

O konzervování a restaurování památek a studijním programu na chemické škole

Na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze jsme způsobili tak trochu revoluci tím, že jsme získali akreditaci studijního programu „Konzervování – restaurování objektů kulturního dědictví – uměleckořemeslných děl“. Je to studijní program se čtyřmi obory, z nichž tři jsou určeny pro restaurátory, čtvrtý pro chemiky-technologie. Zavedení čtyřletých bakalářských oborů pro restaurátory uměleckořemeslných děl z kovů, skla a keramiky a textilu je v rozporu s tradičním chápáním absolventa VŠCHT Praha, jako víceméně univerzálního, technicky a přírodovědně vzdělaného chemika, bez ohledu na vystudovanou fakultu či obor. Za rok budou tedy mezi absolventy – bakaláři i takoví, kteří nebudou mít vzdělání určené pro práci chemika v průmyslu, projekci nebo výzkumu. Proč to děláme? Protože máme na škole dlouhou tradici ve výuce technologie obnovy památek a také nás k tomu vedl přetrvávající empirismus v oblasti konzervování a restaurování památek. Příčinou také je, že oblast restaurování uměleckořemeslných děl nebyla dosud v České republice, na rozdíl od malířských a sochařských děl, pokryta vysokoškolským vzděláním.

Příčinou, proč památky chátrají, je velmi často fyzikálně-chemická přeměna materiálu. A znalost mechanismu této přeměny je cestou k racionálnímu způsobu ochrany. Také postupy restaurování a konzervování hmotných památek i jejich průzkumy jsou s chemií velmi úzce spojeny. To všechno má na naší škole velké teoretické zázemí. Vzdělání prímých restaurátorů je podle našich představ postaveno na třech pilířích. Jsou to praktické řemeslné a výtvarné dovednosti, dále přírodovědné, materiálové a technologické znalosti a teoretické humanitní a výtvarné vzdělání. Nejde nám o výuku univerzálních odborníků, jak nám někteří podávají, ale odborníků, kteří jsou v oblastech souvisejících přímo s restaurováním solidně vzdělání, především pro zdárnou komunikaci se specialisty, jako jsou chemici, historici umění a další.

VŠCHT Praha sama nemůže nabídnout výuku řemeslných a výtvarných dovedností a tak při výuce čtyřletých oborů spolupracujeme se specializovanými vyššími odbornými školami, a Akademií výtvarných umění. Výuka humanitních předmětů je pak zajišťována ve spolupráci s fakultami Univerzity Karlovy a s externisty.

Nepřipravoval jsem tento studijní program sám, ale beru na sebe odpovědnost jak za jeho zavedení, tak i za problémy s ním spojené. Někteří z kolegů stále považují nový studijní program za něco, co je pod úroveň naší školy. Nedůvěřují totiž tomu, že řemeslně zdatní absolventi středních uměleckých škol jsou schopni dosáhnout přírodovědné vzdělání na dostatečné úrovni. Myslím si ale, že jejich nedůvěra tak trochu souvisí s chemickým elitářstvím, lehce pohrdavým přístupem k řemeslným a výtvarným dovednostem a nakonec i k chemickým a materiálovým technologiím.

Osobně jsem poprvé nahlédl do světa restaurování a konzervování památek teprve před dvanácti lety v souvislosti s přípravou restaurování jezdecké sochy Jiřího z Poděbrad. Socha byla tehdy v zoufalém stavu z řady důvodů. Jedním z hlavních byla absence jakékoli údržby sochy a nekvalifikovanost oprav v poválečném období. Od té doby jsem se ve světě konzervování a restaurování památek mnohému přiučil, ale také mnohému podívil. Co běžných poznatků ze světa technických aplikací může být novinkou ve světě konzervování a restaurování! Novinkou pro mne také byly poměry, které panují na pomezí umění, humanitních disciplín a technologií, kde se střetávají zcela různé způsoby myšlení, kde se racionální uvažování potkává daleko častěji než v přírodovědných a technických disciplínách s dogmatizmem a s iracionalitou. Potkal jsem se s prací nejen vynikajících, řemeslně zdatných a trpělivých restaurátorů, ale i s produkcí pajzráků (tak říkal mechanik našeho ústavu lidem s pokleslými řemeslníckými výkony) i se samozvanými „odborníky“.

Nahlédl jsem i do světa vágních termínů, kde se vedou nekonečné dohady i o vymezení samotných pojmů konzervování a restaurování památek. Podle mne se jedná o dvě různé, i když související činnosti. Samotné konzervování, nyní módně dělené na preventivní a sanační, je součástí každého restaurátorského zásahu. V případě tzv. preventivní konzervace (což pokládám za nelogické slovní spojení) se jedná o soubor často jen organizačních opatření, k potlačení negativních vlivů prostředí bez zásahu do vlastního předmětu. Dělat takovouto samozřejmou „konzervaci“ může podle předpisu a po krátkém zaškolení téměř kdokoli, a to i bez řemeslných či výtvarných dovedností. Sanační konzervace, rozuměj ta trosek tradiční konzervace, je pak soubor postupů, které přímým zásahem na předmětu zajistí, bez ohledu na jeho původní užitnou hodnotu, jeho další prostou existenci. Bohužel konzervace sama o sobě, je většinou příprava předmětu na cestu do regálu depozitáře, kam už běžný občan nemůže.

Na rozdíl od konzervování, je restaurování vždy vysoce kvalifikovaná činnost lidí s dovednostmi dosahujícími z řemeslného hlediska dovednosti přímého tvůrce, tedy člověka, který svými rukama dílo vytvořil. Restaurování uměleckých i uměleckořemeslných děl zvyšuje jejich hodnotu, neboť z poškozených předmětů a trosek vytváří srozumitelná díla a prodlužuje jejich životnost. Samozřejmě, že většinou není cílem obnova původního stavu, ale obnova užitné hodnoty nebo jen celistvosti, kdy předmět nese přiměřené stopy svého stáří. Je to obnova užitné hodnoty a srozumitelnosti pro nyní žijící i budoucí generace lidí. Jedná se o obnovu podle pravidel o vratnosti restaurátorského zásahu a jeho odlišitelnosti, s vědomím, že někdy méně je více.

Z dílny muzeologických ideologů pochází tvrzení, že při restaurování vždy dojde k redukci „komplexní hodnoty

předmětu“. Tím nepřímou říkají, že jak u uměleckých a uměleckořemeslných děl, tak technických a stavebních památek pohrdají původní užitnou hodnotou předmětu a pohrdají i jejich tvůrcem. Zub času, činy vandalů a ignorantů jsou pro ně nedílnou součástí komplexní hodnoty díla, nikoli už původní poslání předmětu. Nevím, jestli si skutečně myslí, že zrezivělý otlučený automobilový vrak ve stodole se slepicemi je autentičtější a má vyšší komplexní hodnotu, než fungující a do téměř původního stavu zrestaurovaný automobil.

Oblast restaurování i konzervování je také světem profesních kodexů, světem výmluvných i mnohomluvných dokumentů o etice nakládání s památkami, je i světem pokrytectví, snah diskvalifikovat konkurenci zakládáním spolků, asociací, komor, komisí. Světem, který se občas zaklíná vědeckým přístupem a přitom nerespektuje principy vědecké práce. Světem se zaklínadly, jako jsou velmi vágně definované pojmy „autenticita“, „komplexní hodnota“, „estetická či historická integrita“. Slova „životnost“ nebo „užitná hodnota“ nenajdete v žádném kodexu pro restaurování a jejich užívání mne v tomto prostředí zařazuje mezi podezřelé technokraty. Stačí také místo termínu „restaurování“ použít český ekvivalent „obnova“ a jste pokládán za nehodného spolupodílet se na záchraně něčeho tak posvátného jako je umělecké dílo.

V oblasti památek, uměleckých děl se operuje často s termínem „nevyčíslitelné hodnoty“, ale když dojde třeba i jen na běžné technické opatření, ukáže se, že nejsou peníze nebo zájem. Bronzová socha světce na Karlově mostě například nestojí majiteli za to, aby šrouby z korozivzdorné oceli, držící svatozář, byly povrchově upraveny a řádně dotaženy a utěsněny proti zatékání srážkové vody do vnitřku sochy. Pro zajímavost tato socha byla restaurována v roce 1989 akademicky vzdělaným umělcem, který ji potřel sirtými játry a svatozář, obalenou plátkovým zlatem, upevnil přes stržený závit do ramen sochy obyčejnými, povrchově neupravenými ocelovými šrouby ze železářství. Navíc prohlásil, že bronzová socha „začíná práškovařit a na základě poréznosti se mění i modelace povrchu“, což volá po urychleném uložení do deponitáře. Samozřejmě, že navrhoval vyrobit kopii k umístění pro lid na most. Šlo o podvod, ten člověk byl sice materiállový a technologický analfabet, ale že té soše nic není a může i nadále plnit své původní poslání, musel poznat i on.

Další „nevyčíslitelnou hodnotou“ je jistě nejznámější česká bronzová socha na nejznámějším pražském náměstí. Doznala od šedesátých let újmy na vzhledu povrchu a tak ji bylo třeba před nedávnem očistit. A protože je obvyklé, že na údržbu „nevyčíslitelné hodnoty“ nejsou peníze, jsou vítány peníze sponzorské. Za financování rutinního zásahu, který spočíval v očištění, dopatinování a navoskování povrchu sousoší a v očištění a navoskování podstavce,

bylo sousoší zahaleno déle než rok billboardy s reklamou zahraniční firmy, která nemá s restaurováním nic společného, ale shodou okolností se jmenuje stejně jako hřeben, který stál sochařovi modelem. Za dlouhou dobu, po kterou se dělal průzkum a „restaurovalo se“, se tak dostala reklama firmy na statisíce fotografií návštěvníků Prahy z celého světa. Byl to dobrý kšeft pro firmu a velká příležitost i pro medializaci restaurátorů, kteří se na této komedii podíleli. Šlo stranou, že sousoší je na náměstí z důvodů historických a estetických pro všechny občany tohoto státu a jeho návštěvníky. Co na tom, že jsme se museli zbytečně dlouhou dobu dívat na hadry s reklamou a bylo nám odepráno právo na užitnou hodnotu sousoší. Zdá se, že podobná komedie, jen s jinými aktéry, se bude odehrávat i s jinými pražskými památkami. V těchto případech bych uvítal jasné formulace etického kodexu se sankcemi pro restaurátory i další odpovědné pracovníky, kteří se na podobných neetických hrátkách podílejí.

I zchátralé Trigý na Národním divadle mají jistě „nevyčíslitelnou hodnotu“. Ale jakmile se majitelé dozvěděli, že ještě na Národní třídu nespádnou, byly ihned peníze na restaurování provizorně staticky zabezpečených sousoší přesunuty jinam a do Trigý dále zatéká a železné konstrukce v podstavcích rezaví vesele dál.

Výsledky různých analýz dodávají restaurátorské zprávě vědeckosti, zvláště jsou-li přiloženy křivky a numera vystupující ze sofistického přístroje. Že z nich pro restaurátora a historika umění často nic neplyne nevádí, prý to děláme pro budoucnost. A tak se stále analyzují patiny na kdekjaké populární měděné či bronzové památce a je nalézán opakovaně brochantit s antleritem, a když se při odběru vzorku narazí na místo s holubími exkrementy, tak samozřejmě i něco jiného. Míra samoučelnosti je v tomto a dalších případech velká.

Uvedl jsem zde pro ilustraci některé negativní příklady ze světa konzervování a restaurování památek, na který se snažíme připravit naše studenty. Věřím, že v budoucnu to budou oni, kteří napomohou správným řešením díky svému vzdělání a racionálnímu uvažování. Také doufám, že při vědomí své odbornosti nebudou mít zapotřebí dopouštět se nesolidního jednání. Jsem přesvědčen, že pokud bude zručný restaurátor či konzervátor přiměřeně vzdělán, a to jak technologicky, tak humanitně a veden k racionálnímu uvažování, bude dobře dělat svou práci. Nebude to práce pro uchovávané předměty, ale práce pro žijící i budoucí generace lidí, kteří se s objekty kulturního dědictví setkávají a budou setkávat. Bez lidí, pro které památky mají užitnou hodnotu, kterým poskytují historickou informaci nebo zprostředkují umělecké sdělení, nemá totiž konzervování ani restaurování žádný smysl.

Pavel Novák

NOVÉ POZNATKY O VÝSKYTU A MOŽNÉM PŮVODU PŘÍRODNÍCH UHLOVODÍKŮ V ČESKÉM MASÍVU

VÁCLAV SUCHÝ^a, MICHAL STEJSKAL^b,
ANTONÍN ZEMAN^c, IVANA SÝKOROVÁ^d,
JIŘÍ KROUFEK^b, GUSTAV ŠEBOR^b
a JOSEF JANKŮ^e

^a Jiránkova 1136/4, 163 00 Praha 6, ^b Ústav technologie ropy a petrochemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^c Josefa Suka 1258/3, Brandýs nad Labem 250 01, ^d Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, v.v.i., V Holešovičkách 41, 182 09 Praha 8, ^e Ústav technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
Jiri.Kroufek@vscht.cz, Michal.Stejskal@vscht.cz,
josef.janku@vscht.cz

Došlo 9.11.06, přijato 18.5.07.

Klíčová slova: ropa v Českém masívu, původ české ropy, migrace uhlovodíků, migrační cesty

Obsah

1. Úvod
2. Lineární zóny s výskytem uhlovodíků
3. Variabilita přírodních uhlovodíků
4. Pozdní migrace uhlovodíků
5. Pokračující emise methanu a uhlovodíkových plynů
6. Migrační cesty a možné zdroje uhlovodíků
7. Závěry

1. Úvod

Je obecně známým faktem, že Česká republika nevlastní žádná významnější ložiska ropy ani zemního plynu. Nevelké zásoby jsou v současnosti těženy především v tradičních oblastech jižní Moravy, moravsko-rakouského a moravsko-slovenského pomezí a jejich podíl na celkové národní spotřebě je zanedbatelný.

