. All calculations were performed using a 6-311++G** basis set.

Results and discussion.

The structure of compound was fully optimized at the density B3LYP/6-311++G** level and the lowest energy conformation was selected to generate initial structures of Na⁺ complexes. The structure is characterized by the all-trans conformation of the aglycon, the (*Z*)-anti orientation of amido group, and by an intramolecular hydrogen bond between hydrogen atom of hydroxyl group and ether oxygen.

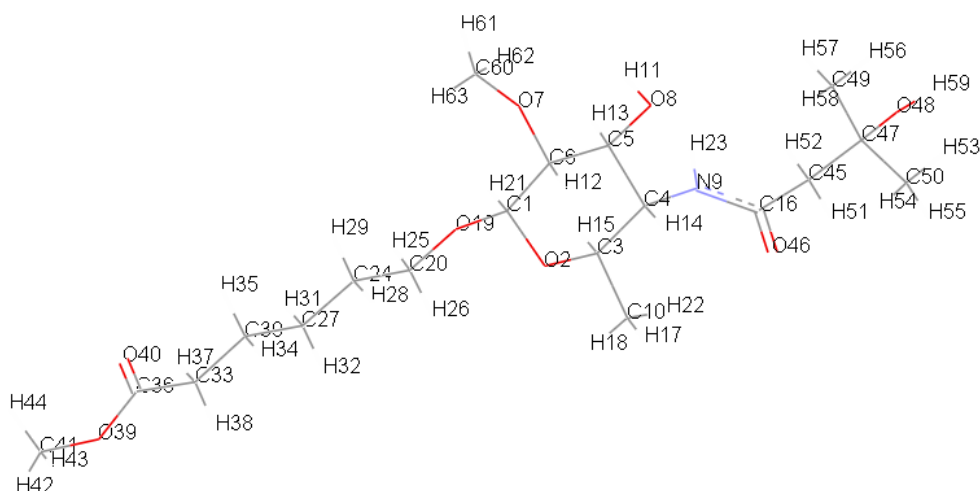


Figure 1. Schematic representation of the lowest energy conformer together with the labeling of atoms.

The model compound has nine potentially coordinating centers; two hydroxyl oxygen atoms (O8, O48), two carbonyls (O40, O46), four ether-type oxygen atoms (O2, O7 O19, O29), and a nitrogen atom (N9). Considering two lone-pair electrons on oxygen atoms, a location of a sodium cation is possible at least two different locations. Therefore, altogether 17 different initial structures were proposed for the 1:1 complex. A full optimization of these structures led to 11 different chelate structures. The values of selected geometrical parameters together with the relative binding energies of 11 resulting complexes are given in Table 1. It appears that in three complexes, M1, M2, and M5, three oxygen atoms participate in the coordination of Na⁺. In six complexes, M4, M6, M7, M8, M9, and M11, Na⁺ is coordinated by two and in the M10 complex only by one oxygen atom. Four optimized structures are shown in Figure 2. The Na-O distance calculated for 11 complexes range from 2.12 to 2.56 Å. For the closest donor oxygen atoms this distance is in a range from 2.12 to 2.27 Å. A comparison of optimized structures of complexes with the lowest energy conformer of the free one revealed that formation of a chelate structure influenced mainly the conformation of the side chains. This is illustrated by values of dihedral angles listed in Table 1.

Table 1. The B3LYP/6-311++G** calculated energy (hartree) and the binding energy^a (kcal/mol) of the optimized structures and selected structural parameters of complexes (length in Å and angles in deg) with Na⁺.

Comp	Energy	E_{bind}	r_{NaO}								Chelating
				τ_{16}	τ_{20}	τ_{24}	τ_{27}	τ_{39}	τ_{45}	τ_{48}	at.
M	1402.066377			-107	-66	-175	-179	-171	-173	-174	
M1	-1564.254010	-62.8	2.214	-141	-68	-176	-178	-175	-173	45	O8,O46,O48
M2	-1564.251844	-61.4	2.262	139	-56	98	56	155	176	-172	O8,O40,O46
M3	-1564.246285	-57.9	2.143	-132	-70	-175	180	-175	-173	64	O46,O48
M4	-1564.240121	-54.1	2.164	-109	-63	107	60	-161	-171	176	O39,O40,O46
M5	-1564.239818	-53.9	2.223	-144	-71	-173	180	-174	172	-172	O40,O46
M6	-1564.239149	-53.5	2.205	-166	-68	-176	-179	-175	165	-171	O7,O8
M7	-1564.231491	-48.7	2.250	-158	-63	-166	-179	-178	166	-171	O7,O19
M8	-1564.219031	-40.8	2.258	-99	-156	171	178	176	-172	-172	O6,O19
M9	-1564.208605	-34.3	2.131	-102	-65	168	-179	177	-174	-172	O40
M10	-1564.203324	-31.0	2.270	-102	-64	178	-177	-175	-174	-172	O39,O40
M11	-1564.183070	-18.3	2.233	-102	-63	177	-174	-170	-173	-173	O39

^a $\Delta E = E_{\text{complex}} - E_{\text{XX}} - E_{\text{Na}^+}$; $E_{\text{Na}^+}(6-311++G^{**}) = -162.087567 \text{ a.u.}$; $E_{\text{XX}}(6-311++G^{**}) = -14-2.066377 \text{ a.u.}$

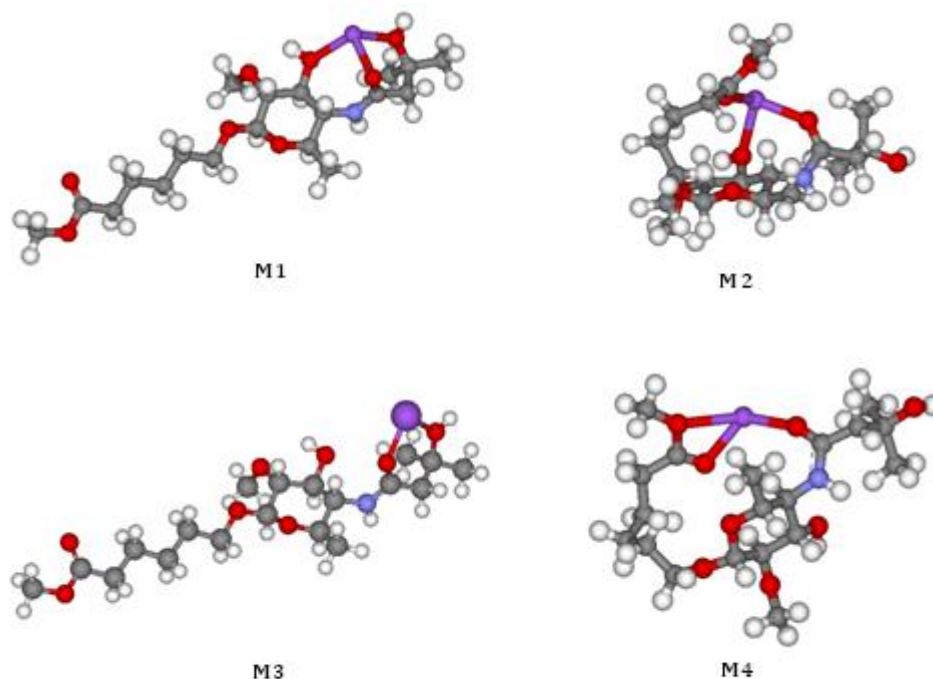


Figure 2. The B3LYP/6-311++G** optimized structure of $[M+Na]^+$ complexes. Carbon atoms are represented by a black sphere, oxygen atoms by a red, nitrogen by a blue, and sodium cation by a violet sphere, respectively.

Conclusion

The most stable structure of the Na^+ complex has the sodium interacting with three hydroxyl oxygen atoms; two from hydroxyl groups (O8, O48) and one from carbonyl (O46). The result of calculations is important for correct determination of mass spectrometric fragmentation pathways of methyl 6-hydroxyhexanoyl glycoside of antrose and their oligomers.

Acknowledgement

This work was supported by the Slovak Grant Agency for Science VEGA (contract no. 2/0143/09) and is the result of the project implementation: Centre of excellence for white-green biotechnology (ITMS 26220120054), supported by the Research & Development Operational Programme funded by the European Regional Development Fund

References

- 1, Jaguar 5.5, Release 11, Schrödinger, Inc., Portland, OR, 2004.
- 2, Becke A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A* 1988, 38, 3098-3010.
- 3, Perdew J. P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B* **1986**, 33, 8822-8224.
- 4, Amin E. A., Truhlar D.G. Zn Coordination Chemistry: Development of Benchmark Suites for Geometries, Dipole Moments and Bond Dissociation Energies and Their Use to Test and Validate Density Functionals and Molecular Orbital Theory. *J. Chem. Theor. Comput.* **2008**, 4, 75-85.

ESI IT MS Fragmentation of Synthetic Analogs of the Tetrasaccharide Side Chain of the Major Glycoprotein of the *Bacillus anthracis* Exosporium.

Vladimír Pätoprstý^a, Vladimír Kováčik^a, Igor Tvaroška^a, Rina Saksena^b, Roberto Adamo^b, Pavol Kováč^b

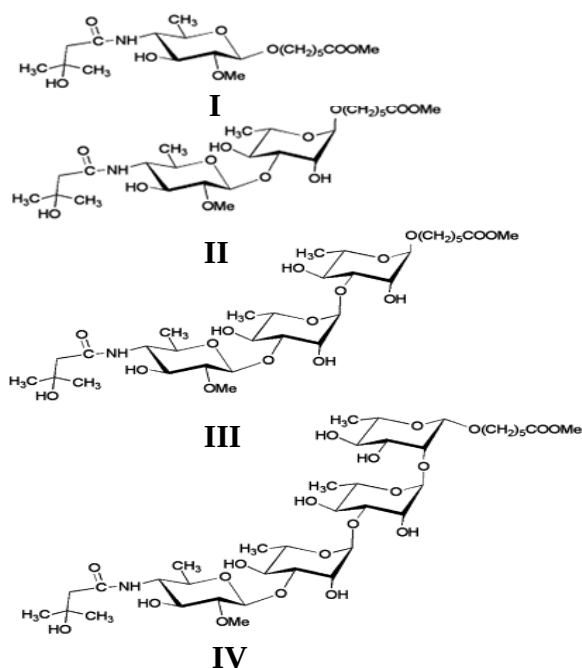
^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava, Slovensko

^bNIDDK, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20892-0815, USA

Introduction

Bacillus anthracis is the causative agent of anthrax [1], a fatal disease in humans and other mammals, caused by gram-positive rod-shaped, aerobic soil bacterium. Because of possible use of some form of the bacterium as a biological weapon, there is a worldwide effort to develop a powerful vaccine [2] for the disease. *Bacillus anthracis* is a spore-forming pathogen; spores form when vegetative cells are deprived of essential nutrients. Therefore a strategy toward the vaccine for anthrax could be based on targeting spores with neutralizing antibodies, specific for a component on their surface. Such is, for example, the tetrasaccharide β -Ant-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 2)-L-Rhap (Ant stands for 4,6-dideoxy-2-O-methyl-4-(3-hydroxy-3-methylbutamido)-D-glucose, antrose) which was discovered to be the oligosaccharide side [3] chain of a collagen-like region of the major glycoprotein of the *B. Anthracis* exosporium [4]. To allow conjugation to suitable carriers, the methyl 6-hydroxyhexanoyl glycosides of model substances [5-7] were prepared. With the aim to find methodology useful for structure elucidation of compounds of this class and consequently the marker of antrose in anthrax containing materials, we studied mass spectral fragmentation of related synthetic model compounds. Here, we describe positive as well as the negative mode electrospray multistage ion trap mass spectrometry (ESI MSⁿ) of synthetic saccharides. This technique is one of the most effective method of structural analysis of biomolecules in micro/pico quantities.

Compounds investigated



Experimental

ESI analysis and multistage MS²⁻⁵ were performed with an Esquire 3000 ion-trap mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), equipped with an electrospray ionization source. For analysis, 1 mg of the sample was dissolved in 1 ml of acetonitrile/water (1:1, v/v) and introduced into the ion source at a flow rate of 10 μ L/min, and entered via a metal capillary held at high voltage (3.5 kV). Nitrogen was used as both a nebulizing and drying gas. The nozzle-skimmer potential and octopole potential were modified and optimized prior to each experiment.

The mass spectra interpretation software Mass Frontier 4.0 was used in some cases in order to assist in the elucidation of the fragmentation mechanisms. The Fragments

~ 21 and Mechanisms module of the program is

Results and discussion

The 4,6-dideoxy-2-O-methyl-4-(3-hydroxy-3-methylbutamido)-D-glucose (antrose) differ from rhamnosyl derivatives by the presence of 4-(3-hydroxy-3-methylbutamido) side chain. Antrose was discovered to be the end unit of the oligosaccharide side [3] chain of a collagen-like region of the major glycoprotein of the *B.anthraxis* exosporium. This makes the antrose unit a marker in the identification of the spores. The primary effect of the ESI positive method is the attack by sodium cations, giving rise to the production of $[M+Na]^+$ adducts. The site of attachment of the sodium cation to the molecule of the methyl 6-hydroxyhexanoyl glycoside of antrose **I** has been studied by quantum chemical calculations. According them the most stable structure of the Na^+ complex has the sodium interacting with three hydroxyl oxygen atoms; two from hydroxyl groups (O8, O48) and one from carbonyl (O46). The basic cleavage of the $[M+Na]^+$ ions is the elimination of 2-hydroxy-propene molecule from the N-substituent. The 4-(3-hydroxy-3-methylbutamido)-derivatives of oligosaccharides exhibit also Y cleavage of interglycosidic linkage. The internal residue loss [8] was not observed. Consequently the tentative mechanism of fragmentation of oligomer **IV** includes the combination of eliminations of 2-hydroxy-propene and Y-cleavages as oligomere shortages. As example the ESI IT positive tandem mass spectra of the compound **IV** is introduced on the Figure 1.

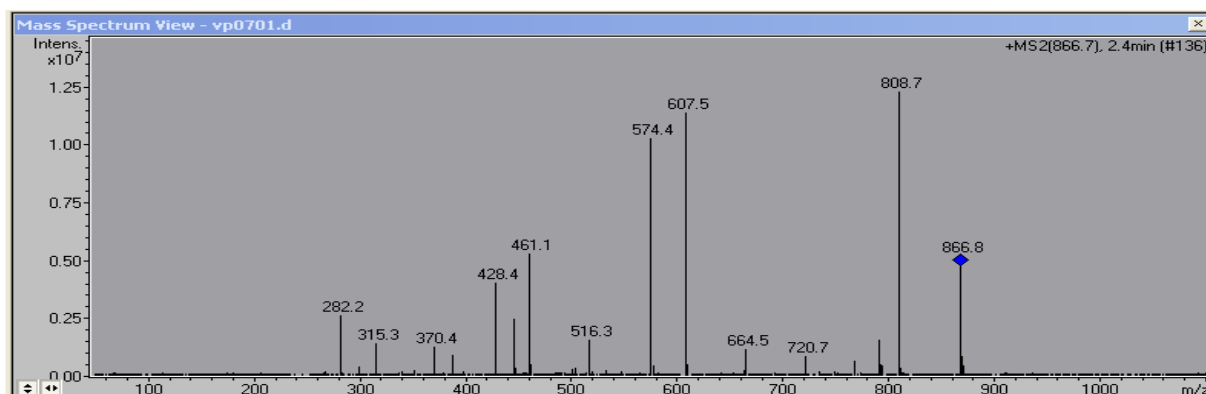
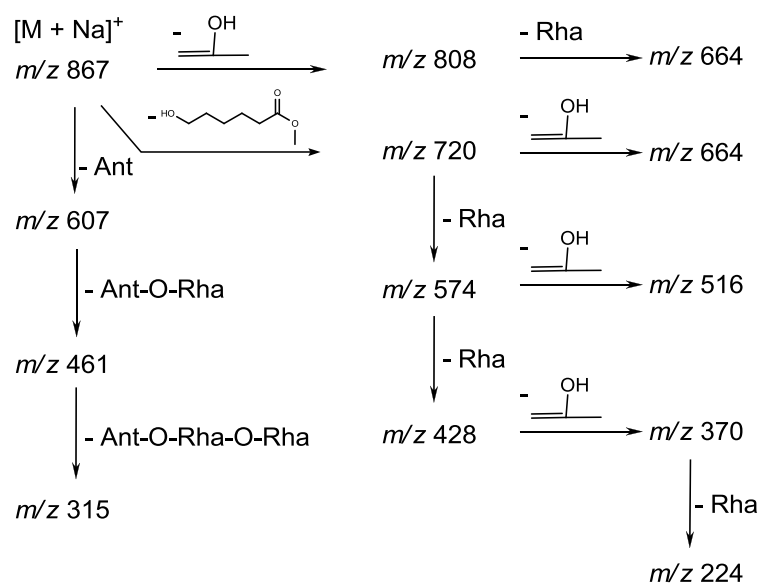


Fig.1: ESI MS² spectrum of **IV** in positive mode; m/z 867 $[M+Na]^+$

The tentative mechanism of fragmentation of the oligomers in positive mode includes the combination of 2-hydroxy-propene eliminations and Y-cleavages and are introduced on the example of the compound **IV** on the scheme 1.



Scheme 1.

With the aim to find the best techniques for antrax models identification, we studied the synthetic antrax models by the ESI IT mass spectrometry also in the negative mode. In this mode, mono- and oligosaccharides produce anionic adducts, deprotonated molecules, and fragments thereof. The ions $[M+Cl]^-$ are visible in the negative spectra because of presence of trace amounts of chloride anions in the distilled water that was used for sample preparation. These adducts easily decompose from $[M+Cl]^- \rightarrow [M-H]^- \rightarrow [M-CH_2COHCH_3]^-$ as is on the Figure 2.

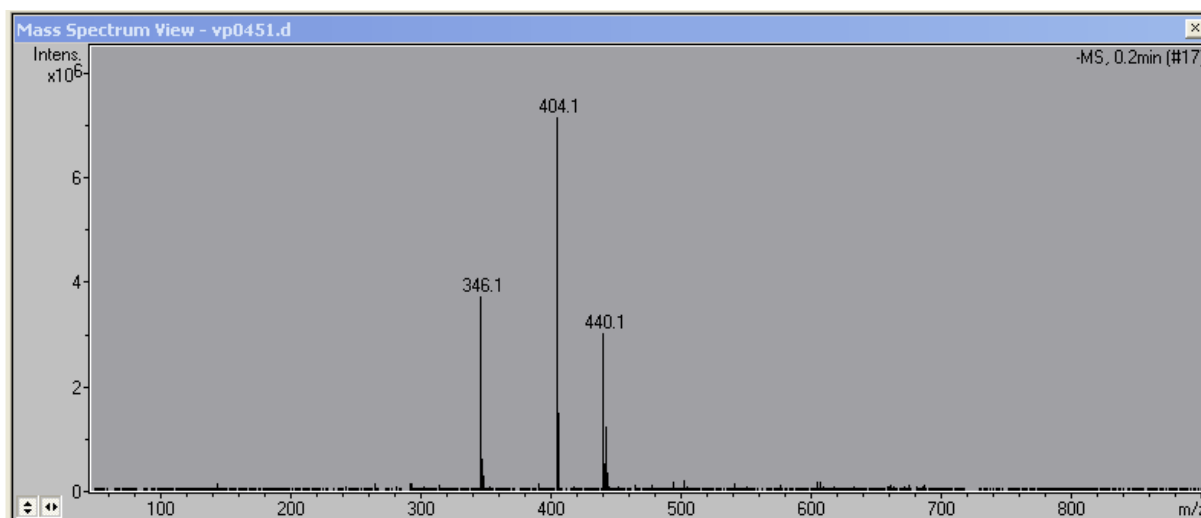
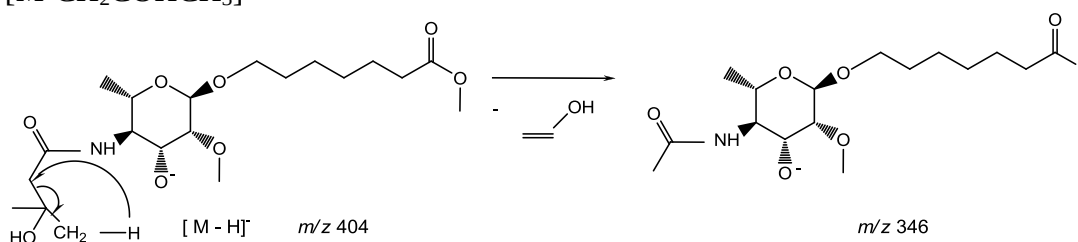


Fig. 2.: ESI MS² spectrum of **I** in negative mode; $m/z\ 404\ [M-H]^-$, $m/z\ 440\ [M+Cl]^-$, $m/z\ 346\ [M-CH_2COHCH_3]^-$



Scheme 2.

Conclusion

The ESI IT MS can be successfully used for the elucidation as marker of an antriose unit in antrax containing materials in positive as well as in negative mode. As an evidence in positive mode can serve the stable $[M+Na]^+$ adducts of molecular and shortened fragment ions. The interesting new finding is, that the 4-(3-hydroxy-3-methylbutamido)-derivatives of oligosaccharides exhibit Y cleavage of interglycosidic linkage. On the other side in negative mode the antriose mono and oligosaccharides characterize the intensive deprotonated $[M-H]^-$ ions and main fragment, produced by elimination of 2-hydroxy-propene together with deprotonated lower oligosaccharide. The negative ESI IT spectra of the trimers as well as tetramers show Y cleavage only of the end unit.

Acknowledgement

This work was supported by the Slovak Grant Agency for Science VEGA (contract no. 2/0143/09) and is the result of the project implementation: Centre of excellence for white-green biotechnology (ITMS 26220120054), supported by the Research & Development Operational Programme funded by the European Regional Development Fund

References

- 1, Smith KA. An antrax vaccine wanted: Dead or alive? *Medical Immunology* 2005;**4**:5:1.
- 2, Wang JY, Roehrl MH. Antrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus and toxin. *Medical Immunology* 2005; **4**:4: 1.
- 3, J.M. Daubenspeck, H.Zeng, P.Chen, S.Dong, Ch.T.Streichen, N.R. Krishna, D.G. Pritchard, Ch.L.Turnbogh Jr., "Novel oligosaccharide side chains of the collagen-like region of BclA, the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium", *J. Biol. Chem.*, **279**, 30945 (2004).
- 4, L.N.Waller, M.J.Stump, K.F.Fox, W.M.Harley, A.Fox, G.C.Stewart, M.Shahgholi, „Identification of a second collagen-like glycoprotein produced by *Bacillus anthracis* and demonstration of spore-specific sugars“, *J. Bacteriology*, July, 4592, (2005).
- 5, R.Saksena, R.Adamo, P.Kováč: „Studies toward conjugate vaccine for antrax. Synthesis and characterization of antriose. [4,6-dideoxy-4-(3-hydroxy-3-methylbutanamido)-2-O-methyl-D-glucopyranose] and its methyl glycosides“, *Carbohydr. Res.* **340**, 1951 (2005).
- 6, R.Saksena, R.Adamo, P.Kováč: „Synthesis of the tetrasaccharide side chain of the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium“, *Bioorg. a Med. Chem. Lett.*, **16**, 615 (2006).
- 7, R.Adamo, R.Saksena, P.Kováč, „Synthesis of the β anomer of the spacer-equipped tetrasaccharide side chain of the major glycoprotein of the *Bacillus anthracis* exosporium, *Carbohydr. Res.* **340**, 2579 (2005).
- 8, L.P. Brüll, V. Kováčik, J.E. Thomas-Oates, W. Heerma, J. Haverkamp, P. Kováč, "Loss of internal 1->6 monosaccharide residue from underivatized and per-O-methylated trisaccharides", *J.Am.Soc. Mass Spectrom*, **11**,1353(1997).