Méně známou skutečností ovšem je, že drobné, průmyslově netěžitelné výskyty různých forem živíc lze nalézt i na řadě dalších míst v Českém masívu, často podstatně vzdálených od tradičních oblastí těžby. V posledních letech, s nástupem moderních geochemických a geologických metod, se ukazuje, že tyto zdánlivě nevýznamné, prostorově izolované a většinou drobné projevy, považované až dosud za pouhé mineralogické rarity nebo lokální

vlastivědné zajímavosti, mohou mít mezi sebou hlubší genetickou souvislost, kterou lze využít jako základ nových prospekčních koncepcí.

Během posledních sedmi let jsme uskutečnili rozsáhlou studii o množství drobných uhlovodíkových projevů v různých částech České republiky. Některé dílčí výsledky našich výzkumů byly již publikovány v sérii tematických příspěvků přednesených na konferencích^{1–3}. V této práci předkládáme pokus o širší syntézu získaných poznatků, s důrazem na jejich mezioborovou interpretaci. Tvrdíme, že výskyty přírodních uhlovodíků v Čechách jsou zákonitě soustředěny do několika severojižně orientovaných lineárních zón, pravděpodobně vázaných na hlubší přírodní dráhy, kde periodicky docházelo a nadále dochází k projevům aktivní migrace fluid. Na řadě lokalit koexistují nejméně dvě populace ropných uhlovodíků různého složení a stáří, jež indikují opakované, časově oddělené etapy migrace. Mladší fáze rop migrovaly do hornin překvapivě nedávno, teprve během třetihor nebo kvartéru. Na některých místech lineárních zón dokonce probíhá i dnes aktivní migrace ropy i plynu z neznámých zdrojů k povrchu. Tato zjištění vytvářejí ve svém souhrnu nový, provokativní pohled jak na původ uhlovodíků, tak i na ložiskové perspektivy jádra Českého masívu, který byl až dosud z hlediska ropné a plynové prospekce obecně považován za sterilní a nezajímavé území.

2. Lineární geografické zóny s výskyty uhlovodíků

Detailní rozbor plošného výskytu uhlovodíkových indicií na území Čech ukázal překvapující skutečnost – většina nálezů je soustředěna do pěti zhruba 20–40 km širokých, severojižně probíhajících zón, jež protínají prakticky celé naše státní území a zasahují i do okolních států (obr. 1). Spolu s nálezy ropných uhlovodíků jsou v těchto protažených pásmech soustředěny také výstupy mnoha minerálních a termálních vod a solanky, výrony CO₂, methanu, radonu a helia, typický je i výskyt specifických explozivních typů vulkanických hornin, vázaných na hluboké komínovité přírodní dráhy. Rovněž se zde nacházejí některá nízkoteplotní hydrotermální ložiska, akumulace sladkovodních vápencových tufů a travertinů, křemité impregnace v horninách a projevy tzv. hydrotermálního krasu naznačující alterace karbonátových hornin teplými proplyněnými vzhůru stoupajícími roztoky. Jednotlivé aktivní zóny jsou navzájem pravidelně odděleny zhruba 40–70 km širokými pruhy území, které se jeví jako „sterilní“ oblasti a obecně postrádají výskyty uhlovodíků a další fenomény charakteristické pro aktivní fluidní režim^{4,5}.

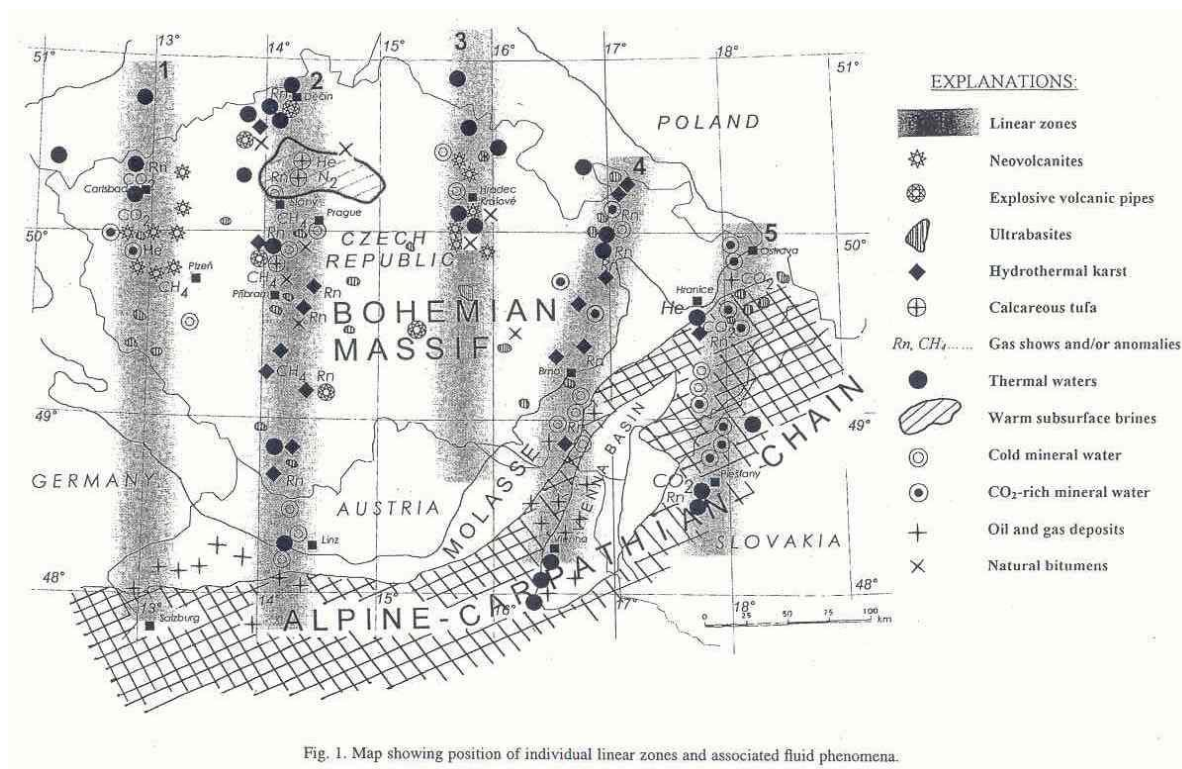


Fig. 1. Map showing position of individual linear zones and associated fluid phenomena.

Obr. 1. Mapka znázorňující polohu jednotlivých severojižních lineárních pásem s přednostními výskyty přírodních uhlovodíků a s dalšími geologickými a hydrologickými fenomény zmiňovanými v textu; upraveno podle Zemana a spol. (2000) (cit.⁴)

Karlovarská lineární zóna

Nejdále na západě Čech jsme vyčlenili tzv. Karlovarskou lineární zónu charakteristickou výstupy horkých minerálních vod, CO₂ a uhlovodíkových a vzácných plynů, která se táhne dále na jih do Rakouska, kde prochází oblastí plynových a ropných polí na sever od Salzburgu.

Pražská lineární zóna

Ve středu našeho státního území leží tzv. Pražská lineární zóna s nálezy drobných projevů ropy a plynu v oblasti Barrandienu a s výskyty teplých solanek, emisemi radonu, helia a methanu a s uranovými a fluoritovými hydrotermálními ložisky. Směrem k jihu tato zóna dále pokračuje do Rakouska do oblasti plynových ložisek u Lince, zatímco její severní pokračování protíná v západním Polsku oblast nedávno objevených ropných a plynových polí Barnówko – Mostno – Buszewo v okolí Debna.

Hradecká lineární zóna

Ve východních Čechách jsme identifikovali tzv. Hra-

deckou lineární zónu s výskytem termálních vod, rud a s nálezy ropy v hlubokých vrtech, která dále pokračuje na sever do Polska, do oblastí plynových ložisek v okolí Lubinu.

Brněnská lineární zóna

Na Moravě lze analogicky vyčlenit tzv. Brněnskou lineární zónu, na níž leží termální prameny, bohaté krasové jevy, některá hydrotermální ložiska, drobné nálezy přírodních bitumenů v horninách a rovněž ekonomicky významná moravská ropná a plynová pole. Další ropná pole leží v jižním pokračování této zóny v Rakousku, v okolí Vídně.

Ostravská lineární zóna

Zcela na východě našeho státu jsme rozlišili tzv. Ostravskou lineární zónu s nálezy plyných i kapalných uhlovodíků a s bohatými výrony CO₂ a helia plášťového původu v oblasti hydrotermálního krasu u Hranic, v jejímž severním pokračování leží menší plynová pole u Katowic v Polsku.

Jednotlivé lineární zóny jsme identifikovali s využí-

tím reinterpretace starších geofyzikálních dat, kosmických snímků a mezioborové analýzy řady geologických a geomorfologických jevů, včetně vyhodnocení množství starších náleзовých zpráv a archivních materiálů^{4,6}.

Stáří lineárních zón

Geologické stáří lineárních zón, soudě podle datování doprovodných vulkanických těles, je nejméně 15 mil let. Vlastní lineární stavby však zřejmě představují podstatně starší, pravděpodobně dlouhodobě a opakovaně reaktivované hluboké struktury, neboť procházejí jak mladými pokrývkami sedimenty, tak i geologicky daleko staršími strukturami variskými a patrně i prekambričnými. Fyzikální podstata popsaných equidistančních lineárních zón, které nejsou patrné na obvyklých zeměpisných nebo geologických mapách, zůstává v dané etapě výzkumu otevřenou otázkou. Některé úseky těchto struktur zřejmě odpovídají známým hlubokým zlomům severojižního nebo severoseverovýchodního směru; obecně však není prostorová korelace lineárních zón se známými tektonickými poruchami ideální. Asociace geologických jevů vázaných na oblasti lineárních zón nicméně dokládá, že zde v minulosti periodicky probíhala nebo místy stále probíhá aktivní migrace hlubinných fluid. Je tedy možné, že lineární zóny ve skutečnosti nepředstavují tektonické zlomy, ale spíše pásma horizontálních napětí v zemské kůře se zvýšenou horninovou propustností⁷.

Analogické zóny ve světě

Naprostu analogické, v ploše se pravidelně opakující equidistanční systémy severojižních zón byly již dříve zjištěny na ohromných plochách Arábie, Afriky a Ruska, kde jsou s nimi spojena velká ložiska uhlovodíků⁷⁻⁹. Pererova⁷ na základě analýzy rozsáhlého materiálu ze severní Eurasie dovozuje, že tyto struktury jsou povrchovým výrazem globálního celoplanetárního systému napěťových polí Země, jež vzniknul v důsledku kosmogenních sil, zejména zemské rotace a složité interakce s fyzikálními poli okolních planet. Typickou periodickou pravidelností, s níž se jednotlivá lineární pásma opakují na rozsáhlých územích, vysvětluje tento autor vlnovým charakterem zemského napěťového pole.

3. Variabilita přírodních uhlovodíků

Na řadě lokalit v rámci severojižních lineárních zón jsme zaznamenali celou škálu přírodních uhlovodíků včetně klasických kapalných rop a produktů jejich tepelné nebo oxidační přeměny – pevných i polotuhých bitumenů. Na některých jiných lokalitách jsme zjistili i přítomnost uhlovodíkových plynů.

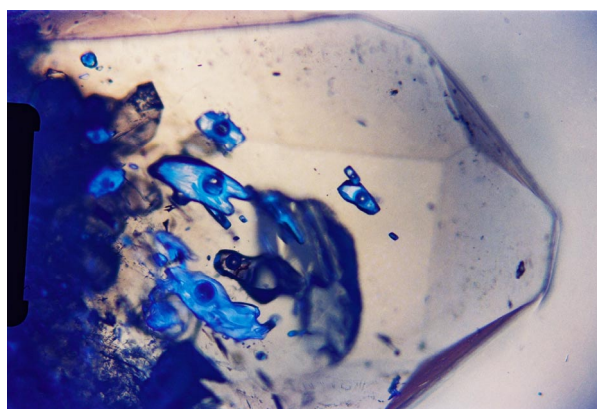
Kapalné ropy

Makroskopické indicie kapalné ropy se typicky vy-

skytují v sedimentárních horninách, kde tvoří součást výplní minerálních žil, potahují v podobě tenkých filmů plochy tektonických puklin, nebo vyplňují dutiny uvnitř diagenetických kongrecí i některých specifických zkamenělin. Tyto drobné dutiny s uhlovodíky zjevně představují svérázné „geochemické konzervy“ uvnitř sedimentárních vrstev, kde ropa byla dlouhodobě uchráněna před oxidací. Získané ropné vzorky jsou zpravidla vysoce těkavé, modře nebo zeleně fluoreskující kapaliny s výrazným petrolejovým zápachem (obr. 2). Velké množství uhlovodíkových směsí proměnlivého složení jsme našli i ve formě velmi drobných útvarů uzavřených přímo v některých horninových minerálech, především v křemenu a kalcitu. Tyto tzv. plynokapalné uzavřeniny (fluid inclusions) představují mikroskopické relikty původních uhlovodíků (obvykle průměru < 0,5 mm), jež kdysi migrovaly horninami a byly



Obr. 2. Zelenavá viskózní kapalná ropa v dutině velké kongrece ze silurských břidlic, lom Kosov u Berouna, Barrandien, pražská lineární zóna



Obr. 3. Krystal záhnědového křemene s dobře viditelnými uzavřeninami plynokapalných uhlovodíků zachycenými uvnitř krystalu; většina uzavření obsahuje modrofialově fluoreskující kapalnou ropnou fázi a v jádru nefluoreskující plynovou bublinu. Tmavé nepravidelné útvary u kořene krystalu jsou pravděpodobně pevné bitumeny. Lom Kosov u Berouna. UV-excitace kombinovaná s bílým procházejícím světlem; přirozená velikost krystalu cca 1 cm

zachyceny během souběžné krystalizace hostitelských minerálů. Uvnitř některých krystalů, zejména křemene, lze často rozlišit i několik koexistujících fází kapalných, pevných a plyných uhlovodíků (obr. 3). Studium podobných uzavřenin poskytuje unikátní informaci o původním chemickém složení horninových fluid i o teplotních podmínkách jejich zachycení¹⁰. Chemicky jsou ropné vzorky – jak volně nalézané kapaliny, tak i extrakty mikroskopických uzavřenin z horninových minerálů – navzájem dosti podobné. Jedná se většinou o nízkomolekulární alifatické uhlovodíky s převahou *n*-alkanů, v rozsahu C₉–C₃₆, které jsou typické pro normální ropy.

Bitumeny

Jinou formou přírodních uhlovodíků, často nalézanou na řadě lokalit uvnitř jednotlivých lineárních zón, jsou variabilní pevné a polotuhé organické hmoty souborně označované jako bitumeny. Například v oblasti příbram-



Obr. 4. Starší generace černého, pevného, smolně lesklého asfaltického bitumenu v dutině silurského vápence, Žákův lom, Velká Chuchle, Praha



Obr. 5. Mladší generace vazelinovité organické hmoty vyplňující drobnou žílu v silurském vápenci, Černá roklička u Barrandovy skály, Praha; přirozená velikost vzorku cca 2 cm

ských uranových dolů, ležících na pražské lineární zóně, jsou již delší dobu známy látky bitumenní povahy, v literatuře popisované jako anthraxolity¹¹. Starší generace těchto organických hmot se zvýšenými obsahy uranu a kovů jsou tvrdé a křehké substance, zatímco mladší, tzv. kapénkový typ je měkký a asfaltický a neobsahuje uran. Tento poznatek naznačuje, že jde o radiačně degradované asfaltické pozůstatky nejméně dvou generací ropy, přičemž další aktivní projevy oné mladší ropy byly v dolech pozorovány i v nedávném období těžby uranové rudy (ropný zápach, syčivé úniky a výbuchy methanu). Důlní vody západočeských uranových dolů navíc obsahují také chloridy a bromidy a přibližují se tak svým složením vodám mořského typu doprovázejícím ropu³. Dvě vzhledově i chemicky odlišné generace organických hmot jsme rovněž zjistili, podobně jako na příbramsku, i na jiném místě pražské lineární zóny – v oblasti středočeského Barrandienu. Zde se v horninách často vyskytuje černý, smolně lesklý, nefluoreskující asfaltický bitumen s křehkým lasturnatým lomem, obsahem uhlíku > 80 % a s optickou odrazností mezi 0,8 až 2,0 % R_r (obr. 4). Relativně mladší generaci organické hmoty představují v Barrandienu oranžové až hnědé, polotuhé, vazelinu připomínající látky s relativně nižším obsahem uhlíku (60–80 % C), s výraznou fluorescencí a nízkou optickou odrazností zpravidla nepřevyšující 0,8 % R_r (obr. 5). Chemicky jsou tyto vazelinovité organické hmoty tvořeny velmi dlouhými alifatickými alkany. Je pravděpodobné, že oba popsané typy organických hmot představují rovněž, podobně jako na příbramsku, pozůstatky dvou rop, resp. dvou různých starých migračních fází¹².

4. Pozdní migrace uhlovodíků

Na základě studia optické odraznosti a ze strukturálních vztahů lze usuzovat, že starší fáze ropných uhlovodíků na pražské lineární zóně migrovaly do hornin pravděpodobně již v paleozoiku. Tyto uhlovodíky byly následně během variského orogenního cyklu vystaveny zvýšeným teplotám kolem 100 °C a přeměněny na pevné bitumeny asfaltického až antracitického vzhledu. Naproti tomu, migrace mladší, teplotně méně přeměněné fáze kapalných rop a polotuhých uhlovodíků proběhla relativně později, zřejmě až během třetihor nebo čtvrtohor, nebo dokonce, na některých místech ještě stále probíhá dodnes. Suchý a spol.^{13,14} a Melka a spol.¹⁵ zkoumali systém severojižních kalcitových žil s inkluzemi kapalných uhlovodíků, jež prostupují prakticky celou barrandienskou oblast. Zjistili, že žilný kalcit krystalizoval z teplých (do 70 °C) a salinních vodních roztoků s příměsí ropy, přičemž ze strukturálních vztahů odvodili, že žilný systém sám nevzniknul dříve, nežli v pokřídovém období. Existenci relativně velmi mladé migrační fáze v Barrandienu silně podporují i nálezy kapalných rop v mělkých průzkumných vrtech a dokonce i v mnoha starých povrchových lomech a na přirozených výchozech, jež byly po desetiletí vystaveny přímému slunci a zvětrávání. S ohledem na značnou rychlost, s jakou

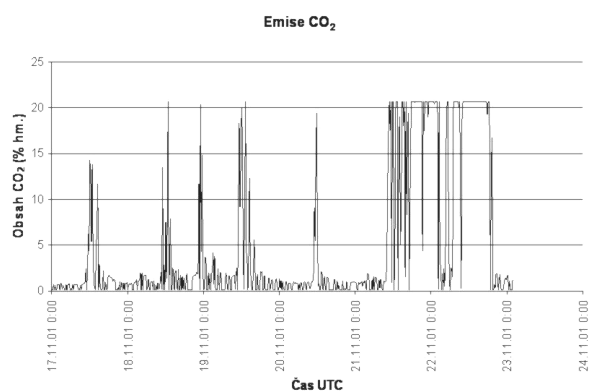
vzorky čerstvých rop na povrchu podléhají oxidaci, odparu nízkovroucích frakcí a mechanické erozi, je tato skutečnost přinejmenším zarážející a implikuje nutnost stálého přínosu čerstvých uhlovodíků k povrchu. Na některých povrchových lokalitách v Barrandienu je během teplých slunečných dnů dokonce cítit slabý petrolejový zápach a při pečlivém pozorování skalních stěn lze spatřit i drobné výrony kapalných nebo polotuhých živic, prýstičích z puklin, což ukazuje, že migrace dosud stále probíhá. Rozsáhlou, a geologicky zřejmě nedávnou migraci termicky nezralých uhlovodíků do barrandienských hornin naznačila i nedávná revizní geochemická studie 2,7 km hlubokého vrtu Tobolka-1. Ukázalo se, že v tomto vrtu jsou paleozoické horniny obohaceny tepelně nezralou rozpustnou organickou hmotou, jejíž množství dokonce stoupá, zdánlivě nelogicky, směrem do podloží, a která do hornin musela nutně přimigrovat z nějakého neznámého zdroje¹⁶. Rovněž v jižní části pražské zóny, v silně proměněných grafitických horninách Moldanubika, jsme nedávno zjistili přítomnost tepelně nezralých lehkých uhlovodíků, které sekundárně namigrovaly do dnešních grafitů, které jsou pravděpodobně také ropného původu¹⁷. Podobná situace byla nedávno zjištěna i v superhlubokém vrtu KTB v Německu nedaleko našich západních hranic, kde z hloubky okolo 4000 metrů byly ze silně metamorfovaných krystalických hornin získány přítoky Ca-Na-Cl rosolů s příměsí nezralých uhlovodíků¹⁸. Všechna tato pozorování tedy ve svém souhrnu naznačují podstatný fakt, že v oblasti České masívu zřejmě proběhla v geologicky nedávné minulosti rozsáhlá migrace uhlovodíků, spojená s mobilizací značných objemů salinních roztoků. Je možné, že tento proces souvisel se závěrem alpské orogeneze, když se před 30–40 mil let Český masív začal mohutně vyklenovat a stoupat v důsledku alpských deformačních tlaků. Při tom se možná reaktivovaly starší systémy severojižních zlomů a lineárních zón, po nichž migrovala hlubinná fluida s uhlovodíky¹⁴. V dané souvislosti je zajímavé, že k podobným závěrům dospěli již před lety nezávisle Chmelík a spol.¹⁹, kteří zmiňovali „regionální migraci živic, jež postihla Český masív v terciéru“ a vyslovili i názor, že živice přitom využily stejné migrační cesty jako uranové rudní roztoky. Ščeglov²⁰ dokonce zjistil, že aktivizace starých platformních struktur, vázaná na dlouho žijící hlubinné zlomy, kolem nichž se koncentruje nízkoteplotní hydrotermální mineralizace (ložiska uranu, manganu, fluoritu apod.), představuje v podstatě obecný jev, který je charakteristický pro geologický vývoj celé Eurasie během třetihor až po současné nejmladší období.

5. Pokračující emise methanu a uhlovodíkových plynů, dynamika přírodních plynových emisí

V ČR se setkáváme s celou škálou směsných emisí zemních plynů proměnlivého složení, od ropných či uhelných plynů s obsahem uhlovodíků, přes plyny dusíkové,

radonové, sulfanové a helionosné, až k plynům uhličitým, hojně využívaným v lázeňství. Dosavadní odborný pohled na jejich složení je ovšem statický, nepočítá s významnějšími fluktuacemi v obsahu komponent a jednou provedená analýza slouží řadu měsíců i let jako medicínální, resp. bezpečnostní atest. Akceptována je jen proměnlivost v kvantitě emisí, zvláště v hornictví a speleologii, která bývá interpretována v souvislosti se změnami počasí, resp. atmosférického tlaku.

Dynamika emisí jednotlivých složek zemních a půdních plynů je nicméně již po desítky let pozorně studována vulkanology a seismology v tektonicky aktivních oblastech, protože souvisí se sopečnou a zemětřesnou činností. Motivací takovýchto měření je snaha předpovídat náhlé katastrofické geologické procesy a ochránit před nimi obyvatelstvo. Také v české důlní historii jsou popsány náhlé eruptivní výrony plynů s neblahými následky, přičemž k výbuchům methanu docházelo v uhelných i neuhelných dolech. Na základě našich pozorování na řadě lokalit uvnitř jednotlivých lineárních zón můžeme konstatovat významnou proměnlivost ve složení zemních plynů a eruptivní výskyty neočekávaných plyných složek²¹. Je možné pozorovat klidová období bez významnějších změn, která velmi náhle přecházejí v období vysoké erupce, a z hlediska složení proměnlivé aktivity. Zmíněnou situaci lze dokumentovat záznamem emisí CO₂ z bývalého železnorudného dolu Krušná hora u Berouna na pražské lineární zóně (obr. 6), kde jsme episodicky pozorovali i erupce sulfanu a vzácně i erupce methanu a doprovodných uhlovodíkových plynů. Popsané eruptivní jevy jsme zjistili na některých lokalitách severojižních zón i bez použití instrumentální techniky (výrony patrné ve vodních tůňích a tocích, náhlé výstupy páry z terénu v zimním období, vlnící se atmosférické sloupce nad geologickými zlomy, opuštěnými doly atp.). Získané výsledky nás opravňují konstatovat, že zemní plyny na území ČR nemají jednou provždy konstantní složení, je možné se setkat i s významnými změnami ve složení a s výskytem neočekávaných toxických nebo výbušných složek. Tato zjištění



Obr. 6. Emise CO₂ z opuštěného železnorudného dolu Krušná Hora u Berouna v období 17.11. - 23.11.2001; výdech z odvětrávací trubky ze zazděného ústí úpadní štoly

si zřejmě v budoucnu vyžádají změnu stávajících náhledů na problematiku výskytu hygienicky sledovaného radonu, toxických plynů, ale i nebezpečného a současně velmi signifikantního methanu, který může být markerem zdrojů fosilních paliv.

Naše výsledky rovněž naznačily určitou souvislost mezi dobou výstupu a chemickým složením vystupujících plynů a výskytem vzdálených velkých zemětřesení v zahraničí²¹. Je možné, že vzdálená zemětřesení nějakým způsobem stimulují procesy migrace a výstup fluid v lineárních zónách. Toto naše zjištění koresponduje s údaji Hunta²², který uvádí, že celosvětově existuje poměrně dobrá korelace mezi oblastmi s prokázanými povrchovými projevy uhlovodíků (seeps) a oblastmi s aktivním zemětřesným režimem. Pererva⁷ rovněž zjistil periodický, pulsační charakter výronů fluid na lineárních zónách Eurasie a vysvětluje tento jev periodickými změnami tlaku ve fluidních systémech. Domnívá se, že kontrolujícími mechanismy periodických výronů jsou nejenom občasná zemětřesení, ale i podstatně složitější kosmogenní faktory.

6. Migrační cesty uhlovodíků a jejich možné zdroje

Existence uhlovodíkových projevů na lineárních zónách v Českém masivu navozuje dvě fundamentální otázky – totiž jakými cestami živice migrovaly a především, odkud migrovaly.

Migrační cesty uhlovodíků

Odpověď na první otázku částečně poskytují terénní pozorování v barrandienské oblasti, kde lze uhlovodíkové projevy studovat v horninách na řadě povrchových výchozů. Zde se zdá, že hlavní, ne-li výhradní migrační cestou pro živice byly systémy subvertikálních tektonických severojižních poruch různého měřítka – od drobných, často



Obr. 7. Žíly v devonském vápenci vyplněné bitumenem a kalciem; velkolom Čertovy schody u Koněprus, Barrandien

mikroskopických puklin, až po několik metrů mocné mineralizované žíly (obr. 7). Dokonce i v případě zdánlivě zcela izolovaných výskytů živic uvnitř dutých konkrecí nebo schránek zkamenělin lze při pečlivém pozorování objevit drobné, téměř vlasové pukliny dosud místy impregnované jemným živičným filmem, které vedou do dutin obsahujících ropu.

Na druhou stranu ovšem některé jiné geologické fenomény uvnitř lineárních zón, zejména tzv. vulkanické diatrémy, hydrotermální jeskyně a některá hydrotermální ložiska, jsou svým vznikem spojována, spíše nežli se systémem propustných tektonických puklin, s prostorově izolovanými tubicovitými, vertikálními strukturami, po nichž fluida migrovala vzhůru z hlubinných zdrojů. Těto představy rovněž nasvědčují i některé zahraniční poznatky. Pererva⁷ uvádí, že na řadě lineárních zón identifikovaných na území bývalého Sovětského svazu dochází k hlavnímu pohybu fluid právě v rámci subvertikálních komínovitých struktur o průměru 100–300 m. V těchto místních strukturách, nazývaných „krby snížené hustoty“ (očagi razuplotnenija) jeví horniny zvýšenou propustnost v důsledku druhotných petrofyzikálních změn, spojených mj. s hydrotermálními procesy. Hunt²² zjistil analogické vertikální migrační kanály v oblasti Severního moře a na šelfu Luisiany v USA, kde po nich vystupují k povrchu uhlovodíkové plyny. Popisuje, že tyto „plynové komíny“ (gas chimneys) mají v řezu průměr kolem 400 metrů, jsou čistě vertikální a směřují přímo k povrchu, zatímco jiné připomínají zakroucené vzestupné chody červů. Přesná podstata zmíněných fluidních kanálů je nejasná, nicméně je zřejmé, že migrace fluid v nich není spojena s běžnými tektonickými poruchami.