Structural analysis of some diglycosylamines

Júlia Mičová¹, Vladimír Pätoprstý¹, Silvia Vlčková¹, Ľudovít Škultéty²

¹*Institute of Chemistry SAS, Dubravska 9, 845 38 Bratislava, Slovakia*

²*Institute of Virology SAS, Dubravska 9, 845 05 Bratislava, Slovakia*

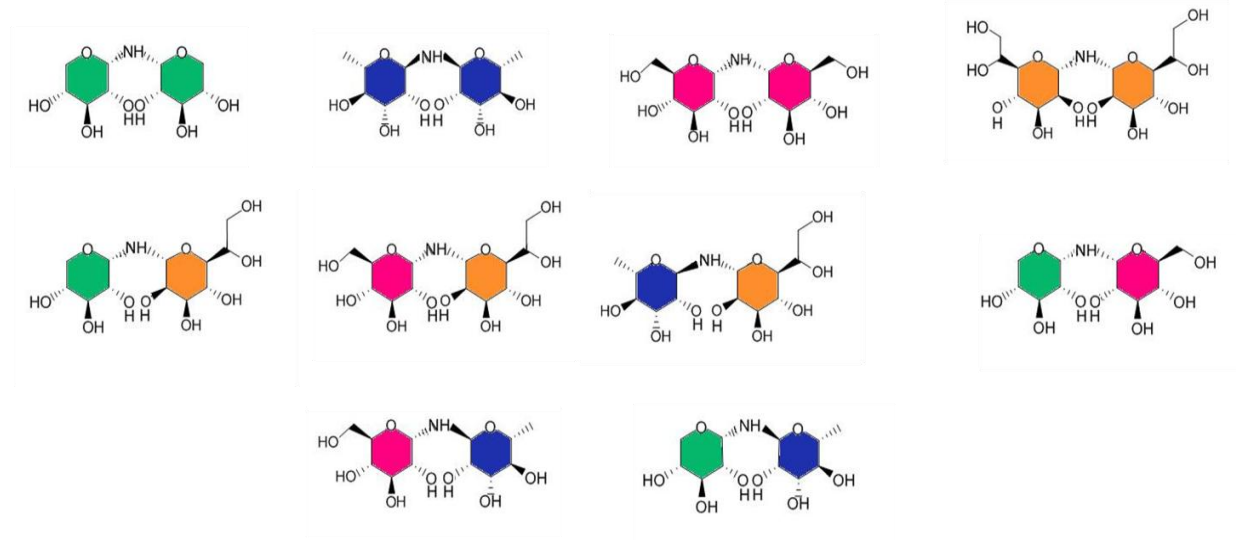
INTRODUCTION

Glycosylamines (mono- and di-) are compounds of interest for the enzymology of carbohydrates, because they are considered as reversible inhibitors of different glycosidases [1,2]. These compounds are used as universal auxiliaries for the synthesis of biologically active compounds [3].

Some monoglycosylamines were prepared by reaction of reducing sugar residue with concentrated alcoholic solution of ammonia in cold. These derivatives were used as reagent to next reaction step-transglycosylation in boiling methanol.

By this way we have prepared set of combined diglycosylamine from monoglycosylamines, so that resultants contained different two units (pentose, hexose, deoxyhexose, heptose). The structures of those products were determined by mass spectrometric methods. Mass spectra were obtained by electrospray QTOF MS. The primary effect of the electrospray method in positive mode is the protonation of the molecule, giving rise to the formation of $[M+H]^+$ adducts.

COMPOUNDS INVESTIGATED



EXPERIMENTAL

Monoglycosylamines were prepared by reacting the corresponding reducing sugars (D-Xylose, D-Glucose, L-Rhamnose and D-Glycero-D-Guloheptose) in a methanolic solution of ammonia. These derivatives were then refluxed in anhydrous methanol with the exclusion of external moisture.

ESI analysis and MS/MS were performed with a mass spectrometer QToF Premier, (Waters Manchester, UK), equipped with a nanoelectrospray ionization source.

For analysis, 1 mg of the sample was dissolved in 1 ml of acetonitrile/water (1:1, v/v) and introduced into the ion source at a flow rate of 5 μ L/min, and entered via a metal capillary held at high voltage (3.5 kV). Nitrogen was used as a nebulizing and also as a drying gas. The potentials were modified and optimized prior to each experiment.

The mass spectra interpretation software Mass Frontier 4.0 was used in order to assist in the elucidation of the fragmentation mechanisms.

Quantum chemical calculations were carried out using the Hyperchem program, version 8.0.6. The optimization of the geometry was done using the density functional method. The hybrid functional B3LYP was used since it was found to provide reasonable results for structures of coordinate compounds. All calculations were performed using a 6-311++G** basis set.

RESULTS AND DISCUSSION

The basic mass spectrometric fragmentation pathways derived from mass spectra of L-Rhamnosyl -D-Xylosylamine obtained by nanoelectrospray MS in positive mode are present on Scheme 1. Ions m/z 150 and m/z 164 clearly show the both parts of molecule – rest of pentose and deoxyhexose. Interpretation of fragmentation was performed by software Mass Frontier 4.0 and compared with experimental results of MS². On the mass spectra is distinguished decomposition of different parts of amine. It is evident, that using the mass spectrometric methods in structural analysis that kind of compounds is very favourable. The same situation is in interpretation of mass spectra of compounds where the molecule of amine is formed by sugars with various molar weight.

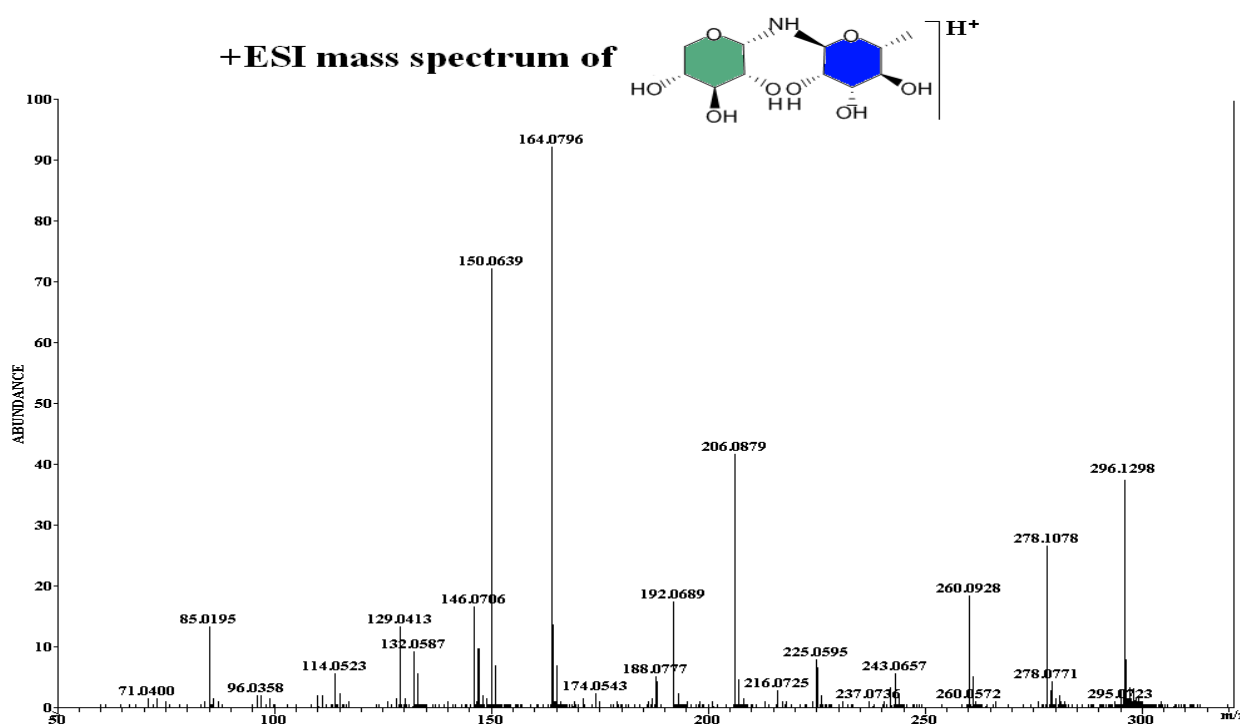
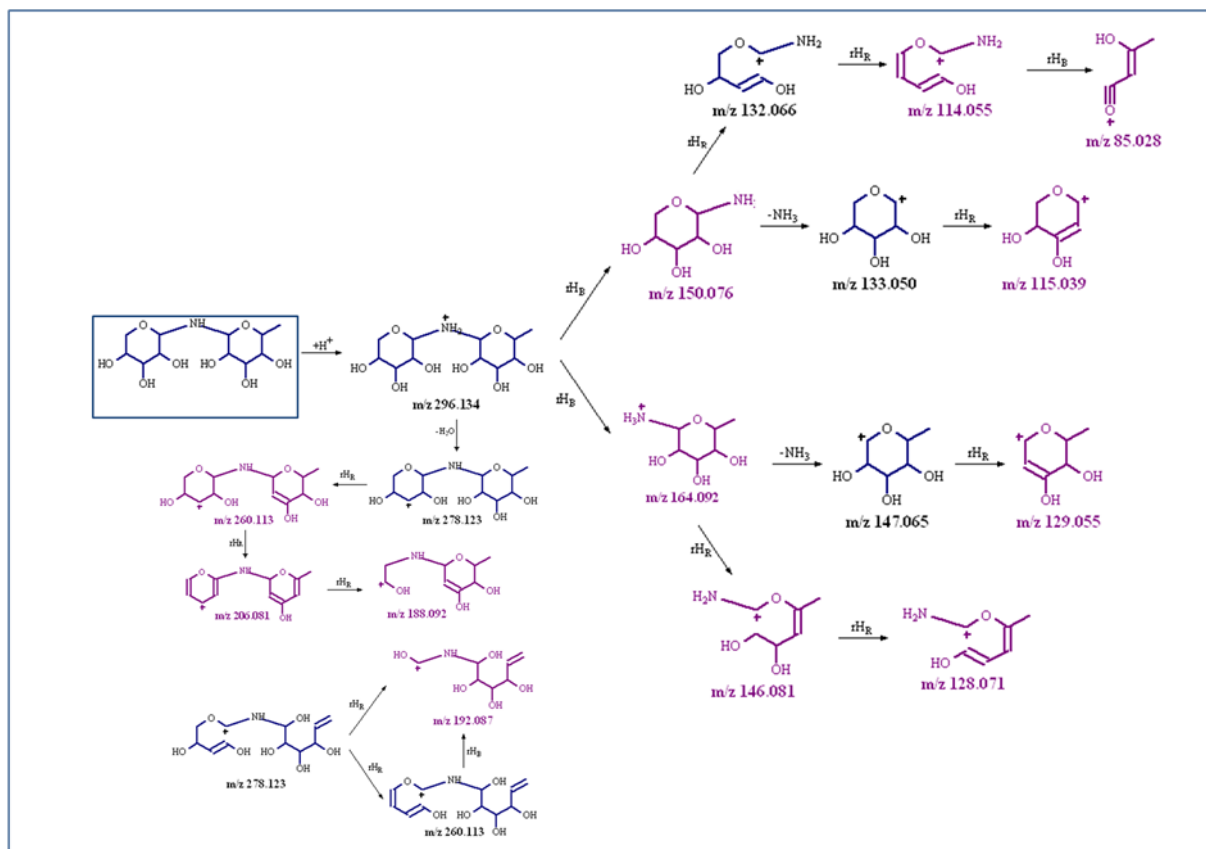


Fig.1: nESI mass spectrum of L-Rhamnosyl-D-Xylosylamine in positive mode,



Scheme 1: The main nESI+ MS fragmentation pathways of pentopyranosyl-deoxyhexapyranosyl -amine

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Slovak Grant Agency for Science VEGA (contract no. 2/0143/09) and is the result of the project implementation: Centre of excellence for white-green biotechnology (ITMS 26220120054), supported by the Research & Development Operational Programme funded by the European Regional Development Fund

REFERENCES

- [1] Lai, H. Y. L.; Axelrod, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1973, 54, 463-468.
- [2] Lalegerie, B.; Legler, G., Yon, J. *Biochimie* 1982, 64, 977-1000.
- [3] Kunz, H.; Ruck, K. (1993) *Angew Chem Int Ed Engl* 1993, 32: 336-358.