Zdroje uhlovodíků

Další důležitou, a z hlediska prospekčního zcela fundamentální otázkou je, odkud vlastně uhlovodíky na lineárních zónách migrují. Při úvahách o zdrojích uhlovodíků lze zřejmě diskutovat tři hlavní možné zdroje:

- 1) produktivní ropo- a plynomatečné komplexy ve stratigrafickém podloží, a/nebo skrytá, částečně netěsná ložiska pod povrchem,
- 2) dálkovou laterální migraci uhlovodíků z neznámého vzdáleného zdroje,
- 3) abiogenní zdroj(e) uhlovodíků ve svrchním plášti.

Přítomnost produktivních ropo- a plynonosných sedimentů v hlubším podloží se na řadě míst jednotlivých lineárních zón, zejména tam, kde tyto struktury protínají rozsáhlé formace silně metamorfovaných krystalických hornin, jeví jako dosti nepravděpodobná. Model předpokládající pod povrchem existenci produktivních horizontů nebo dokonce skrytých ložisek uhlovodíků by však mohl vysvětlovat některé fluidní projevy např. v oblasti brněnské nebo pražské lineární zóny, kde převládají relativně tepelně málo přeměněné a organickou hmotou bohaté sedimentární formace. V případě barrandienské oblasti navíc současné analytické výsledky z hlubokého vrtu Tobolka-1 naznačují možnost, že v hlubokém podloží existuje příkro-

vová stavba, v jejímž rámci by mohlo docházet k vertikální migraci uhlovodíků z hypotetických struktur tektonicky podsunutých, relativně slabě tepelně přeměněných sedimentů¹⁶. Při těchto úvahách je však nutno mít na zřeteli, že povrchové výrony uhlovodíků nemusejí zdaleka vždy indikovat existenci skrytých ložisek pod povrchem, ani jejich možné zásoby²³.

Modely migrace uhlovodíků

Alternativně, přítomnost nezralých uhlovodíků zjištěných na některých místech lineárních zón by mohla být vysvětlitelná i mechanismem dálkové laterální migrace ze vzdálených zdrojů. Oliver^{24,25} vypracoval hypotetický model, který spojuje vznik ložisek ropy, plynu, uhlí, horkých pramenů a nízkoteplotních hydrotermálních ložisek na periférii orogenních pásem s fluidy, která byla během horotvorných deformací tektonicky vytlačována z orogenu. Model vychází z předpokladu, že teplá a solemi, kovy a živici obohacená fluida mohou být ve velkých objemech transportována z orogenu až stovky kilometrů daleko do nitra sousedících platform, v jejichž mělkém sedimentárním pokryvu se zachytí a vytvoří ložiska. Bethke a Marshak²⁶ tuto představu dále rozpracovali a počítačově simulovali migraci solanek tektonicky vytlačovaných z orogenu na periférii Severní Ameriky do nitra kontinentu. Jejich výsledky potvrdily, že velké objemy ropných a kovo- nosných solanek skutečně mohly migrovat přes velkou část severoamerického kontinentu, přičemž předpokládaná rychlost migrace činila asi 1 cm rok⁻¹ nebo méně. Pokud by popsaný model byl aplikován na systém Alpský orogén – Český masív, mohl by možná vysvětlit přítomnost uhlovodíků a solanek na lineárních zónách Českého masívu. Nasouvání tektonicky deformovaných čelných příkrovových alpských jednotek na jižní periférii Českého masívu je geologicky bezpečně známo. Za zhruba 30 mil let, jež uplynuly od počátku alpínské orogeneze, by při rychlosti migrace 1 cm rok⁻¹ tato hypotetická orogenní fluida mohla migrovat asi 300 km na sever, do nitra Českého masívu a využívat při tom, jako preferenční migrační cesty, propustnější tektonicky predisponovaných lineárních zón. Představa sama přitom nijak neprotiřečí ani existenci případných skrytých ložisek pod povrchem v Čechách, protože ta zde mohla z alpínských orogenních fluid rovněž vzniknout, zcela v souladu s modelem Olivera^{24,25}.

V současné etapě výzkumu nelze ovšem ani vyloučit, že určitá část fluid včetně uhlovodíků vystupujících v lineárních zónách, je dotována z mnohem hlubších, možná dokonce plášťových zdrojů. Abiogenní, plášťový původ některých ropných a plynových akumulací ve světě se zdá být relativně průkazně doložen²⁷ a isotopické složení některých plynů vystupujících na lineárních zónách v Českém masívu této představě rovněž nasvědčuje²¹.

7. Závěry

Pozorování založená na mezioborové syntéze řady

údajů ukazují, že mnoho, ne-li většina, drobných nálezů přírodních uhlovodíků v Českém masívu je soustředěno do několika 20–40 km širokých lineárních zón protínajících naše státní území v severojižním směru. V těchto pásmech, jež pravděpodobně představují oblasti se zvýšenou horninovou propustností, probíhala a místy ještě dodnes probíhá periodická migrace ropy a plynu i dalších hlubinných fluid – zejména teplých solanek, kovo- nosných roztoků, minerálních vod a CO₂.

I když zdroje drobných výskytů přírodních rop, bitumenů a plynů nejsou většinou přesně známy, mohou tato zjištění jako celek naznačovat, že potenciální ložiska uhlovodíků se možná nacházejí ve větší hloubce i uvnitř Českého masívu, v rámci severojižních lineárních pásem, kam by se mělo v budoucnu zaměřit podrobnější prospekční úsilí.

Tato studie byla podpořena granty MŠMT ČR (v rámci projektu výzkumných záměrů č. MSM 6046137304), č. 104/06/1079 GA ČR a č. IAA 300460510 GA AV ČR.

LITERATURA

1. Stejskal M., Zeman A., Suchý V., Kroufek J., Šebor G.: *Konference APROCHEM, Milovy, 13.–15. října 2003*, Sborník přednášek (bez editora), str. 207. PetroCHemProgress Ing. Jaromír Škarka CSc., Praha 2003.
2. Stejskal M., Suchý V., Zeman A., Kroufek J., Šebor G.: *Konference APROCHEM, Milovy, 20.–22. září 2004*, Sborník přednášek (bez editora), str. 269. PetroCHemProgress Ing. Jaromír Škarka CSc., Praha 2004.
3. Stejskal M., Kroufek J., Šebor G., Markovič F., Romanidis K., Suchý V., Zeman A.: *Konference APROCHEM, Milovy, 24.–26. října 2005*, Sborník přednášek (bez editora), str. 305. PetroCHemEng, Praha 2005.
4. Zeman A., Suchý V., Stejskal M., Janků J., Čermák J., Turek K.: *J. Geochem. Explor.* 69–70, 499 (2000).
5. Zeman A., Stejskal M., Suchý V., Kroufek J.: *Amer. Assoc. Petrol. Geol. Bull.* 85, (Supplement), (2001). http://www.aapg.org/datasystems/abstract/13annual_/8817/8817.htm, staženo 18.12.2002.
6. Suchý V. Zeman A.: *Acta Musei Moraviae, Sci. geol.* 84, 97 (1999).
7. Pererva V. M.: *Geol. Zh.* 1, 66 (1999).
8. Al Khatieb S. O., Norman J. W.: *J. Petrol. Geol.* 4, 319 (1982).
9. Archandělskaja V. V.: *Geologia i Razvedka* 1, 68 (1998).
10. Roedder E.: *Fluid Inclusions*. Mineralogical Society of America, Washington 1984.
11. Kříbek B., Žák K., Spangenberg J., Jehlička J., Prokeš S., Komínek J.: *Econ. Geol.* 94, 1093 (1999).

12. Sýkorová I., Suchý V.: 2nd Symposium on Gondwana Coals, Porto, September 19th 1998. Book of Abstracts (Lemos de Souza M. J., Fernandes J. P., ed.), str. 54.
13. Suchý V., Dobeš P., Filip J., Stejskal M., Zeman A.: *Tectonophysics* 348, 25 (2002).
14. Suchý V., Heijlen W., Sýkorová I., Muchez P., Dobeš P., Hladíková J., Jačková I., Šafanda J., Zeman A.: *Sed. Geol.* 131, 201 (2000).
15. Melka K., Suchý V., Zeman A., Bosák P., Langrová A.: *Acta Univ. Carol., (Geologica)* 44, 117 (2000).
16. Volk H.: *PhD Thesis*. RWTH Aachen, 2000.
17. Stejskal M., Kroufek J., Šebor G., Rajlich P., Tichý L., Suchý V.: *Konference APROCHEM, Milovy, 24.–27. dubna 2006*, Sborník přednášek (bez editora), str. 1417. PetroChemEng Ing. Jaromír Škarka CSc., Praha 2005.
18. Möller P., Weise S. M., Althaus E.: *J. Geophys. Res.* 102(B8), 233 (1997).
19. Chmelík F., Chlupáč I.: *Výzkumná zpráva č. P21488*. Geofond, Praha 1969.
20. Ščeglov A. D.: *Metallogenija oblastej avtonomnoj aktivizacii*. Nedra, Leningrad 1968.
21. Kroufek J., Stejskal M., Šebor G., Mrlina J., Tesař J., Suchý V., Zeman A.: *Konference APROCHEM, Milovy, 24.–26. října 2005*, Sborník přednášek (bez editora), str. 312. PetroChemEng, Praha 2005.
22. Hunt J. M.: *Petroleum Geochemistry and Geology*. Freeman and Company, New York 1996.
23. Tedesco S. A.: *Surface Geochemistry in Petroleum Exploration*. Chapman and Hall, New York 1995.
24. Oliver J.: *Geology* 14, 99 (1986).
25. Oliver J.: *The Spots and Stains of Plate Tectonics*. *Earth-Science Reviews* 32, 77–106 (1992).
26. Bethke C. M., Marshak S.: *Ann. Rev. Earth Planet. Sci.* 18, (1990).
27. Krajuškin V. A., Kučerov V. G., Ključko V. P., Gožik P. F.: *Geol. Zh.* 2, 35 (2005).

V. Suchý^a, M. Stejskal^b, A. Zeman^c, I. Sýkorová^d, J. Kroufek^b, G. Šebor^b, and J. Janků^e (^a Prague, ^bDepartment of petroleum technology and petrochemistry, Institute of Chemical Technology, Prague, ^cBrandýs nad Labem, ^dInstitute of Rock Structure and Mechanics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, ^eDepartment of Environmental Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague): **Origin of Hydrocarbons in the Bohemian Massif Revisited: New Evidence from Field Observations and Geochemical Composition**

Evidence is provided that many, if not most, small-scale hydrocarbon occurrences in the Bohemian Massif, both newly described and already known, are in fact concentrated within five distinct north-south zones, 20–40 km wide, which cut various geological units. These linear structures provided long-lived and periodically reactivated conduits for various geofluids that include, apart from hydrocarbons, thermal and mineral waters, warm brines, uranium-bearing hydrothermal solutions, CO₂, CH₄, and He. Geological and geochemical data suggest repeated episodes of fluid and hydrocarbon migration throughout the geological history of the linear zones. A number of local present-day gas emissions and small oil seeps are probably indicative of the most recent migration stage that has resumed in the Tertiary period, following the Alpine orogeny. In some localities, the present-day peaks of CO₂, CH₄ and C₂–C₁₂ hydrocarbon emissions mirror major earthquakes that occur elsewhere in the southern hemisphere. This implies that distant earthquakes can be instrumental in releasing geofluids from the linear zones. The hydrocarbons found at the surface may point to unknown deposits and/or petroleum source rocks hidden beneath the surface; though juvenile, deep-mantle (abiogenic) contributions can be also viable. Alternatively, the hydrocarbon origin can be also explained in terms of a long-distance lateral migration from unknown sources in the Alpine realm. Regardless of the dubious source(s), our analysis indicates that the internal part of the Bohemian Massif shall be seriously considered as a possible target for future oil and gas exploration – a conclusion that is both fundamental and challenging.

ŘEŠENÍ KRystalOVÉ STRUKTURY Z RTG PRÁŠKOVÝCH DIFRAKČNÍCH DAT – NESPLNITELNÝ SEN NEBO KAŽDODENNÍ PRAXE ?

MICHAL HUŠÁK, JAN ROHLÍČEK,
JAN ČEJKA a BOHUMIL KRATOCHVÍL

Ústav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
michal.husak@vscht.cz

Došlo 17.5.07, přijato 12.7.07.

Klíčová slova: krystalová struktura, RTG difrakce, prášková data, polymorfismus, difrakce na mikrokrystalech

Obsah

1. Úvod
2. Řešení struktury z práškových dat
 - 2.1. Specifické problémy práškové difrakce
 - 2.2. Fáze řešení
 - 2.2.1. Příprava vzorků
 - 2.2.2. Přístrojová technika a měření
 - 2.2.3. Určení mřížkových parametrů a prostorové grupy
 - 2.2.4. Vyřešení struktury
 - 2.2.5. Upřesnění struktury
 - 2.2.6. Validace správného řešení
 - 2.3. Nové přístupy k řešení problému
 - 2.3.1. Predikce krystalové struktury
 - 2.3.2. NMR pevné fáze
 - 2.3.3. Separace reflexí z dat změřených za různých teplot
 - 2.3.4. Distribuované výpočty
 - 2.3.5. Difrakce na mikrokrystalech
3. Příklady řešení struktury z prášku

1. Úvod

Určení krystalové struktury látky znamená kompletní popis parametrů jejího vnitřního uspořádání, což zahrnuje především rozměry elementární buňky, prostorovou grupu a pozice všech atomů v buňce včetně jejich teplotně-vibračních parametrů. Vedle toho nám vyřešená krystalová struktura potvrdí, příp. doplní informaci o chemickém složení zkoumané látky. Kromě chemického složení získáme ze strukturních parametrů představu o prostorovém uspořádání molekul, jejich konformaci, intra a intermolekulárních vazbách, úhlech a rovinách, chiralitě, polymorfni modifikaci nebo o příp. solvataci látky v krystalu. Existuje

několik metod, které nám mohou poskytnout všechny tyto informace (RTG strukturní analýza, neutronová strukturní analýza a další). V současné době nejrozšířenější z nich je monokrystalová RTG strukturní analýza.

Zásadní limit rutinni RTG strukturní analýzy na monokrystalu je zmíněn již v názvu této metody – pro určení struktury potřebujeme mít k dispozici monokrystal. Monokrystalem rozumíme homogenní část krystalu o velikosti alespoň několik desetin mm se zanedbatelným množstvím poruch, který jsme schopni umístit orientovaně na goniometrickou hlavičku monokrystalového difraktometru.

Často se bohužel stává, že monokrystaly dostatečné kvality nebo velikosti nejsme schopni vypěstovat. Tato situace je velice nepříjemná v případech, kdy je znalost krystalové struktury látky nezbytná – např. při právních sporech farmaceutických firem týkající se polymorfismu aktivních substancí¹. Pro takovéto situace mají velký význam techniky řešení struktury látek pouze z práškových difrakčních dat. To znamená, že výchozím materiálem je práškový vzorek o velikosti zrna okolo 10^{-3} – 10^{-5} mm.

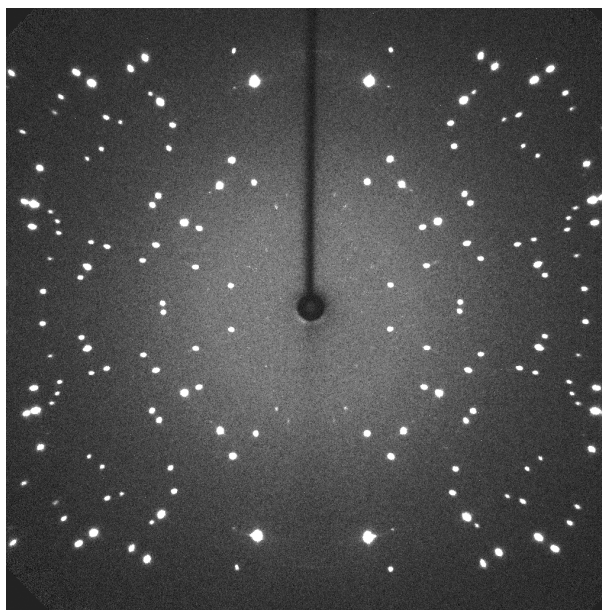
2. Řešení struktury z práškových dat

2.1. Specifické problémy práškové difrakce

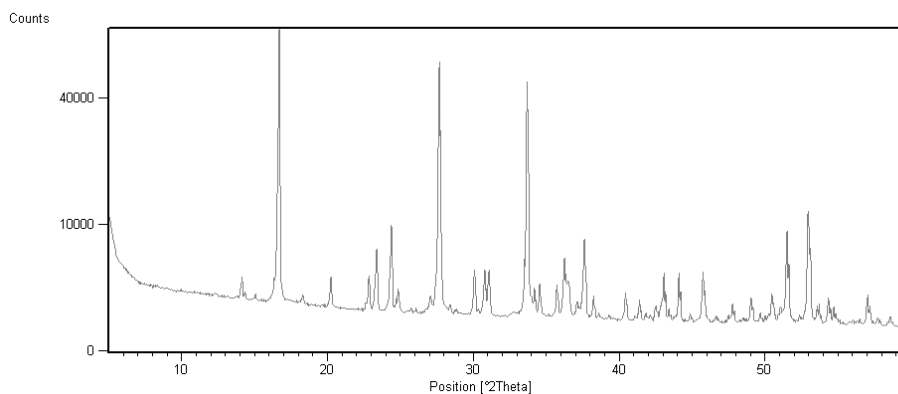
Problém určení krystalové struktury z práškového materiálu je nesrovnatelně složitější než řešení struktury z monokrystalu. Následující souhrn komplikací svádí k pocitu, že problém je skoro neřešitelný:

- Práškový záznam (difraktogram) vzniká současnou RTG difrakcí na velkém počtu mikrokrytalů (zrn, krystalitů). Orientace jednotlivých zrn vůči geometrii difraktometru není známa – pro každou difrakční linii máme tedy k dispozici jen jeden poziční údaj, mezivzdálenou vzdálenost d . Oproti difrakci na monokrystalu, která je trojrozměrná, se tím minimálně trojnásobně redukuje počet informací nutných k určení mřížkových parametrů.
- Pro stanovení vnitřní struktury krystalu jsou důležité hodnoty intenzit difrakcí (difrakčních píků). Při práškové difrakci dochází k překryvu difrakcí s podobnou mezivzdáleností d , protože difraktují ve stejné pozici. Dokonce při některých symetriích krystalové struktury mají dvě různé difrakce zcela identickou pozici a jejich intenzity pak nelze od sebe vůbec oddělit.
- Problém s překryvem je navíc ještě komplikován šířkou difrakcí. Malé mikrokrystaly mají většinou více poruch a větší vnitřní pnutí než monokrystaly. Tyto efekty způsobují rozšíření difrakčních linií a následně komplikují získání přesné informace o jejich intenzi-

a



b



Obr. 1. Srovnání informace obsažené v difrakčním záznamu z monokrystalu (a) a z prášku (b); jasně oddělené reflexe viditelné na plošném detektoru monokrystalového difraktometru se slévají do méně přehledného práškového difrakčního záznamu

tách. Problém s překryvem difrakcí a ztrátou informace o jejich pozici ilustruje obr. 1.

- Dalším problémem, který se u měření monokrystalu vůbec nevyskytuje, je přednostní orientace (textura) zkoumaného práškového materiálu. Při práškové difrakci se předpokládá, že mikrokrystalky jsou ve vzorku náhodně orientované. To ovšem neplatí např. v případě destičkovitých nebo jehlicovitých krystalů, které se mikrostrukturně orientují podle své přednostní orientace a dochází tak k zesílení difrakcí od rovin, které leží ve směru prodloužení mikrokrystalků. Tímto efektem jsou výrazně zkresleny intenzity difrakcí. Efekt přednostní orientace je nutno pro potřeby řešení struktury z prášku buď eliminovat použitou experimentální technikou, nebo poměrně složitě korigovat při vyhodnocení dat.

- Práškové vzorky mají většinou nižší schopnost difraktovat než monokrystaly. Počet pozorovaných difrakcí se tím snižuje oproti monokrystalu řádově. Nízký počet difrakcí získaných z práškového difrakčního záznamu pak neumožňuje použít standardní metody pro vyřešení struktury (např. přímé metody) ani standardní metody upřesňování strukturních parametrů (plné upřesňování všech parametrů strukturního modelu).
- Posledním problémem, který je nutno zmínit, je fázová (fyzikální) čistota vzorku. Přestože máme k dispozici chemickou analýzu, nemůžeme si být nikdy jisti, že práškový vzorek neobsahuje dvě a více polymorfních modifikací o zcela identickém chemickém složení. Řešit strukturu práškové směsi je možné jen v některých případech, prvotní separace polymorfů je nutností.

2.2. Fáze řešení

2.2.1. Příprava vzorků

Příprava vzorku pro řešení struktury z prášku vyžaduje podstatně jiný přístup, než standardní příprava vzorků pro rutinní RTG kvalitativní nebo kvantitativní fázovou analýzu. Snahou je upravit vzorek tak, aby se podařilo maximálně eliminovat komplikace zmíněné v předchozí kapitole.

Vzorek je nutné v první řadě rozemlít tak, abychom se co nejvíce přiblížili k předpokladu nekonečně velkého počtu náhodně orientovaných mikrokystalů ve vzorku. Tato operace je ovšem při dlouhém mletí limitována vznikem rentgenamorfní fáze (velikost zrna okolo 1 nm), která je pro řešení struktury nepoužitelná.

V průběhu přípravy vzorku se snažíme maximálně potlačit přednostní orientaci materiálu. Toho dosáhneme nasypaním vzorku do skleněné kapiláry, přičemž dbáme, aby samotný způsob plnění (sklepávání) nevedl k textuře. Tento požadavek je v rozporu, s požadavkem na maximální směštnání materiálu, aby byla při měření získána maximálně dosažitelná intenzita difrakcí. V praxi je tak nutné volit kompromis mezi pěchováním vzorku a jeho tendencí se přednostně uspořádat.

Průměr kapiláry volíme tak, aby vzhledem k absorpčnímu koeficientu vzorku a použitému záření, byla intenzita difrakce maximální. V praxi to znamená okolo 0,3 mm pro látky s velkou absorpcí RTG záření a až 1,5 mm pro čistě organické látky s nízkou absorpcí.

Před finálním měřením je vhodné difrakční parametry vzorku zkontrolovat měřením práškového záznamu na plošném detektoru monokrystalového difraktometru, obr. 2. Tímto způsobem se můžeme přesvědčit, zda je vzorek dostatečně homogenní a zda se přednostní orientaci podařilo potlačit.

2.2.2. Přístrojová technika a měření

Použitá přístrojová technika pro řešení struktury z prášku musí odpovídat extrémním nárokům na kvalitu dat. Data naměřená na běžném laboratorním práškovém RTG difraktometru lze použít pouze v triviálních případech. Zásadní rozdíl v kvalitě dat mezi laboratorním zdrojem a synchrotronovým difraktometrem ukazuje obr. 3.

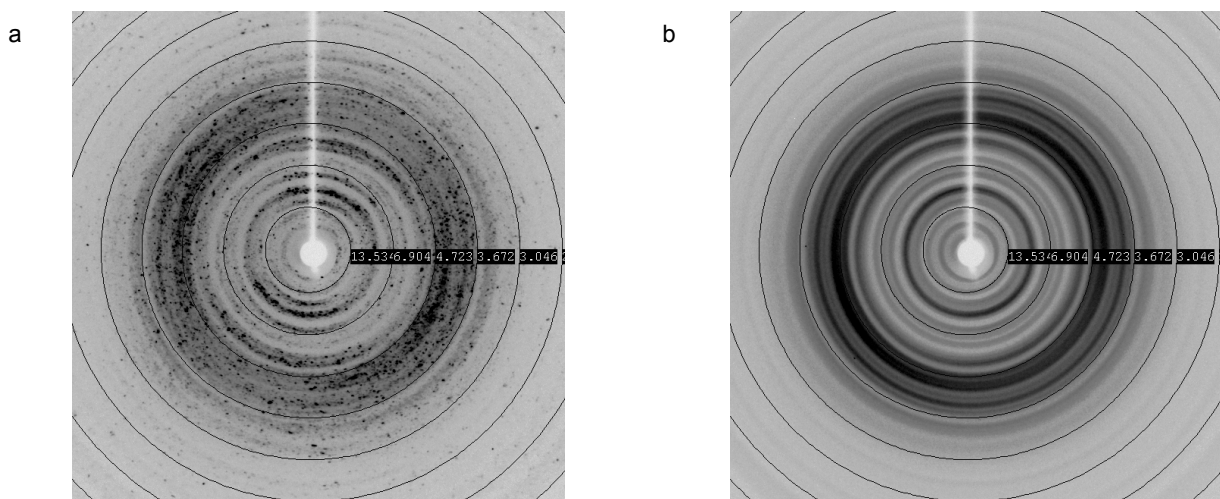
Pro určení mřížkových parametrů potřebujeme kvalitní informace o pozicích difrakcí. To znamená, že musíme mít k dispozici dokonale monochromatický a paralelní RTG svazek. Jeho nejvhodnějším zdrojem je synchrotron s dvoukystalovým monochromátorem. Ke zjištění přesné pozice difrakce je vhodný bodový detektor se sekundárním monochromátorem, umístěný co nejdále od vzorku.

Pro určení pozic atomů potřebujeme znát přesné informace o intenzitách difrakcí. Nejlepší informaci o intenzitě záření je možné získat na plošném detektoru, ale ten má problémy s určením pozice difrakce. V praxi se tudíž místo plošných detektorů používají banky bodových detektorů se sekundárními monochromátory, jejichž signály se ve výsledku sčítají.

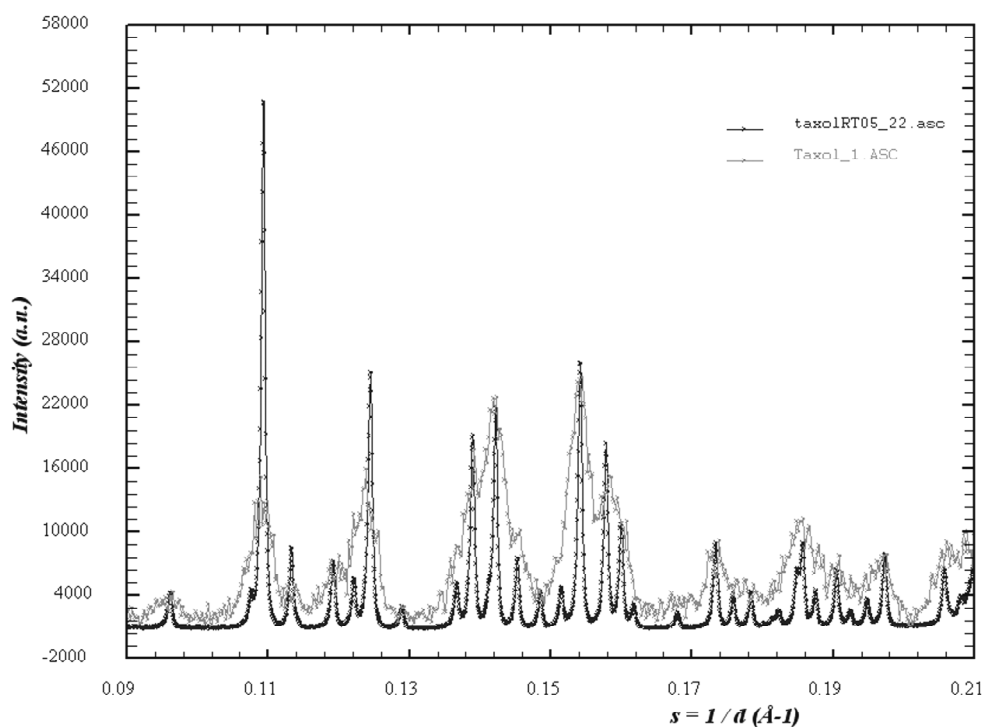
Z hlediska odstranění přednostní orientace se osvědčilo použití transmisní Debyeovy-Scherrerovy metody s rotující kapilárou se vzorkem. Pokud vzorek neprochází teplotně závislými (enantiotropními) fázovými přeměnami, je vhodné ho při měření chladit a tak potlačit teplotní kmitání atomů a jejich vliv na intenzity a tím získat více vysokohlohových difrakcí. Obr. 4 ilustruje měření na difraktometru připojeném na synchrotron, na kterém lze získat nejkvalitnější data pro řešení struktury z prášku.