UNIQUE PATHWAY OF GLUCURONOXYLAN UTILIZATION BY *PICHIA STIPITIS*

Ryabova O., Kolenová K., Vršanská M., *Biely P.

Department of Enzymology of Carbohydrates, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, 845 38 Bratislava, Slovakia

Centre of excellence for white-green biotechnology, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, 94976 Nitra, Slovakia

* chempbsa@savba.sk

Keywords: xylan degradation, *Pichia stipitis*, endoxylanase, β -xylosidase and α -glucucuronidase

Introduction

The yeast *Pichia stipitis* is of special interest to biotechnology due to its ability to ferment xylose to ethanol and utilize xylan as a single carbon source [1,2]. Thus the yeast has a potential to carry out one-step conversion of xylan in lignocellulosic side-products and wastes into fuel-grade ethanol. Many studies are focused on xylose converting pathway of *P. stipitis* while its natural xylan-degrading enzyme system remains poorly understood. We examined the xylanolytic enzyme system of the strain, genome of which was recently sequenced, *P. stipitis* CBS 6054 [3].

Results

The strain was found to grow on 1% birchwoodglucuronoxytan as a single carbon source. However, the growth yields on the polysaccharides were much lower than on xylose and β -1,4-xylooligosaccharides (Fig. 1). The reason of the incomplete utilization of the

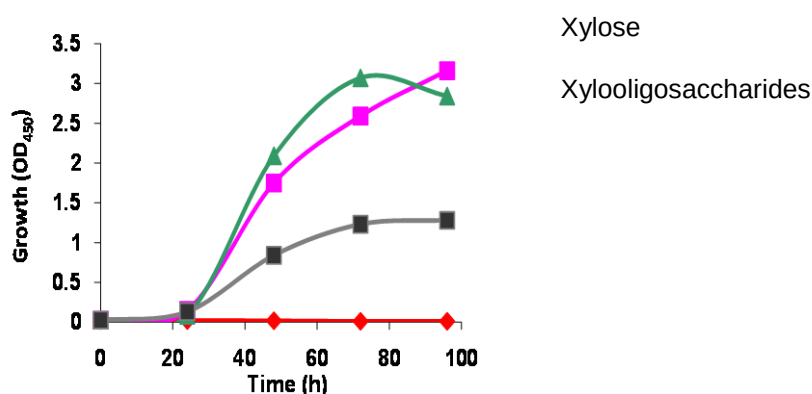


Fig. 1. Growth of *P. stipitis* CBS 6054 on several related carbon sources (0.5 % w/v).

polysaccharide remains unknown. However, the absence of accumulation of acidic oligosaccharides (aldouronic acids) in the growth medium by the yeast, served as an evidence for production of not only endoxylanase but also α -glucuronidase. To learn more about the

nature of the xylan-utilizing system of this yeast, three enzymes required for complete utilization of glucuronoxylan were assayed in the extracellular medium and also on intact cells (Fig. 2). Chromogenic substrates were used in all three cases: Remazol Brilliant Blue xylan for assay of endoxylanase, 4-nitrophenyl β -D-xylopyranoside α -1,2-substituted with 4-O-methyl-D-glucuronic acid (MeGlcA) as substrate of α -glucuronidase in a β -xylosidase coupled assay, and 4-nitrophenyl β -D-xylopyranoside as substrate of β -xylosidase [4].

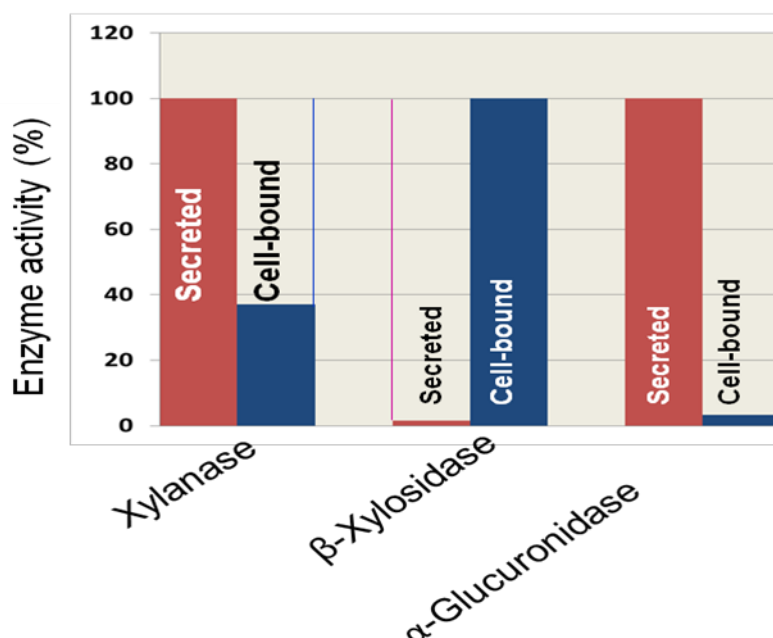


Fig. 2. Distribution of endoxylanase, β -xylosidase and α -glucuronidase in xylan-grown *P. stipitis* between extracellular medium and cells surface.

The yeast secreted most of the endoxylanase into the medium, however, more than one third of the enzyme remained associated with the cell surface. It remains to be established whether the same enzyme is secreted and confined to the cells. β -Xylosidase assayed on 4-nitrophenyl xyloside was found to be almost completely cell-bound. Another secreted enzyme is α -glucuronidase. Thus the glucuronoxylan degrading enzyme system of *P. stipitis* seems to include the following steps: extracellular hydrolysis of the polysaccharide with endoxylanase into neutral and acidic oligosaccharides, and liberation of MeGlcA from the polysaccharide and acidic oligosaccharides. The endoxylanase is quite unique because it liberates from xylan mainly xylobiose and converts longer linear xylooligosaccharides mainly into xylobiose. Resulting neutral xylooligosaccharides are either hydrolyzed by a cell-surface-localized or periplasmic β -xylosidase or taken up by the plasmamembrane transport system and hydrolyzed to xylose by an intracellular β -xylosidase. All these three enzymes were found to be inducible with xylan, xylooligosaccharides and partially also by xylose. Examination of the transport system for xylobiose indicated that the specific rate of the transport for xylooligosaccharides does not differ too much between the cells grown on glucose and xylan.

The activity of the cell-bound β -xylosidase could be determined on intact cells only on artificial chromogenic substrate, NPh-Xylp, which is based on liberation of 4-nitrophenol. The cells showed little or no β -xylosidase activity when assayed on xylobiose or xylobiitol. β -Xylosidase could be followed as xylose liberation only in the presence of inhibitors of energy metabolism: 0.1% NaN_3 or 0.2 mM 2,4-dinitrophenol. In their absence, liberated xylose is immediately taken up by cells from the medium by an active transport system. β -Xylosidase of *P. stipitis* remains covered with more mystery. Disintegration of cells destroys cell-bound

β -xylosidase activity (same results in the presence of proteinase inhibitors). β -Xylosidase activity could not be recovered in homogenates, cell walls, membrane fractions, or in toluene-permeabilized cells. Thus β -xylosidase appears to be an integral part of cell surface structures and possibly associated with xylobiose transport. Elucidation of this phenomenon could be valuable for further engineering of xylose-fermenting yeasts. The scheme of glucuronoxylan utilizing system of *P. stipitis* is depicted in Fig. 3.

Glucuronoxylan

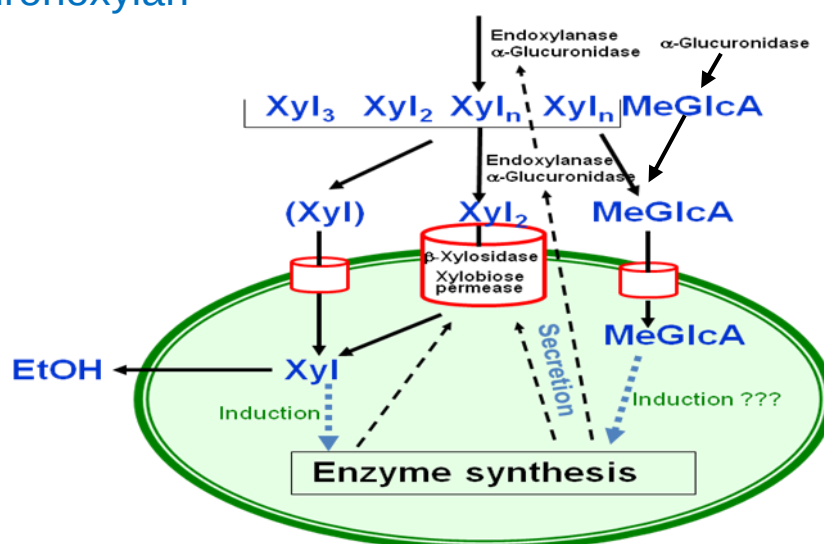


Fig. 3. Schematic representation of the glucuronoxylan utilizing enzyme system of the yeast *P. stipitis*. Two enzymes, endoxylanase and α -glucuronidase are secreted, while β -xylosidase remains localized somewhere at the cell surface and possibly coupled with the transport system of xylooligosaccharides.

Conclusions

For utilization of glucuronoxylan the yeast *P. stipitis* secretes unique endoxylanase and α -glucuronidase which convert xylan and xylooligosaccharides to xylobiose and MeGlcA. Xylobiose appears to be transported to the cells under concomitant hydrolysis with cell-bound β -xylosidase. α -Glucuronidase of *P. stipitis* is capable of liberating MeGlcA from both aldouronic acids and the polymer. The xylanolytic system of *P. stipitis* is not complete. It is deficient in α -arabinofuranosidase and acetylxyLANesterase. The yeast obviously shares its enzymes with other xylanolytic microorganisms in its natural habitat which is digestive gut of wood-eating beetles. Isolation and characterization of the individual xylanolytic enzymes of this yeast may lead to discovery of new types of enzymes involved in degradation of plant hemicellulose which are not included in the CAZY website [5].

This contribution is the result of the project implementation: Centre of excellence for white-green biotechnology, ITMS 26220120054, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

References

- [1] Hahn-Hagerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K., Prior BA (1994) Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enz. Microb. Technol.* 16, 933-943.
- [2] Lee, H., Biely, P., Latta, R.K., Barbosa, M.F., Schneider, H. (1986) Utilization of xylan by yeasts and its conversion to ethanol by *Pichiastipitis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 320-324.
- [3] Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.S., Passoth, V., Richardson, P.M. (2007) Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichiastipitis*. *Nat. Biotechnol.* 25, 319-326.
- [4] Biely P. (2003): Xylanolytic enzymes. In: *Handbook of Food Enzymology* (Whitaker, J.R., Voragen, A. and Wong, D., Eds), pp. 879-916. Marcel Dekker, Inc. NY.
- [5] Coutinho, P. M., Henrissat, B. (1999) Carbohydrate active enzymes: an integrated database approach. In: *Recent Advances in carbohydrate Bioengineering* (Gilbert, H.J., Davies, G., Henrissat, B. and Svensson, B., Eds), pp. 3-12. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Štruktúrna charakterizácia hyaluronanov modifikovaných účinkom tiolov

Eva Hrabárová*, Jozef Rychlý, Vlasta Sasinková, Katarína Valachová, Ivica Janigová, Katarína Csomorová, Ivo Juránek a Ladislav Šoltés

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

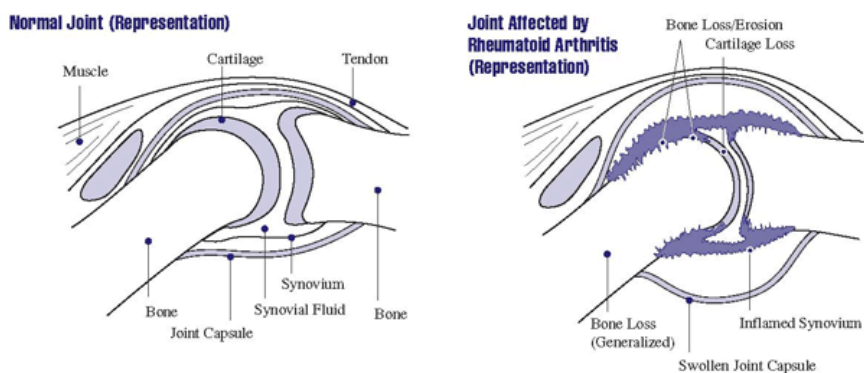
[*chemhra@savba.sk](mailto:chemhra@savba.sk)

Kľúčové slová

Hyaluronan, rotačná viskozimetria, Fourier-transformovaná infračervená spektroskopia, neizotermálne metódy

Úvod

Synoviálne kĺby (Obr. 1) predstavujú špecializované štruktúry kostrového aparátu, ktoré umožňujú pohyb. Vo vnútornom priestore kĺbu sa nachádza synovium, tj. synoviálna membrána, chrupavky pokrývajúce povrch kostí a synoviálna tekutina, ktorá vyplňa priestor medzi chrupavkami. Základnou zložkou synoviálnej tekutiny je vysokomolekulový biopolymér hyaluronan/kyselina hyalurónová (HA), ktorý vďaka svojej schopnosti viazať vodu vytvára gélovitú štruktúru s vysokou viskoelasticitou. HA tvorí tiež základnú osnovu extracelulárneho matrixu chondrocytov, tj. chrupavky. Cieľom práce bolo overovanie potenciálnych štruktúrnych zmien vo vzorkách HA modifikovaných účinkom tiolov (cysteamín, *N*-acetyl-L-cystein a L-cystein) počas degradačného procesu pomocou metódy Fourier-transformovanej infračervenej spektroskopie (FT-IČ) a neizotermálnych metód – chemiluminometrie (CL), diferenciálnej skenovacej kalorimetrie (DSC) a diferenciálnej termogravimetrie (DTG).



Obr. 1. Porovnanie zdravého synoviálneho kĺbového systému (vľavo) s chronickým štádiom zápalu synoviálneho kĺbu (vpravo) [http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Rheumatic_Disease/graphics/joint_vert.gif; valid: August 16, 2012].

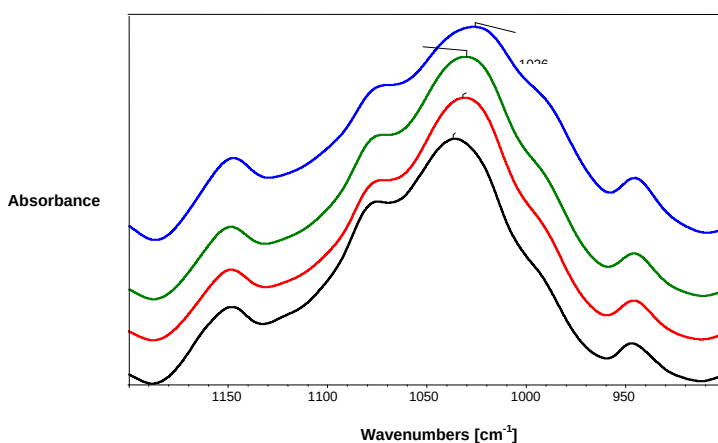
Materiál a metódy

FT-IČ spektrá sa merali pomocou spektrometra Nicolet 6700 vybaveného s DTGS detektorom a softvérom Omnic 8.0. Spektrá sa zberali v strednom rozmedzí od 4000 do 400 cm^{-1} pri rozlíšiteľnosti 4 cm^{-1} a počet skenov bol 128. Zoslabená totálna reflektancia (ATR) na merania

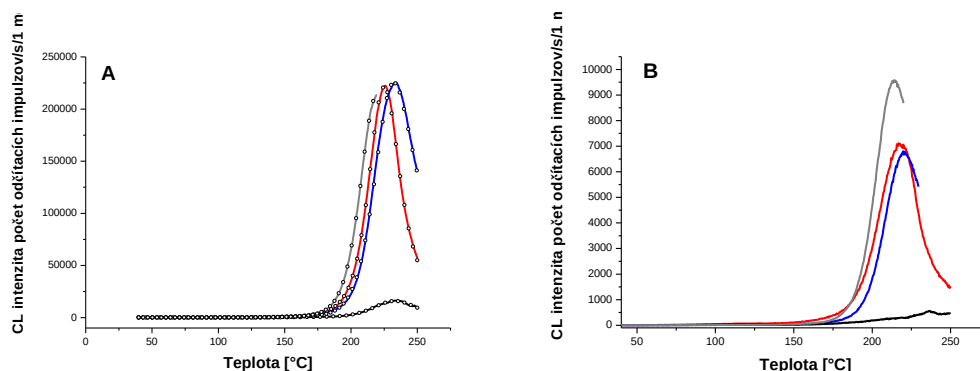
v tuhom stave sa uskutočnila s použitím prístroja Diamond Smart Orbit. Merania fragmentovaných vzoriek HA v tuhom stave metódou CL prebiehali s použitím odčítavača fotónových impulzov prístroja Lumipol 3 (Ústav polymérov SAV v Bratislave). Prietok plynu (čistý kyslík alebo dusík) cez kyvetu so vzorkou bol 3,0 l/h. Meralo sa v teplotnom rozmedzí 40-220 °C s lineárnym gradientom 2,5 °C/min. Signál fotokatódy bol zaznamenávaný v intervale zberu dát 10 sekúnd. Množstvá testovaných vzoriek boli v rozmedzí 0,98-1,62 mg. Kalorimetrické merania prebiehali s použitím diferenciálneho skenovacieho kalorimetra *MettlereToledo DSC 821^e*. Teplota skenného prechodu (T_g) a termálna stabilita vzoriek sa vyhodnotili z druhého ohrevu vzoriek počnúc laboratórnou teplotou až do teploty 550 °C (10 °C/min) v atmosfére dusíka (50 ml/min). Prvý ohrev (laboratórna teplota–170 °C) sa aplikoval kvôli odstráneniu vlhkosti zo vzoriek. Termooxidatívna dekompozícia bola sledovaná v teplotnom rozsahu (laboratórna teplota–550 °C; 10 °C/min) v prietoku kyslíka (50 ml/min). Množstvá testovaných vzoriek sa pohybovali v rozmedzí 0,80-1,77 mg. Termogravimetrické merania prebiehali s použitím prístroja *MettlereToledo TGA/SDTA 851^e* v atmosfére kyslíka alebo dusíka (30 ml/min) s rýchlosťou ohrevu 10 °C/min v teplotnom rozsahu od laboratórnej teploty až po teplotu 550 °C. Množstvá testovaných vzoriek sa pohybovali v rozmedzí od 0,28 do 1,0 mg.

Výsledky a diskusia

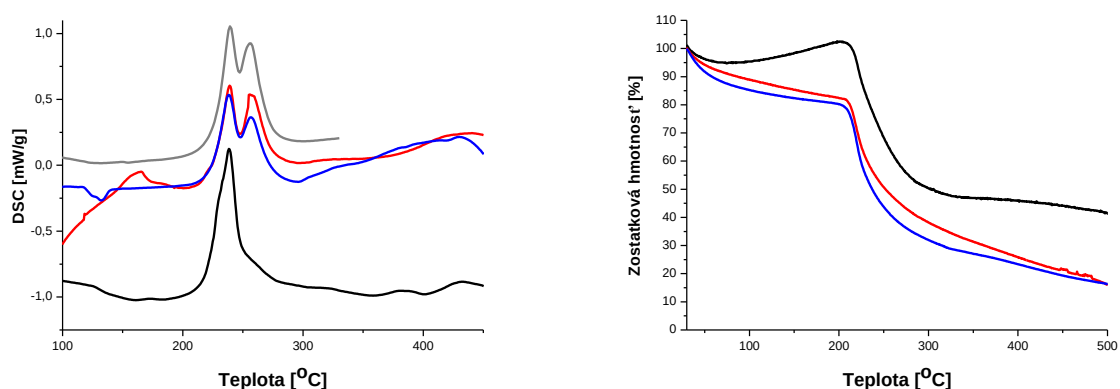
Zistilo sa, že samotný rozsah degradácie HA, ktorý je výsledkom časovo a koncentračne závislého účinku nielen samotného oxidovadla (hydroxylové, alkoxylové a peroxylové radikály), ale aj potenciálneho ochranného účinku látok s obsahom tiolovej skupiny, môže byť ovplyvnený aj tvorbou asociovaných/vetvených, či dokonca sieťovaných štruktúr v dôsledku potenciálnej inkorporácie tiolu do fragmentu HA, čo bolo najviac evidentné v prípade HA modifikovaného účinkom *N*-acetyl-L-cysteínu. Na základe FT-IČ meraní (Obr. 2) možno konštatovať, že výsledný efekt posunu vlnočtu k nižším hodnotám, zvlášť v prípade HA modifikovaného účinkom *N*-acetyl-L-cysteínu, v porovnaní s hodnotou vlnočtu pre intaktný HA je funkciou zmeneného pomeru inter- a intramolekulových vodíkových väzieb ako aj ich vzájomných interakcií v dôsledku jeho modifikácie počas degradačného procesu a tiež samotným typom vysušovacej procedúry po precipitácii z roztoku. Z porovnania výsledkov CL intenzít v dôsledku disproporcionácie peroxylových radikálov (Obr. 3) a výsledkov DSC v dôsledku propagačnej reakcie peroxylových radikálov za uvoľnenia tepla (Obr. 4 vľavo) je zrejmé, že určujúcim procesom počas degradácie HA boli reakcie peroxylových radikálov, resp. dekompozícia hydroperoxidov na alkoxylové a hydroxylové radikály. Táto reakcia je v prevažnej miere zodpovedná za oxidačnú fragmentáciu HA. Metódou DTG (Obr. 4 vpravo) sa zistil nárast hmotnosti v prípade HA modifikovaného účinkom *N*-acetyl-L-cysteínu v teplotnom rozmedzí 100-200°C pravdepodobne v dôsledku tvorby relatívne stabilného konjugátu, resp. sieťovanej štruktúry.



Obr. 2. FT-IČ spektrálne záznamy fragmentov hyaluronanu modifikovaných účinkom endogénnych tiolov: L-cystein (červená), cysteamín (zelená), *N*-acetyl-L-cystein (modrá) a intaktného hyaluronanu (čierna). Vplyv modifikácie hyaluronanu na posun hlavného maxima.



Obrázok 3. Testovanie fragmentov hyaluronanu modifikovaných účinkom látok s obsahom tiolovej skupiny po ich izolácii v suchom stave na obsah hydroperoxidov metódou neizotermálnej chemiluminometrie: v kyslíku (A) a dusíku (B). Koncentrácia aplikovaného tiolu: 100 μ M (pridanie tiolu pred začatím degradácie hyaluronanu): L-cystein (modrá), *N*-acetyl-L-cystein (čierna), cysteamín (červená), intaktný hyaluronan (šedá).



Obrázok 4. Testovanie fragmentov hyaluronanu modifikovaných účinkom látok s obsahom tiolovej skupiny po ich izolácii v suchom stave na obsah uvoľneného tepla pri ohreve vzorky metódou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie v dusíku (vľavo) a na obsah popola metódou diferenciálnej termogravimetrie v kyslíku (vpravo). Koncentrácia aplikovaného tiolu: 100 μ M (pridanie tiolu pred začatím degradácie hyaluronanu): L-cystein (modrá), *N*-acetyl-L-cystein (čierna), cysteamín (červená), intaktný hyaluronan (šedá).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Rychlý, J., Šoltés, L., Stankovská, M., Janigová, I., Csomorová, K., Sasinková, V., Kogan, G., & Gemeiner, P. (2006). *Polym. Degrad. Stab.*, 91, 3174-3184.
- Kafedjiiski, K., Jetli, R. K. R., Föger, F., Hoyer, H., Werle, M., Hoffer, M., & Bernkop-Schnürch, A. (2007). *Int. J. Pharm.*, 343, 48-58.
- Hrabárová, E., Valachová, K., Rychlý, J., Raptá, P., Sasinková, V., Malíková, M., & Šoltés, L. (2009). *Polym. Degrad. Stab.*, 94, 1867-1875.
- Hrabárová, E., Valachová, K., Juránek, I., & Šoltés, L. (2012). *Chem. Biodivers.*, 9, 309-317.
- Hrabárová, E., Rychlý, J., Sasinková, V., Valachová, K., Janigová, I., Csomorová, K., Juránek, I., & Šoltés, L. (2012). *Cellulose*, 19, 2093-2104.