2.2.3. Určení mřížkových parametrů a prostorové grupy

Základem indexace je najít takové mřížkové parametry látky, které by v rámci chyby měření předpověděly pozici všech difrakcí v záznamu. Zároveň je třeba dodržet



Obr. 2. Rozdíl v práškovém záznamu mezi špatně (a) a správně (b) připraveným vzorkem pro řešení struktury z prášku (plošný detektor Onyx na čtyřkruhovém monokrystalovém difraktometru Xcalibur PX). Záznam (a) je zrnitý, což ukazuje na nerovnoměrné rozložení mikrokystalů a přednostní orientaci



Obr. 3. Rozdíl v kvalitě práškových dat naměřených na laboratorním zdroji, Cu lampa (šedá linka) a na synchrotronu (linie BM01B synchrotronu ESRF v Grenoblu, černá linka). V obou případech byl měřen stejný vzorek – taxol



Obr. 4. Práškový difraktometr na linii BM01B synchrotronu ESRF v Grenoblu; metrové rozměry tohoto difraktometru (na rozdíl od decimetrových laboratorních difraktometrů) vedou k přesnějším datům

podmínku celočíselnosti Millerových indexů hkl , které pozice difrakcí generují. Toto zadání ovšem obsahuje značnou dávku nejednoznačnosti – v rámci přístrojové chyby je možné jakýkoliv difrakční záznam indexovat jako dostatečně velkou ($a \approx 10^5$ Å) kubickou buňku. Shoda s experimentem může být perfektní, výsledek je ovšem

zcela nesmyslný.

Pro vlastní indexaci existuje celá řada algoritmů. Nejsnáze lze pochopit práci algoritmů pracujících metodou pokus-omyl. Typickým zástupcem je program TREOR (cit.²). Software prohledává systematicky všechny možné hodnoty Millerových indexů a vybírá smysluplné kombinace. Jiné programy (DICVOL91, cit.³) naopak systematicky prohledávají možné mřížkové parametry a zkoumají, zda vedou k celočíselné indexaci. Zajímavý je software CRISFIRE (cit.⁴), který slouží jako uživatelské rozhraní pro spuštění indexace řadou různých alternativních algoritmů (včetně dvou výše zmíněných) a pak provede srovnání výsledků na základě výpočtu FOM (figure of merit). Čím je hodnota FOM vyšší, tím je zvolené řešení pravděpodobnější.

Identifikaci správné indexace zcela zásadně ovlivňuje přesnost určení pozic difrakcí. V podstatě lze říci, že čím větší je velikost základní buňky, tím větší jsou nároky na přesné určení pozic. Buňky do objemu cca 2000 \AA^3 mají šanci na správnou indexaci dat získaných z laboratorního RTG zdroje, větší buňky vyžadují měření na synchrotronu.

Výsledkem indexačního procesu je velmi často celá řada možných řešení, které mají podobné FOM. V této situaci musí místo počítače a softwaru nastoupit člověk, aby na základě úvah o velikosti základní buňky, prostorové grupě, pravděpodobné krystalové soustavě, předpokládaném počtu molekul v buňce nebo případné analogii

s podobnou látkou, vybral vhodné řešení jako výchozí pro určení struktury.

S indexací úzce souvisí i určení prostorové grupy. Systematické vyhasínání zvolené prostorové grupy by mělo vysvětlit absenci některých difrakcí předpovězených indexací, ale chybějících v záznamu. Při určování struktury organických látek, je situace zjednodušena jejich preferencí krystalizovat pouze v určitých prostorových grupách (triklinických, monoklinických a orthorombických). Výběr je navíc omezen chiralitou molekuly. Většina chirálních organických molekul krystaluje v grupách $P 2_1$, $P 1$ nebo $P 2_12_12_1$. Achirální látky obvykle krystalizují v grupách $P 2_1/c$, $P \bar{1}$, $P na 2_1$ a $C 2/c$, směsi enantiomerů v grupách $P 2_1/c$, $P \bar{1}$, $C 2/c$ nebo $P bca$. Tyto předpoklady o symetrii splňuje přibližně 78 % látek obsažených v databázi CSD.

2.2.4. Vyřešení struktury

V případě, že se podařilo správně určit mřížkové parametry a prostorovou grupu, je šance strukturu vyřešit. Zmíníme zde pouze dvě metody, vhodné k řešení struktur středně velkých organických molekul, které v současné době ve farmaceutickém průmyslu převažují.

Stejně jako při řešení struktury z monokrystalu, je možné se pokusit o použití přímých metod. Na základě statistik intenzit difrakcí lze odvodit hodnoty jejich fází a spočítat první model struktury. Jak bylo již zmíněno, difrakcí máme k dispozici ale mnohem méně než u monokrystalu a navíc intenzity, které jsou ovlivněny přednostní orientací, lze obtížně separovat. Vlastnímu řešení tedy předchází krok separace intenzit z práškového záznamu. K tomu se používá metoda nazývaná Le Bailovo fitování⁵. Na základě znalosti pozic difrakcí se upřesňuje jejich intenzita a tvarové parametry profilových funkcí. Ale ani tak zpravidla od sebe nelze oddělit intenzity vysokoúhlových difrakcí. Speciálně modifikované programy pro řešení struktury přímými metodami z prášku – SirPow (cit.⁶) jsou pak nucené operovat se sumami intenzit skupiny difrakcí místo s jednotlivými intenzitami. Výhodou přímých metod je, že není nutné znát žádný výchozí model tvaru molekuly. Nevýhodou jsou extrémní nároky na kvalitu dat.

U většiny organických látek však máme určitou představu, jaký by měla mít molekula tvar. Odhad lze udělat buď na základě analogie s existujícími podobnými molekulami, nebo pomocí metod molekulárního modelování. Čím více je molekula rigidní, tím větší je šance, že odhad bude správný. Při řešení struktury pak v prvé řadě určujeme jen šest parametrů (tři polohové a tři úhlové) popisující pozici a orientaci molekuly v elementární buňce. Počet parametrů se zvyšuje s každým vnitřním stupněm volnosti molekuly (zpravidla se jedná o rotující vazby a hledají se torzní úhly). Jako hodnotící funkce správnosti parametrů modelu se používá shoda naměřeného a vypočteného práškového záznamu. Pro optimalizaci modelu existuje několik algoritmů (metoda simulovaného žihání, metoda paralelního temperování, genetické algoritmy a další). Všechny tyto algoritmy určitým způsobem procházejí prostor proměn-

ných a snaží se najít minimum. Celý postup je implementován např. v programech FOX (cit.⁷), v komerčním programu DASH (cit.⁸) nebo TOPAS (cit.⁹). Výpočetní náročnost řešení rychle stoupá s počtem parametrů modelu. V případě, že se jako součást řešení snažíme určit i přednostní orientaci nebo je řešení komplikováno výskytem více symetricky nezávislých molekul v elementární buňce, může výpočet trvat i na moderních PC řádově týdny. Hlavním rizikem tohoto typu určení struktury je možnost vnutit programu nesprávné řešení použitím nesprávného výchozího modelu molekuly.

2.2.5. Upřesnění struktury

Proces řešení poskytne pouze výchozí orientační model struktury. Další zlepšení modelu se provádí standardním způsobem pro zpřesnění struktury z prášku – Rietveldovou metodou. Rietveldova metoda upřesňuje metodou nejmenších čtverců parametry popisující matematický model práškového záznamu (tvarové profily difrakcí, korekce na chyby přístrojové techniky, vlastní parametry struktury) tak, aby se minimalizoval rozdíl mezi naměřeným a vypočteným záznamem.

U většiny složitějších struktur vyřešených z prášku ale narážíme na zásadní problém – počet upřesňovaných parametrů je vyšší než počet skutečně pozorovaných difrakcí. Z tohoto důvodu je nutné experimentální data „rozšířit“ o další informace. Jako doplňkové informace se používají nejčastěji známé délky vazeb, vazebné úhly, případně i rigidní torzní úhly. Tyto informace o geometrii molekuly jsou pak formou tzv. „restrain“ parametrů zahrnuté do výpočtu. Pro dosažení správného výsledku je nutné optimálně volit váhu omezení typu „restrain“ a experimentálních difrakčních dat. Při špatné volbě si buď vynutíme řešení odpovídající zadané geometrii nebo výpočet molekulu „roztrhá“ a dospěje k řešení, které je fyzikálně nereálné. Systém na geometrii založených „restrain“ omezeních je implementován jen v některých programech pro Rietveldovu analýzu – nám se osvědčil systém GSAS (cit.¹⁰).

2.2.6. Validace správného řešení

Výsledek upřesnění struktury z prášku poskytují podobné verifikační parametry pro posouzení správnosti získaného strukturálního modelu jako data z monokrystalu (R -faktory). R -faktory získané z práškového záznamu jsou definovány podobně jako R -faktory získané z monokrystalu, mají tedy stejný smysl. Vzájemné srovnání je ale značně zkresleno tím, že práškové R -faktory jsou ovlivněny rozkladem intenzit z překrývajícími se píků na základě znalosti modelu. Díky nízkému počtu experimentálních dat na jeden parametr modelu je zde velké riziko zcela nesprávného výsledku i při nízkém R -faktoru. Model je tudíž nutné posoudit na základě parametrů nevnutených „restrainem“ a dalšími omezeními. Jsou v elementární buňce kolize mezi molekulami, které jsou z hlediska VdW interakcí nepřipustné? Dává výsledek smysl z hlediska tvorby intermolekulárních interakcí (zejména systém vodíkových vazeb)? Nejspolehlivější je ovšem potvrzení správn-

nosti modelu konfrontací s výsledky jiné, nezávislé metody. Nejlépe z analýzy mezimolekulárních kontaktů získaných pomocí NMR v pevné fázi.

2.3. Nové přístupy k řešení problému

Popsané řešení struktury z prášku je natolik komplikované, že je snahou vyvinout jak nové experimentální, tak matematické metody, které by problém zjednodušily. Přehled některých nových možností přístupu k problému je uveden v následujících podkapitolách.

2.3.1. Predikce krystalové struktury

Na základě energetických výpočtů by bylo teoreticky možné předpovědět krystalovou strukturu látky čistě na základě znalosti jejího chemického složení. Již v roce 1988 John Maddox konstatoval, že: „Je skandální, že teoretická fyzika stále neumí předpovědět krystalovou strukturu látky pouze z jejího vzorce.“. Nicméně i dnes vedou podobné pokusy bohužel ke správnému výsledku pouze výjimečně¹¹. Problém je v tom, že predikce generuje velký počet možných řešení, které se podobají svojí energií a je těžké rozhodnout, který polymorf se skutečně vyskytne.

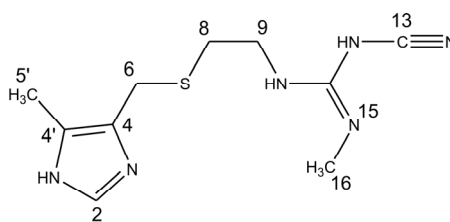
Z každé predikované struktury lze snadno spočítat teoretický práškový záznam. Vybrat správnou předpověď na základě srovnání se skutečným vzorkem je pak jednoduché.

2.3.2. Využití dat z NMR pevné fáze

NMR pevné fáze poskytuje při řešení struktury velmi cenné informace o intra a inter molekulárních kontaktech, o chemické čistotě látky a o počtu molekul v asymetrické části buňky. Na základě těchto skutečností je možné vygenerovat sadu omezení ohledně konformace molekuly ve struktuře a její možné pozice vůči sousedům. Tato omezení se pak využívají jak ve fázi řešení struktury metodou simulovaného žihání, tak později při upřesňování a verifikaci výsledků. Navíc je NMR nedestruktivní metoda, měření proto můžeme provádět na stejném vzorku, jaký jsme měřili na RTG difraktometru (a získat tím jistotu, že stále měříme stejný polymorf).

Využití informací z NMR pevné fáze zmiňují např. následující práce. Práce¹² ukazuje, jak veliký vliv mají informace získané z NMR na celkovou rychlost a spolehlivost nalezení řešení. V tomto článku byla pro názornost vybrána již vyřešená struktura – forma A polymorfního cimetidinu (obr. 5). Z NMR byly získány informace o vzdálenostech dusíku N15 jedné molekuly s uhlíkovými atomy C6, C8, C9 a C2 sousední molekuly. Hodnoty jednotlivých vzdáleností jsou uvedeny v tabulce I. Tyto informace pak byly využity ve fázi řešení struktury. Tímto způsobem byla zkrácen výpočetní čas a zároveň bylo dosaženo mnohem vyšší úspěšnosti nalezení správného řešení.

Na obr. 6 je znázorněn celkový postup při řešení struktury, pokud jsou k dispozici data z RTG práškové difrakce a NMR pevné fáze. Tento postup byl publikován v práci¹³.



Obr. 5. Molekula cimetidinu

Tabulka I

Vzdálenosti dusíku N(15) s uhlíkovými atomy sousední molekuly. Převzato z cit.¹²

Uhlík	Vzdálenost C-N15 [Å]
C6	4,1 (±0,2)
C8	3,3 (±0,1)
C9	2,9 (±0,1)
C2	3,6 (±0,1)

2.3.3. Separace difrakcí z dat změřených za různých teplot

Jak již bylo zmíněno, překryv difrakcí komplikuje jak určení pozice difrakce, tak i určení její intenzity. Z tohoto důvodu nemůžeme ve většině případů použít přímé metody, protože neznáme příspěvky jednotlivých difrakcí. Prvotním předpokladem je tedy separace intenzit překrývajících se difrakcí.

Pozice difrakcí závisí na mřížkových parametrech, které jsou přímo úměrnou funkcí teploty. V důsledku teplotní roztažnosti materiálu v určitém směru se změní i příslušný mřížkový parametr a tím se dosáhne separace původně se překrývajících difrakcí. Zkoumanou fází lze tedy měřit vícekrát za různých teplot a tak dosáhnout lepší separace (obr. 7).

V optimálním případě jsme tímto způsobem schopni identifikovat několik překrývajících se difrakcí a následně pak celý problém řešit pomocí přímých metod^{14–16}.

Závislost mřížkových parametrů na teplotě může být navíc využita pro verifikaci indexace. Celý postup ovšem předpokládá, že zkoumaná fáze nevykazuje enantiotropní polymorfní chování a že je v celém rozmezí teplot stálá.

2.3.4. Distribuované výpočty

Čím větší počet parametrů modelu struktury se snažíme metodou simulovaného žihání určit, tím časově náročnější je výpočet modelu struktury. Další komplikací výpočtu může být nejednoznačnost určení prostorové grupy nebo mřížkových parametrů. Komplikace lze řešit zdoluhavou metodou pokus-omyl: tzn. vypočítat řešení pro

všechny možné prostorové grupy s různými velikostmi mřížkových parametrů. Touto metodou lze rovněž testovat různé modely korekce na přednostní orientaci ve vzorku.

Výše zmíněný přístup vyžaduje značný výpočetní výkon. Řešením může být optimalizace algoritmů pro moderní vícejaderné procesory a vývoj software, který distribuuje výpočet mezi větší počet jinak nevyužitých počítačů. Prvním programem tohoto typu je systém FOX-grid založený na modifikaci standardní verze programu FOX.

2.3.5. Difrakce na mikrokrystalech

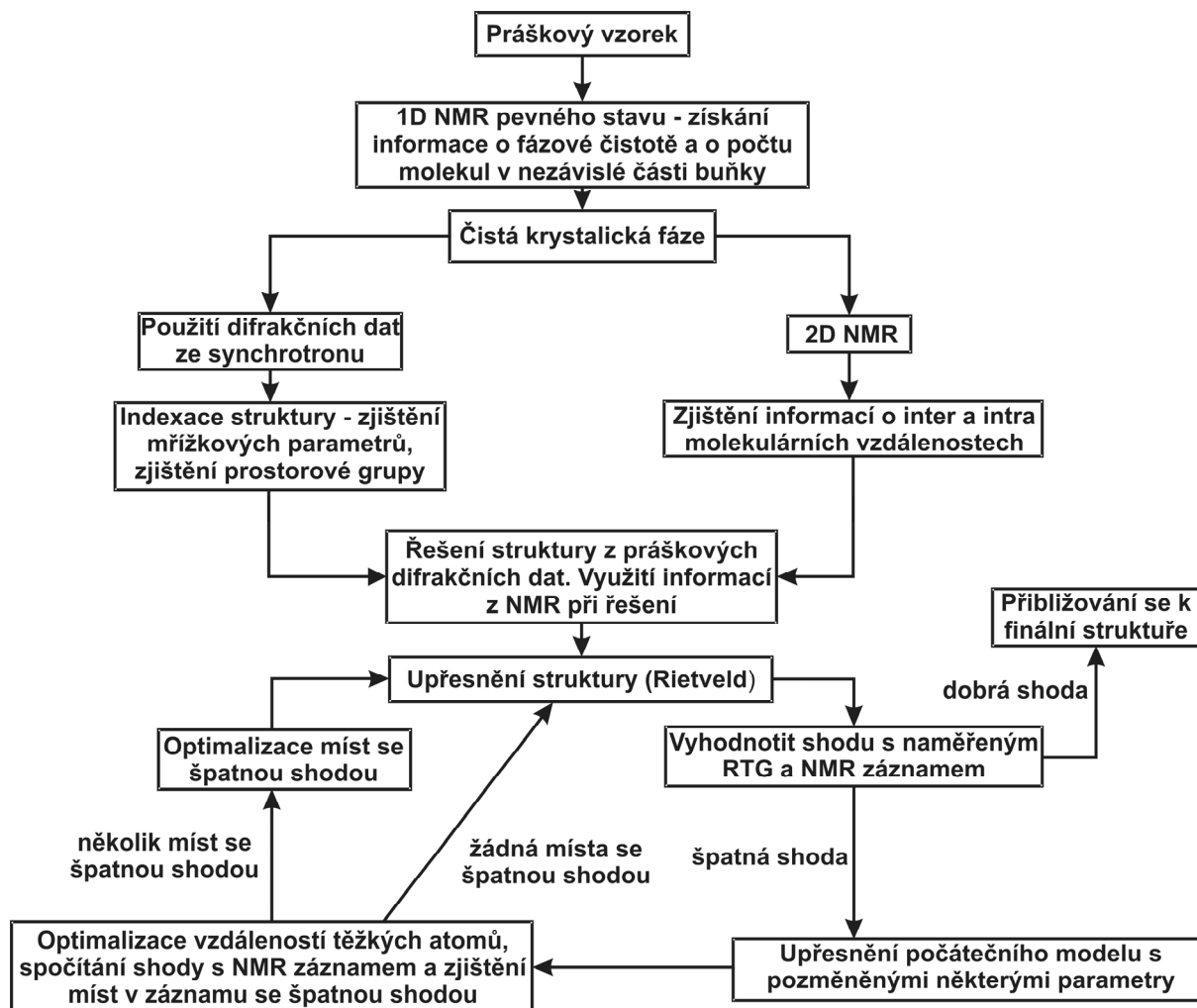
Snaha použít pro řešení struktury práškových vzorků standardní monokrystalové techniky se opírá o následující předpoklad: „pokud práškový vzorek vůbec difraktuje, musí se v něm nacházet monokrystalové dostatečně velké na měření monokrystalovými technikami“. Tento předpoklad je v podstatě správný, ovšem je nutné mít k dispozici experimentální techniku umožňující měření velice malých

a slabě difraktujících monokrystalů a techniku, která umožňuje manipulaci s nepatrnými objekty (10^{-1} až 10^{-2} mm). Problém je navíc komplikován tím, že mikrokrystalové vzorky bývají zpravidla srostlice nebo vícečetné krystalové.

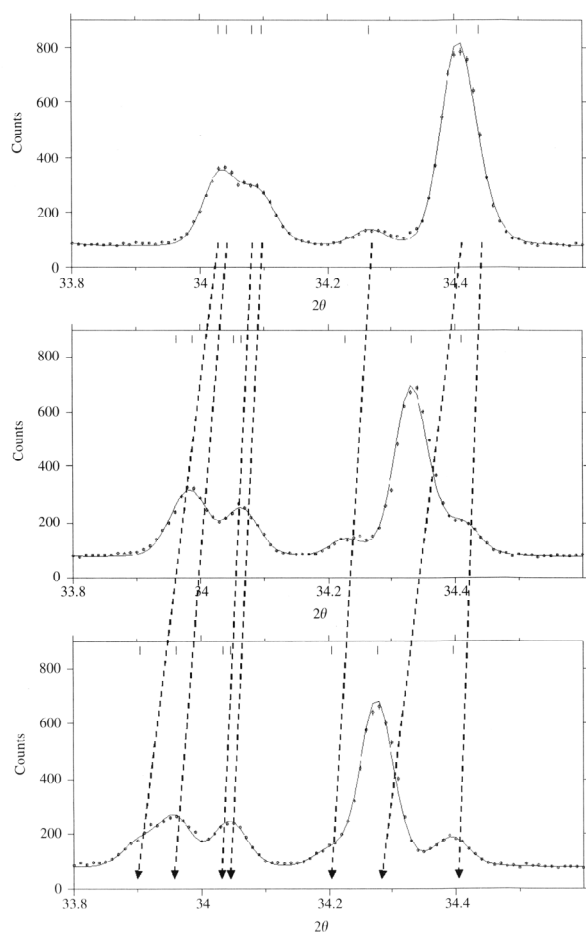
V praxi se ukázalo, že monokrystalový difraktometr s plošným detektorem využívající synchrotronové RTG radiace je schopný měřit mikrokrystalové vzorky (obr. 8). Náročný je zejména proces výběru monokrystalu, který se musí často opakovat a výsledek ověřit, dokud se nenajde vyhovující jedinec.

3. Příklady řešení struktury z prášku

Přes veškeré komplikace je v dnešní době možné z práškových dat vyřešit i značně složitou strukturu. Příkladem je struktura nové fáze námelového alkaloidu metergolinu II (cit.¹⁷). Řešení struktury bylo komplikováno



Obr. 6. Postup při řešení struktury z práškových difrakčních dat a z dat získaných z NMR; převzato z cit.¹³



Obr. 7. Difrakční záznam chlorothiazidu při různých teplotách; (shora: 90 K, 130 K a 160 K), převzato z cit.¹³

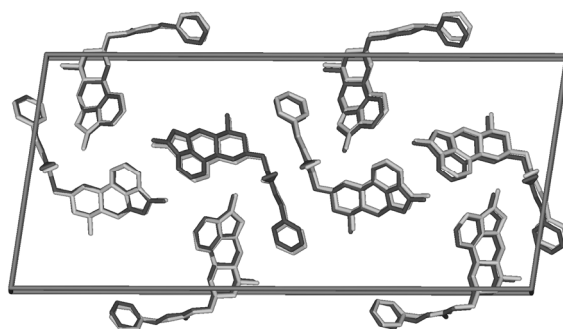
jak výskytem dvou flexibilních molekul v elementární buňce, tak tím, že se jehličkovité krystaly látky při měření v kapiláře uspořádaly orientovaně. Po vyřešení struktury z prášku se strukturu podařilo vyřešit i z mikrokrystalu. Shodu obou výsledků dokladuje obr. 9.

Dalším příkladem velké molekuly vyřešené s prášku je struktura cytostatika taxoteru trihydrátu, formy A (cit.¹⁸, obr. 10). Řešení této struktury bylo komplikováno přítomností tří molekul vody v nezávislé části buňky a velkou flexibilitou molekuly (14 torzních úhlů na jednu molekulu). Pro vyřešení struktury byla použita data s vysokým rozlišením ze synchrotronu. Struktura byla řešena algoritmem simulovaného žihání. Následně byla struktura upřesněna k hodnotě $R_{wp} = 0,093$.

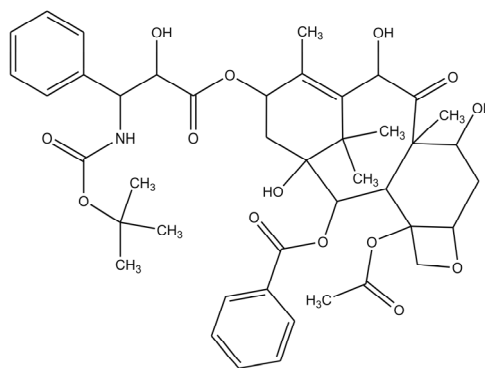
Oba výše zmíněné příklady dokladují současné hranice metodiky. Pokusy řešit strukturu složitějších molekul (např. velkých biomolekul – proteinů), lze již těžko označit za řešení struktury z práškových difrakčních dat. Počet omezujících parametrů získaných nedifrakčními technikami (molekulární modelování, homologie s existujícími strukturami, NMR) při těchto řešeních převyšuje několikanásobně difrakční informace. Např. v práci¹⁹ bylo oproti



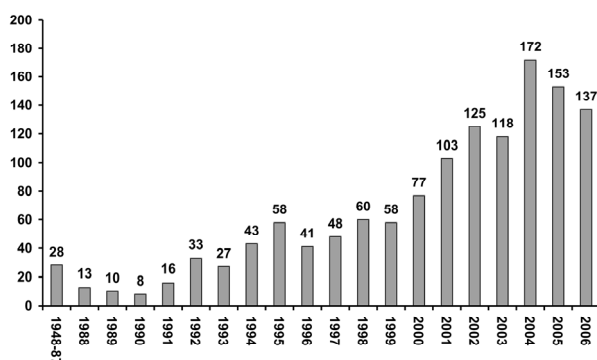
Obr. 8. 7-Kruhový monokrystalový difraktometr na linii BM01B synchrotronu ESRF v Grenoblu vhodný pro měření mikrokrystalů



Obr. 9. Srovnání výsledku určení struktury fáze metergolinu II z monokrystalu (černá) s výsledkem z prášku (šedá)



Obr. 10. Molekula taxoteru; převzato z cit.¹⁸



Obr. 11. Počet článků pojednávajících o vyřešených strukturách z práškových difrakčních dat, které byly v jednotlivých letech přidány do databáze SDDP (cit.²⁰)

4800 bodům práškového difrakčního záznamu použito 7981 omezení daných geometrií molekuly. Hranice možností řešení struktury z prášku jsou tedy spíše dány názorem na to, co ještě za řešení z prášku považujeme a kdy difrakční informace slouží jen jako podpůrný důkaz správnosti řešení získaného jinou metodikou.

Pokud se podíváme do Cambridgeské strukturní databáze (CSD) zjistíme, že celkový počet známých struktur začátkem roku 2007 byl cca 400 000, z toho 1230 struktur bylo vyřešeno z prášku (0,3 %). Tato čísla vypadají pro metodu řešení struktur z práškových dat nepříznivě. Musíme si ovšem uvědomit, že tato metoda přišla na scénu poněkud později, a že teprve v posledních letech zaznamenává veliký rozkvět (viz obr. 11).