Voľnoradikálová degradácia vysokomolekulového hyaluronanu indukovaná askorbátom a iónmi medi. Hodnotenie antioxidačného účinku derivátov L-cysteínu.

Eva Hrabárová*, Katarína Valachová, Ivo Juránek a Ladislav Šoltés

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

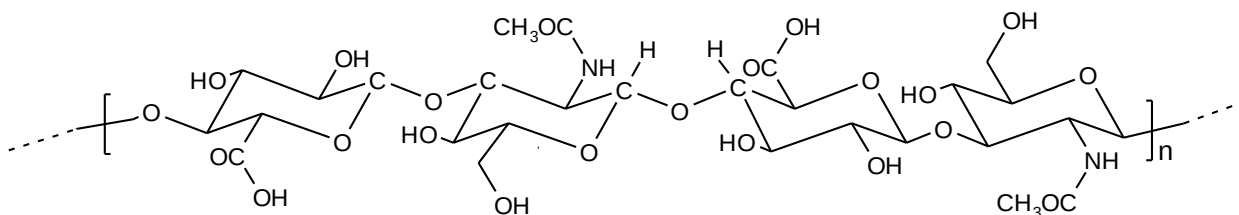
*chemhra@savba.sk

Kľúčové slová

Hyaluronan, Weissbergerov biogénny oxidačný systém, tioly

Úvod

Keďže pokles viskozity synoviálnej tekutiny môže byť primárnou príčinou zvýšenej erózie chrupaviek, cieľom práce bolo experimentálne modelovať (per)oxidačnú degradáciu vysokomolekulového biopolyméru – hyaluronanu (HA; Obr. 1) pôsobením reaktívnych foriem kyslíka v podmienkach *in vitro*. Navrhol sa preto chemický model simulujúci počiatočnú fázu akútneho zápalu synoviálneho kĺbu aplikáciou Weissbergerovho biogénneho oxidačného systému {askorbát *plus* Cu(II)}, ktorým sa indukovala voľnoradikálová degradácia HA. Navrhol sa tiež model ochrany HA pred jeho nežiadúcou degradáciou aplikáciou endogénnych látok s obsahom tiolovej skupiny – derivátov L-cysteínu (L-glutathion, cysteamín, N-acetyl-L-cystein a L-cystein) – v úlohe potenciálnych zhášačov hydroxylových, alkoxylových a peroxylových radikálov.



Obr. 1. Kyselina hyalurónová

Materiál a metódy

Na štúdium degradácie HA sa použili dva komerčné preparáty – P9710-2A ($M_w = 808,7$ kDa; $M_w/M_n = 1,63$) a P0207-1 ($M_w = 1070$ kDa; $M_w/M_n = 1,60$) – dar od výrobcu *Lifecore Biomedical Inc.*, Chaska, MN, U.S.A. Roztoky hyaluronanu (2,5 mg/ml) sa pripravili v 0,15 M NaCl. Na prípravu všetkých roztokov bola použitá deionizovaná voda s vysokým stupňom čistoty a s vodivosťou $\leq 0,055$ $\mu\text{S/cm}$ – produkt TKA systému na čistenie vody – *Water Purification Systems GmbH*, Niederelbert, Nemecko. Všetky ostatné roztoky boli tiež pripravené v 0,15 M NaCl.

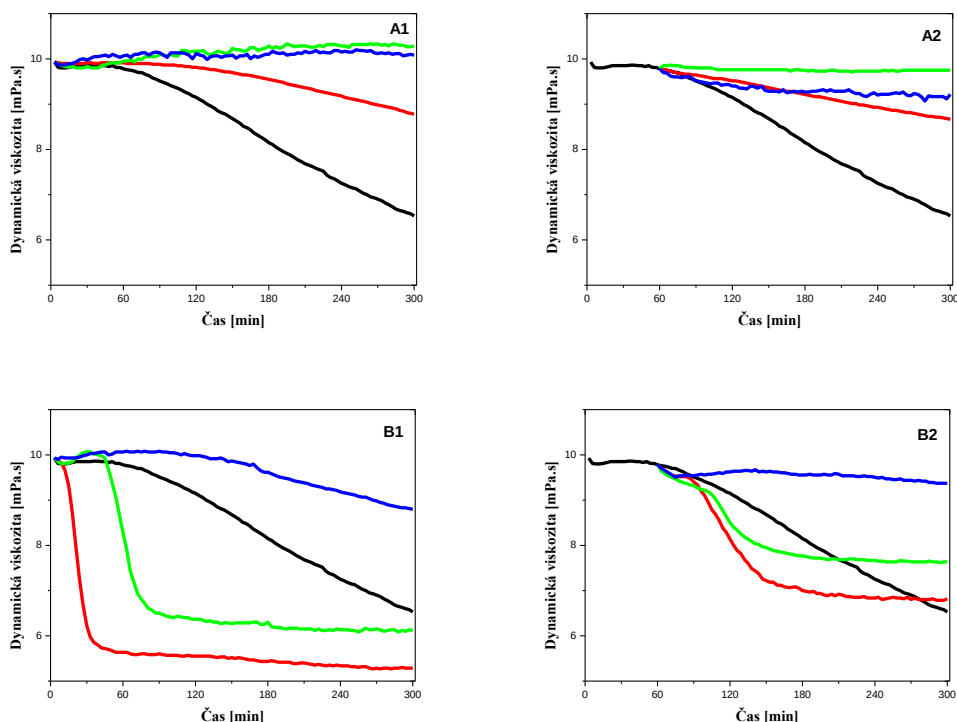
Na štúdium tzv. neinhibovanej degradácie hyaluronanu indukovanej účinkom $\bullet\text{OH}$ radikálov sa použil Weissbergerov oxidačný systém {askorbát *plus* Cu(II)}. Koncentrácie askorbátu a Cu(II)

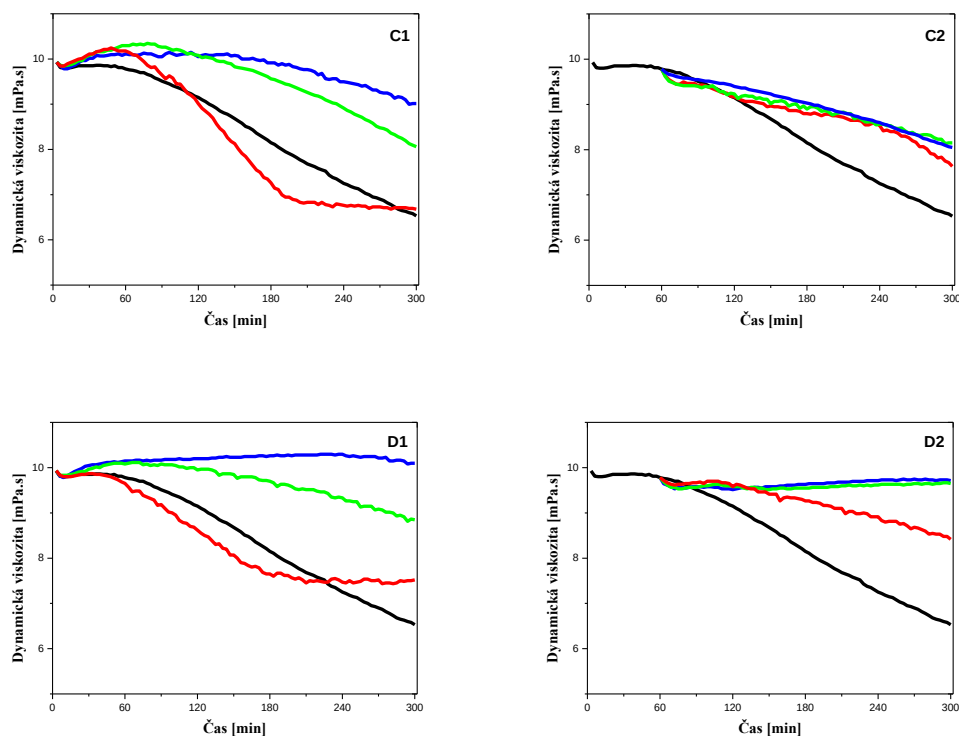
iónov v reakčnom roztoku (8,0 ml) boli 100 μM a 1,0 μM . Testovanie tzv. inhibovanej degradácie hyaluronanu *in vitro* spočívalo v dávkovaní antioxidantu do reakčného systému, buď na začiatku experimentu alebo po 1. hodine. Endogénne tioly – deriváty L-cysteínu – sa zakúpili od výrobcu *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim, Nemecko. Pripravili sa s aktuálnymi koncentráciami 25, 50 a 100 μM . Výsledná reakčná zmes (8,0 ml) sa preniesla do viskozimetrickej nádoby typu *Teflon*[®] rotačného viskozimetra typu *Brookfield LVDV-II+PRO* (*Brookfield Engineering Labs., Inc.*, Middleboro, MA, U.S.A.). Zmeny v hodnotách dynamickej viskozity (η) reakčného systému sa merali pri $25,0 \pm 0,1$ °C v trojminútových intervaloch po dobu 5 hodín. Vreteno viskozimetra typu *Teflon*[®] rotovalo pri otáčkach 180 rpm, tj. pri šmykovej rýchlosti $237,6 \text{ s}^{-1}$.

Výsledky a diskusia

Zistilo sa, že časovo a koncentračne determinovaný ochranný účinok endogénnych tiolov (inhibičný, prípadne retardačný) voči degradácii HA (Obr. 2) klesal v poradí: L-glutation, cysteamín, *N*-acetyl-L-cysteín a L-cysteín. Paradoxným zistením bolo, že nízkomolekulové tioly pri nízkych koncentráciách v úlohe reduktantov kovov prechodového mocenstva vykazovali skôr pro-oxidačný účinok, urýchľujúci degradáciu HA.

Testované endogénne tioly síce nie sú typickými liečivami, ale sa bežne používajú ako výživové antioxidačné doplnky. Niektoré z nich sa na základe svojho ochranného potenciálu javia perspektívne pre prípadné testovanie v *in vivo* podmienkach. Z tohto pohľadu naše pozitívne výsledky s týmito látkami možno vnímať ako argument pre ich perspektívne využitie v prevencii a liečbe ochorení sprevádzaných nežiadúcou voľnoradikálovou degradáciou HA ako aj ďalších životne dôležitých biomakromolekúl.





Obr. 2. Vyhodnotenie antioxidačných účinkov endogénnych tiolov – odvodených od L-cysteínu – voči degradácii vysokomolekulového hyaluronanu (P9710-2A; 2,5 mg/ml) indukovanej Weissbergerovým oxidačným systémom *in vitro* po dobu 5 hodín pri 25 °C. Roztoky pripravené v 0,15 M NaCl. Referenčná oxidačná próba (čierna): 100 μM askorbát plus 1 μM Cu(II); nulová koncentrácia tiolu. Dávkovanie tiolu: panel 1 – pred začatím degradácie hyaluronanu; panel 2 – po 1. hodine od začatia degradácie hyaluronanu. Koncentrácie tiolov v μM: červená (25); zelená (50); modrá (100). Panely A1 a A2: L-glutathion; panely B1 a B2: L-cystein; panely C1 a C2: N-acetyl-L-cystein; panely D1 a D2: cysteamín.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Weissberger, A., LuValle, J. E., & Thomas Jr., D. S. (1943). *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 1934-1939.
- Šoltés, L., Stankovská, M., Kogan, G., Gemeiner, P., & Stern, R. (2005). *Chem. Biodivers.*, 2, 1242-1245.
- Schiller, J., Volpi, N., Hrabárová, E., & Šoltés, L. (2011). Chapter 1. Hyaluronic acid: A natural biopolymer. In *Handbook of Biopolymers and Their Applications*, Eds. Kalia, S., & Avérous, L. Wiley & Scrivener Publishing., p. 3-34.
- Hrabárová, E., Valachová, K., Juránek, I., & Šoltés, L. (2012). *Chem. Biodivers.*, 9, 309-317.

Bakteriálne inklúzne telieska ako potenciálne syntetické nástroje na rozpoznávanie patogénu

Klaudia Talafová, Eva Hrabárová, Dušan Chorvát, Jozef Nahálka*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

*nahalka@savba.sk

Kľúčové slová

Bakteriálne inklúzne telieska, glyko-nanomateriály, adhezíny, zelený fluorescenčný proteín, antimikrobiálna terapia

Úvod

Zatiaľ čo živočíšne bunky využívajú glykomický jazyk (tzv. „self-recognition“) pre komunikáciu bunka-bunka, adhezíny patogénnych baktérií používajú tento jazyk pre rozpoznanie oligosacharidov hostiteľskej bunky. Tieto špeciálne proteíny/lektíny sa vyvinuli ako nástroje pre čítanie glykokódu. Asi polovica populácie je infikovaná baktériou *Helicobacter pylori*. Najvýznamnejší adhezín tejto baktérie, SabA (adhezín viažuci kyseliny sialové), sa vybral ako model v boji proti samotnému patogénu. Je známe, že selektívne lokalizovanie lieku v blízkosti miesta jeho účinku má preukázateľné terapeutické výhody, napr. redukovanie toxicity liečiva vďaka nižšej hladine dávkovania. Dnes sa vynakladá významné úsilie na tvorbu reálnych doručujúcich systémov s vlastnosťami glykocieleného smerovania. Nami navrhnuté rekombinantné glyko-nanomateriály, konkrétne tzv. „glyco-tailored“ inklúzne telieska (IT) môžu spĺňať funkciu antimikrobiálnych terapeutík so špecificky glykocieliacimi vlastnosťami voči bakteriálnym patogénom.

Materiál a metódy

Fyziologická agregácia lektínových funkčných domén do aktívnych IT poskytuje jednoduchý prostriedok na čítanie glykokódu vďaka dobre osvedčeným aglutinačným testom. SabA lektín bol naprodukovaný vo forme aktívnych IT, izolovaných z *E. coli*, zavedením vyčleneného génu izolovaného z genomického DNA *H. pylori* tak, aby N-koniec výsledného proteínu bol fúzovaný s celulóza-viažúcou doménou *C. cellulovorans* (CBD_{clos}). Takýto bunkový systém bol kultivačne napropagovaný, centrifugovaný, lyofilizovaný a použitý po lýzovaní a finálnom premytí do PBS pufru (pH 7,0) na izoláciu rekombinantného proteínového konštruktu vo forme IT (sabIT). Podobným biotechnologickým procesom sa pripravil konštrukt gfpIT nesúci tzv. indikátorový proteín (zelený fluorescenčný proteín; GFP) a inteín pomocou zavedenia príslušných génov do *E. coli*.

Na prípravu konjugátov IT nesúcich GFP a inteín s fetuínom (F), resp. albumínom (A) a asialofetuínom (A-F) – oba slúžili ako kontroly – sa použil ako linker glutaraldehyd (0,25%). Na deaktiváciu nezreagovaných aldehydových skupín sa použil glycín a lyzín. Pripravené „tailored“ konjugáty gfpIT-F, resp. gfpIT-A-F/gfpIT-A sa použili na testovanie špecifického rozpoznávania adherentného patogénu (sabIT) prostredníctvom naviazania sa naň v prítomnosti erytrocytov pomocou hemaglutinačno-inhibičnej metódy.

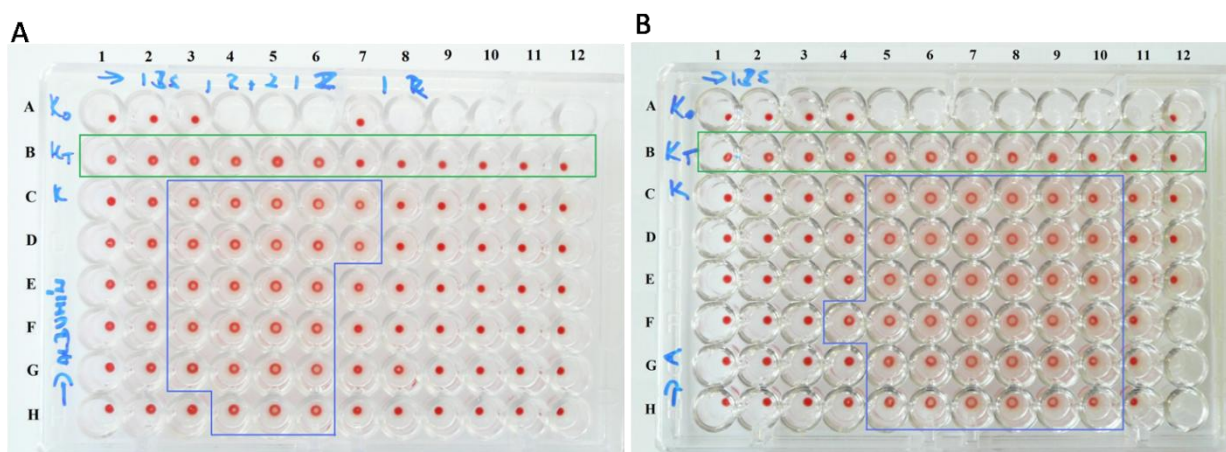
Výsledky a diskusia

V našej štúdii GFP predstavoval liečivo, tj. terapeutikum, zatiaľ čo sialylovaný proteín – fetuín – vo forme gfpIT konjugátu mal za úlohu špecificky rozpoznávať náš modelový SabA adhezín vo forme IT, ktorý

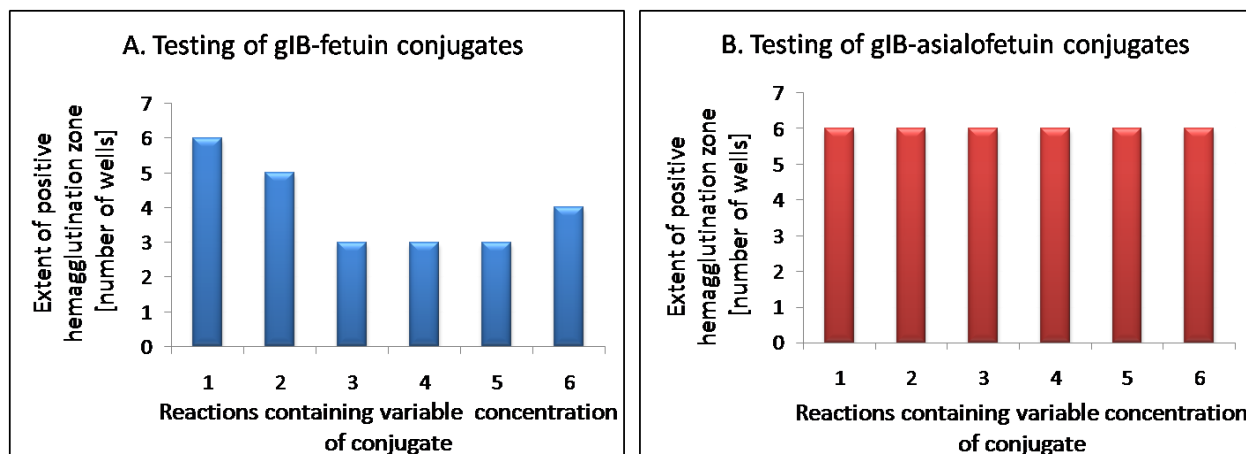
simuloval samotný patogén. Nesialylované proteíny (albumín, resp. asialofetuín) – tiež vo forme gfpIT konjugátu – slúžili ako kontrola kvôli dôkazu špecificity interakcií v závislosti od prítomných sialových kyselín. Erytrocyty s povrchovo naviazanými oligosacharidmi s koncovými sialovými kyselinami predstavovali model tkaniva ľudského žalúdka pre potenciálnu interakciu so SabA adhezínom. Je známe, že tento lektín je zodpovedný za *in vitro* aglutináciu erytrocytov. Zistilo sa, že nekonjugované gfpIT inhibovali pozitívnu hemaglutináciu erytrocytov pravdepodobne v dôsledku hydrofóbných interakcií medzi sabIT a nekonjugovanými gfpIT/konjugovanými gfpIT-A (Obr. 1A), v dôsledku čoho schopnosť sabIT viazať sa na erytrocyty poklesla. Problém sa vyriešil substitúciou nepolárneho glycinu polárnym lyzínom, čím sa docielila významná redukcia hydrofóbnej adhézie medzi konjugovanými gfpIT-A a sabIT, medzi sebou navzájom a tiež na plastický materiál platničky. Táto skutočnosť významne prispela k rozšíreniu zóny pozitívnej hemaglutinácie (Obr. 1B).

Pomocou hemaglutinačno-inhibičného testu sa tiež vyhodnotili inhibičné účinky konjugátov gfpIT-F a gfpIT-A-F. GfpIT-F konjugáty inhibovali, zvlášť pri vyšších koncentráciách, aglutináciu erytrocytov, čo bolo pozorovateľné skrátením zóny pozitívnej hemaglutinácie (Obr. 2A) v porovnaní s kontrolnou vzorkou (sabIT s erytrocytmi, bez konjugátu). Naopak, hemaglutinácia nebola významne ovplyvnená účinkom gfpIT-A-F konjugátov, pretože ako je zrejme z obrázka 2B, hemaglutinačná zóna sa významne nemenila v porovnaní s kontrolnou vzorkou.

Na základe výsledkov sa dá preto predpokladať, že naše „glyco-tailored“ konjugáty vo forme IT môžu takto predstavovať potenciálne nástroje pre špecifické ciele na adhezíny patogénnych buniek a dávkovanie terapeutických proteínov.



Obr. 1. Redukcia hydrofóbných interakcií medzi konjugovanými IT s obsahom GFP (gfpIT) a SabA adhezínom agregovaným do IT (sabIT). A – gfpIT konjugované s albumínom za použitia nepolárneho glycinu na inaktiváciu glutaraldehydu. B - gfpIT konjugované s albumínom za použitia polárneho lyzínu na inaktiváciu glutaraldehydu. Konjugáty gfpIT-albumínu pripravené z 1,25 mg gfpIT a 25 mg albumínu v 400 μ l PBS (pH 7,0) boli 1,5-krát zriedené od línie H do D v 10 μ l PBS. Suspenzia sabIT izolovaná z 10 mg lyofilizovaných transformovaných *E. coli* buniek v 1000 μ l PBS bola zriedená v pomere 1:16 a 1,5- (A) alebo 1,2-krát (B) sériovo riedená od stĺpca 1 do 12 v 15 μ l PBS. Finálne boli jamky titrované s 50 μ l suspenziou erytrocytov. Lína A - negatívna kontrola (erytrocyty v PBS), Lína B (zelený rámček) – interakcia sabIT s nekonjugovanými gfpIT a erytrocytmi, Lína C - kontrolná interakcia sabIT s erytrocytmi. Modrý rámček definuje zónu pozitívnej hemaglutinácie.



Obr. 2. Testovanie pripravených konjugátov gfpIT-fetúinu (A) a gfpIT-asialofetúinu (B) vyhodnotením ich účinku na rozsah pozitívnej hemaglutinačnej zóny. Hemaglutinačno-inhibičný test bol navrhnutý kvôli optimalizácii (Obr. 1). 1 – kontrola (sabIT s erytrocytmi, bez konjugátu), 2-6 – interakcia sabIT s konjugátmi a erytrocytmi; koncentrácia konjugátov gfpIT-fetúinu a gfpIT-asialofetúinu bola 1,5-krát vzostupná od 2 do 6.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Sharon, N. (2006). *Biochim. Biophys. Acta*, 1760, 527-537.
- García-Fruitós, E., González-Montalbán, N., Morell, M., Vera, A., Ferraz, R. M., Arís, A., Ventura, S., & Villaverde, A. (2005). *Microb. Cell Fact.*, 4, 27.
- Nahálka, J., & Nidetzky, B. (2007). *Biotechnol. Bioeng.*, 97, 454-461.
- Nahálka, J., Vikartovská, A., & Hrabárová, E. (2008). *J. Biotechnol.*, 134, 146-153.
- Talafová, K., & Nahálka, J. (2012). *J. Glycomics & Lipidomics*, 2, 1-5.

Bakteriálne inklúzne telieska ako potenciálne syntetické nástroje na uvoľňovanie proteínového terapeutika

Klaudia Talafová, Eva Hrabárová, Dušan Chorvát, Jozef Nahálka*

Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko

Chemický ústav SAV, Centrum excelencie pre bielo-zelenú biotechnológiu, Tr. A. Hlinku 2, SK-949 76 Nitra, Slovensko

*nahalka@savba.sk

Kľúčové slová

Bakteriálne inklúzne telieska, zelený fluorescenčný proteín, inteín, proteáza

Úvod

Pretože bakteriálne inklúzne telieska (IT) majú biologický pôvod, vyznačujú sa mechanickou stabilitou a možnosťou regulácie veľkosti častíc, majú veľký potenciál slúžiť v biomedicíne na dávkovanie terapeutických proteínov vo forme nanočastíc/nanotabliet. Po špecifickom rozoznaní tkaniva či naviazaní sa na bunky patogénu, tieto nanočastice majú byť schopné uvoľniť liečivo, proteínové terapeutikum. IT sú nerozpustné proteínové agregáty, považované len v nedávnej minulosti za odpadný materiál v biotechnologických procesoch. V našej práci sme rekombinantné IT (CBDclos-SrtA-GFP a CBDclos-inteín-GFP) využili na štúdium časovo determinovaného potenciálu uvoľňovania indikátorového proteínu – zeleného fluorescenčného proteínu (GFP) v rozpustnej forme, ktorý predstavuje uvoľňovanie samotného proteínového terapeutika – s použitím samoštiepiacich modulov (sortáza A a Ssp DNAB inteín) pri neutrálnom a kyslom pH. Štiepenie sortázy A malo za následok uvoľňovanie GFP v relatívne krátkom časovom rozhraní, zatiaľ čo štiepenie inteínu trvalo niekoľko týždňov. Tento poznatok má veľký význam z hľadiska perspektívneho využitia rôznych samoštiepiacich modulov pre rôzne terapeutické ciele vzhľadom na selektívne dávkovanie liečiva v závislosti od typu ochorenia.

Materiál a metódy

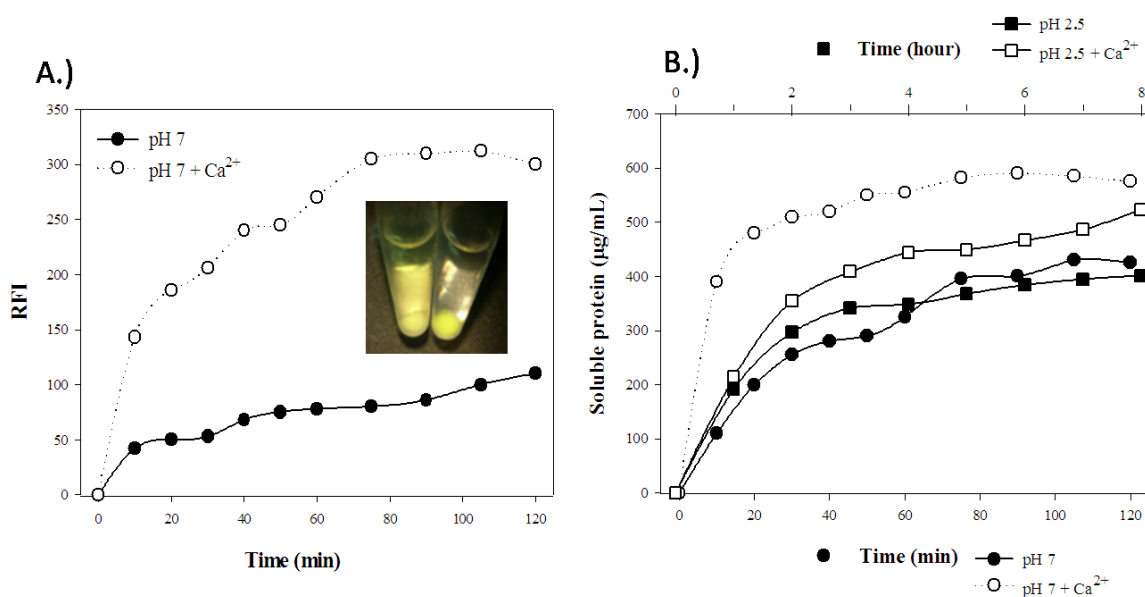
Celulóza-viažúca doména *C. cellulovorans* (CBDclos) slúži na stiahnutie exprimovaných proteínov, meniac ich z rozpustných na nerozpustné pri súčasnom zachovaní aktivity fúzovaného proteínu. GFP predstavuje potenciálne terapeutikum, ktoré by sa mohlo z IT častíc uvoľniť v rozpustnej forme. Samoštiepiace moduly – *S. aureus* sortáza A (SrtA) a Ssp DNAB inteín – boli insertované medzi CBDclos a GFP sekvencie v plazmide pET34b a transformované do *E. coli*. Proteáza SrtA vyžaduje na svoju optimálnu aktivitu prítomnosť Ca^{2+} iónov. Ssp DNAB inteín z *Synechocystis* sp. vykazuje samoštiepiacu aktivitu v závislosti od teploty a pH. Takéto bunkové systémy boli kultivačne napropagované, centrifugované, lyofilizované a použité po lýzovaní a premytí do PBS pufru (pH 7,0) na izoláciu rekombinantných proteínových konštruktov vo forme IT častíc.

V práci sa študovala kinetika uvoľňovania GFP z CBDclos-SrtA-GFP v 50 mM fosfátovom pufru (2,0 mM Ca^{2+} pri pH 7,0; 5,0 mM Ca^{2+} pri pH 2,5) a CBDclos-inteín-GFP v 50 mM Tris pufru (pH 7,0). Vzorky po dôkladnom rozsuspendovaní boli odoberané vždy v rovnakých objemoch v časových intervaloch ako je zrejme z obrázkov 1 a 2, centrifugované a uskladňované pri +4°C. Relatívna fluorescenčná intenzita (RFI; excitačná vlnová dĺžka 482 nm; emisná vlnová dĺžka 502 nm) a absorbancia (A_{280}) boli merané pomocou fluorimetra (BioTek FLx 800TM Multi-Detection Microplate Reader, Germany) a spektrofotometra (Infinite M200 TECAN, Switzerland). Pri kyslom pH sa RFI nemerala v dôsledku odfarbenia GFP, čo bolo spôsobené zmenou konformácie jeho chromoforu protonizáciou amino-skupín proteínov.

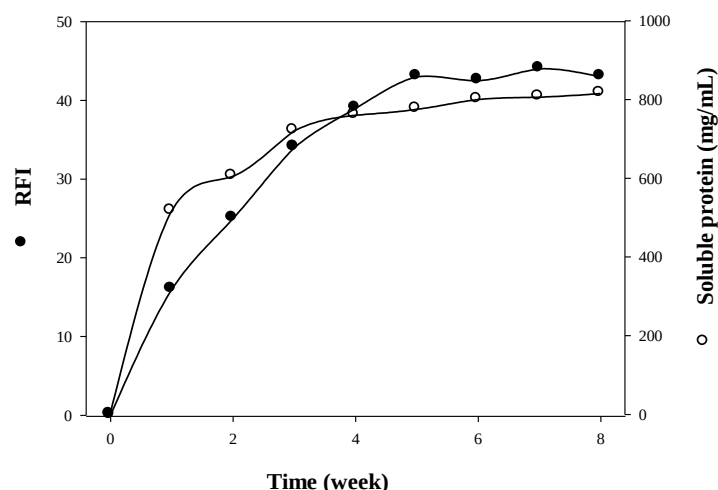
Kolorimetrická metóda na princípe použitia kitu *Total Protein Kit* zloženého z *Biuret Reagent* a *Folin and Ciocalteu's Phenol Reagent* (TP0200 a B 3934, Sigma, Germany) sa použila na stanovenie koncentrácie rozpustných proteínov v 0,85% NaCl. Absorbancia pri 750 nm sa merala pomocou vyššie uvedeného typu spektrofotometra. Koncentrácia proteínu *versus* čas sa vyhodnotila graficky. Celková koncentrácia proteínu v IT pred začatím procesu uvoľňovania GFP v počiatočnom čase t_0 sa vyhodnotila po rozpustení zostatkových IT v 1% SDS. Je pozoruhodné, že CBDclos-inteín-GFP boli oveľa ťažšie rozpustné v SDS v porovnaní s CBDclos-SrtA-GFP.

Výsledky a diskusia

Naše výsledky potvrdzujú, že SrtA proteáza môže účinne uvoľňovať rozpustný proteín GFP z IT pri neutrálnom pH za relatívne krátky čas. Pri kyslom pH, ktoré je charakteristické pre vnútorné prostredie žalúdka, bol progres uvoľňovania GFP evidentne pomalší v porovnaní s podobným procesom pri neutrálnom pH. Na druhej strane, veľmi pomalý proces uvoľňovania GFP (niekoľko týždňov) bol pozorovaný pri testovaní účinku IT s obsahom inteínu. Napriek tomu, že samoštiepiaca kapacita inteínu nie je vhodná na proteínové purifikácie, samotný inteín môže mať veľký význam v biomedicínskych cieľeniach, pretože jeho účinkom podporované a dlhotrvajúce uvoľňovanie terapeutika môže byť veľmi žiaduce napr. pri liečbe chronických ochorení. Naopak, liečba niektorých infekcií vyžaduje okamžité nasadenie vysokých dávok liečiva, indikujúc tak jeho rýchle postupné uvoľňovanie od niekoľkých minút až hodín. Túto situáciu možno dosiahnuť práve využitím samoštiepiacej aktivity SrtA proteázy. V súčasnosti sú popisované rôzne mechanizmy kontrolovaného uvoľňovania liečiv a ich účinnosť závisí od spôsobu ich administrácie ako aj od typu infekcie, či ochorenia. Nami predstavený nový koncept nano-materiálov schopných terapeutického cielenia považujeme za veľmi perspektívny.



Obr. 1. Uvoľňovanie GFP z IT zložených z CBDclos-SrtA-GFP fúzovacieho proteínu. a) Fluorescencia rozpusteného proteínu uvoľnená z IT pri neutrálnom pH. Vložený obrázok zobrazuje zafarbenie supernatantu a sedimentu pred uvoľnením GFP (vpravo) a po jeho uvoľnení (vľavo). RFI - relatívna fluorescenčná intenzita. b) Koncentrácia rozpusteného proteínu uvoľneného z IT pri kyslom a neutrálnom pH. Celková koncentrácia CBDclos-SrtA-GFP fúzovacieho proteínu bola 5,42 mg/ml.



Obr. 2. Uvoľňovanie GFP z IT zložených z CBDelos-inteín-GFP fúzovacieho proteínu. Celková koncentrácia CBDelos-inteín-GFP fúzovacieho proteínu bola 6,86 mg/ml.

Pod'akovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre bielo-zelenú biotechnológiu, ITMS 26220120054, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Nahálka, J., & Nidetzky, B. (2007). *Biotechnol. Bioeng.*, 97, 454-461.
- Mao, H. (2004). *Protein Expr. Purif.*, 37, 253-263.
- Zhao, Z., Lu, W., Dun, B., Jin, D., Ping, S., Zhang, W., Chen, M., Xu, M.-Q., & Lin, M. (2008). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77, 1175-1180.
- Trivedi, R., & Kompella, U. B., (2010). *Nanomedicine.*, 5, 485-505.
- Leekha, S., Terrell, C. L., & Edson, R. S. (2011). *Mayo Clin. Proc.*, 86, 156-167.
- Siegel, R. A., & Rathbone, M. J. (2012). In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. 1st edition. Edited by Siepmann, J., Siegel, R. A., & Rathbone, M. J., Springer. Advances in Delivery Science and Technology 2012, pp. 19-43.