Práce byla podpořena grantem GA ČR č. 203/07/0040 a výzkumným záměrem MŠMT ČR č. 6046137302.

LITERATURA

- Kratochvíl B.: Chem. Listy 101, 3 (2007).
- Werner P. E., Eriksson L., Westdahl M.: J. Appl. Crystallogr. 18, 367 (1985).
- Louer D., Boulouf A.: J. Appl. Crystallogr. 37, 724 (2004).
- Shirley R., v knize: *Accuracy in Powder Diffraction*, (Block S., Hubbard C. R., ed.). NBS Spec. Publ. 567, 361–382, 1980.
- Le Bail A.: *Proceedings of the International Conference, May 26–29, 1992* (Prince E., Stalick J. K., ed.), str. 213.
- Cascarano G., Favia L., Giacovazzo C.: J. Appl. Crystallogr. 25, 310 (1992).
- Favre-Nicolin V., Cerny R.: J. Appl. Crystallogr. 35, 734 (2002).
- David W. I. F., Shankland K., van de Streek J., Pidcock E., Motherwell W. D. S., Cole J. C.: J. Appl. Crystallogr. 39, 910 (2006).
- Bruker AXS, TOPAS: *General Profile and Structure Analysis Software for Powder Diffraction Data*. Bruker AXS, Karlsruhe 2005.
- Larson A. C., Von Dreele R. B.: *Los Alamos National Laboratory Report LAUR*, 86, (2000).
- Jos P. M. L.: Acta Crystallogr. B56, 697 (2000).
- Middleton D. A., Peng X., Saunders D., Shankland K., David W. I. F., Markvardsen A. J.: Chem. Commun. 17, 1976 (2002).
- Harper J. K., Grant D. M., Zhang Y., Lee P. L., Von Dreele R.: J. Am. Chem. Soc. 128, 1547 (2006).
- Shankland K., David W. I. F., Sivia D. S.: J. Mater. Chem. 7, 569 (1997).
- Brunelli M., Wright J. P., Vaughan G. B. M., Mora A. J., Fitch A. N.: Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 42, 2029 (2003).
- David W. I. F., Shankland K., McCusker L. B., Baerlocher Ch. (ed.): *Structure Determination from Powder Diffraction Data*. Oxford University Press Inc., New York 2002.
- Hušák, Jegorov: Struct. Chem., v tisku.
- Zaske L., Perrin M. A., Daigebonne C., Guillou O.: *Proceedings of the 8th EPDIC* (Andersson Y., Mittemeijer E. J., Welzel U., ed.), str. 411. Trans Tech Publ. Ltd, Switzerland 2004.
- Von Dreele R. B.: Acta Crystallogr. D56, 1549 (2000).
- Structure Determination from Powder Diffraction Database, převzato ze stránky <http://sdpd.univ-lemans.fr/iniref.html> dne 14.5.2007.

M. Hušák, J. Rohlíček, J. Čejka, and B. Kratochvíl
(Department of Solid State Chemistry, Faculty of Chemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague): **Structure Determination from Powder Diffraction Data – It Is Unrealizable Dream or Daily Use?**

There are available several methods, which can be used for crystal structure determination (X-ray structure analysis, neutron structure analysis and others). The most common one is single-crystal X-ray diffraction. This method is often inapplicable because it is impossible to prepare single crystal of appropriate size or quality. In these situations we are forced to solve structure from powder diffraction data. However structure determination from powder diffraction data brings a lot of problems (loss of information, peak overlapping, preferred orientation, phase in-purity etc.). In spite of all these problems it is possible to use this method for structure solving. This work aims to highlight all problems presented in structure determination process from powder diffraction data. We describe all steps of the powder-structure determination procedure and we highlights the non-standard experimental and data processing methods used for this task (synchrotron radiation usage, multi PC data processing, utilizing of information obtained from non-diffraction sources ...). The results of structure determinations from powder data are demonstrated on several selected examples from recent time.

LÁTKY S ESTROGENNÍM ÚČINKEM VE VODÁCH

HANA KUJALOVÁ, VLADIMÍR SÝKORA
a PAVEL PITTER

Ústav technologie vody a prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
hana.kujalova@vscht.cz

Došlo 25.8.06, přepracováno 19.2.07, přijato 15.3.07.

Klíčová slova: estrogeny, estrogenní aktivita, endokrinní disruptory

Obsah

1. Úvod
2. Přehled látek estrogenního charakteru
3. Chemická struktura estrogenních sloučenin
4. Zdroje estrogenů
5. Účinky exogenních estrogenů na organismy
6. Kvantitativní vyjádření estrogenity
7. Biodegradace estrogenních sloučenin na čistírnách odpadních vod
8. Estrogenita a biodegradabilita alkylfenolů
9. Kontaminace povrchových vod
10. Metody stanovení látek s estrogenní aktivitou

1. Úvod

Sloučeniny vykazující estrogenní aktivitu se běžně vyskytují v odpadních a povrchových vodách. Jedná se o rozsáhlou skupinu látek antropogenního i přírodního původu, které mají určité strukturální rysy podobné jako hormon estrogen a v důsledku toho jsou schopné jej imitovat. Patří do skupiny endokrinních disruptorů, které EPA (Environmental Protection Agency – Úřad pro ochranu životního prostředí) definuje jako exogenní látky, které interferují se syntézou, sekrecí, transportem, vazbou, účinkem, nebo rozkladem přirozených hormonů, jež jsou v těle odpovědné za homeostázi, reprodukci, vývoj nebo chování¹. Některé endokrinní disruptory jsou účinné i při koncentracích podstatně nižších, než jaké se projevují toxicitou, což koresponduje s extrémně nízkou koncentrací hormonů v krvi a s jejími minimálními změnami, které postačují k regulaci orgánů². Proto i stopové koncentrace endokrinních disruptorů v životním prostředí mohou mít významný dopad na živé organismy. Vztah mezi expozicí člověka endokrinními disruptory a rostoucím výskytem některých nemocí, poruch reprodukčního systému nebo

vývojových vad plodu je v současné době předmětem výzkumu.

Dosud bylo identifikováno asi 50 různých sloučenin, které lze zařadit do kategorie endokrinních disruptorů³. Z hlediska výskytu ve vodách jsou tyto látky téměř všudypřítomné⁴.

2. Přehled látek estrogenního charakteru

Mezi endogenní estrogeny, které jsou syntetizovány v těle živočichů, patří 17 β -estradiol, estron a estriol⁵. Ostatní látky vykazující estrogenní aktivitu, které nejsou přirozenou součástí endokrinního systému, se označují jako environmentální (nebo též exogenní) estrogeny. Podle původu se rozdělují na fytoestrogeny (rostlinný původ), mykoestrogeny (produkt některých plísní) a xenoestrogeny (antropogenní zdroje).

Fytoestrogeny jsou obsaženy v mnoha druzích rostlin (celkem asi 300), např. v obilninách, luštěninách, listové zelenině, travinách, některém ovoci aj. (podrobněji viz cit.^{5–8}). Mezi nejběžnější fytoestrogeny patří isoflavonoidy (např. genistein, equol, daidzein, biochanin A), lignany (enterodiol, matairesinol), kumestany (kumestrol), laktony, steroly, naringeniny^{5,7,9}. Zvláštní pozornost si zaslouží rostlina ploštičník (*Cimicifuga*) z čeledi priskyňkovitých, která obsahuje fytoestrogen formononetin (na bázi triterpenových glykosidů)^{6,10}. Extrakt z oddenků ploštičníku hroznatého (*Cimicifuga racemosa*) je účinnou složkou léčiv Menofem a GS Merilin, užívaných k potlačení příznaků klimakteria^{7,10}.

Jako příklad mykoestrogenů lze uvést zearalenon a jeho deriváty α - a β -zearalanol, což jsou toxiny produkováné plísněmi *Fusarium*, které napadají některé druhy obilnin⁸. Zearalenon se někdy používá jako růstový hormon pro hospodářská zvířata⁸.

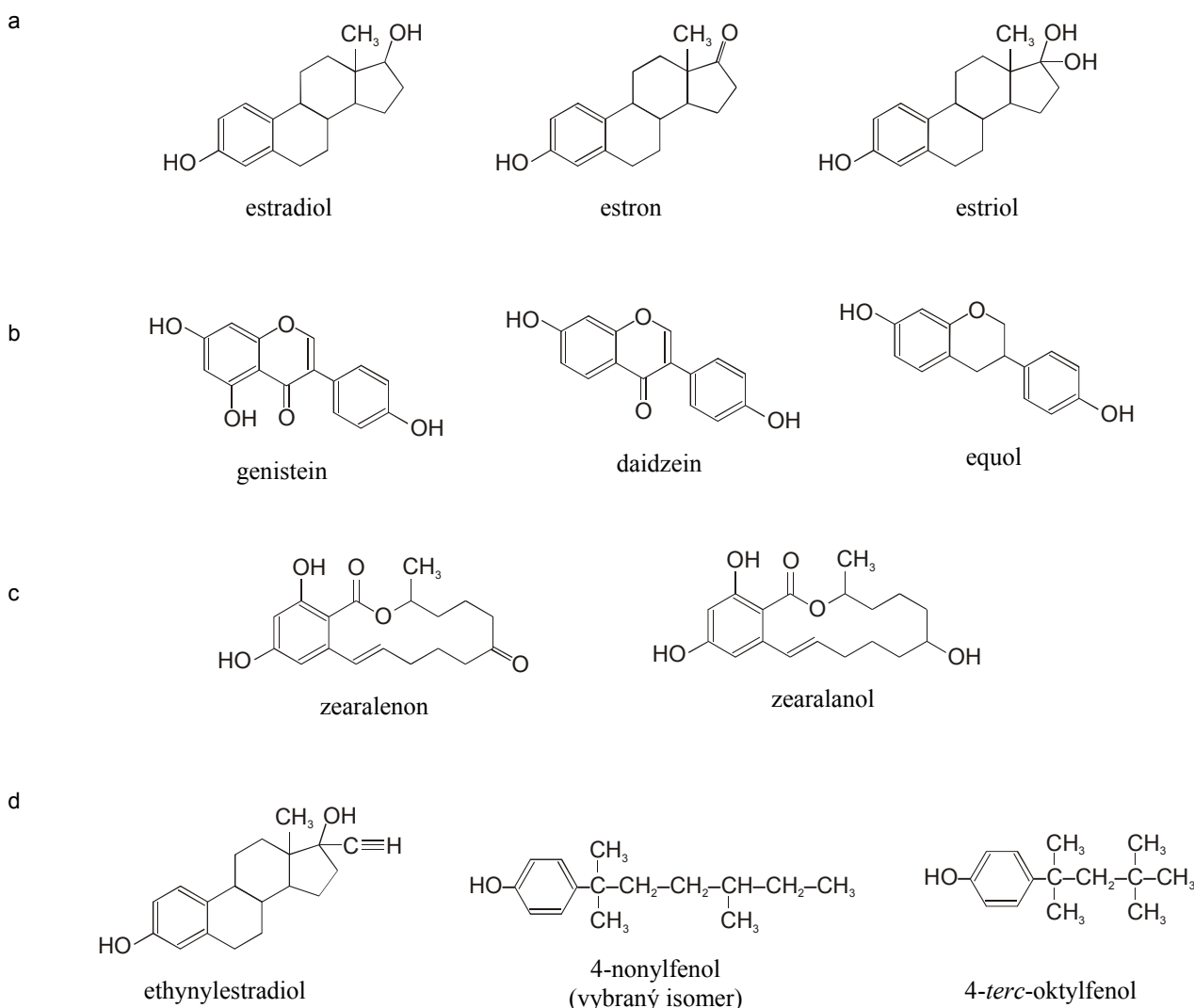
Mezi xenoestrogeny patří průmyslově vyráběné produkty nebo jejich metabolity: některé pesticidy (DDT, endosulfan, atrazin), bisfenol A, deriváty stilbenu, některé ftaláty, alkylfenoly (oktylfenol, nonylfenol), nízkochlorované polychlorované bifenoly, některé acidobazické indikátory (fenolftalein), polyaromatické uhlovodíky, dioxiny, furany, kadmium^{5,8,11}. Bisfenol A a ftaláty se vyluhují z obalů potravin; alkylfenoly jsou biodegradacním produktem neionogenních tenzidů alkylfenoethoxylátového typu, které jsou obsaženy v mnohých detergentech, nátěrových hmotách, pesticidech, kosmetických přípravcích apod.⁹. Dalším významným zdrojem xenoestrogenů jsou farmaceutické preparáty na bázi estrogenů – hormonální antikoncepce, jejíž účinnou látkou je nejčastěji 17 α -ethynylestradiol, vzácně mestranol (tj. methylethynylestradiol) nebo estradiolvaleran¹², a specifické léky obsahující např. diethylstilbestrol⁵.

3. Chemická struktura estrogenních sloučenin

Řada látek vykazujících estrogenní aktivitu má společné strukturální rysy, které lze zjednodušeně nastínit jako přítomnost fenolu nebo jeho funkčního ekvivalentu, zpravidla s volnou polohou *ortho* a s poměrně objemnými hydrofóbními skupinami v polohách *meta* nebo *para*⁵. Toto však není nutnou podmínkou estrogenního působení. Estrogenní receptory jsou schopné vázat velmi širokou škálu různých nesteroidních látek, které mohou, ale nemusí, být strukturálními analogy 17 β -estradiolu^{8,11}. Vzhledem k velké rozmanitosti dosud známých environmentálních estrogenů

nelze zobecnit strukturální nositele estrogenity¹³. Strukturou nejběžněji se vyskytujících sloučenin s estrogenní aktivitou je možné porovnat na obr. 1. Obecně se jedná o látky lipofilního charakteru, odolné vůči rozkladu, schopné bioakumulace v tukové tkáni a v biomembránách^{5,7}.

V případě alkylfenolů estrogenní účinek silně závisí na velikosti a stupni rozvětvenosti alkylu a na jeho pozici na aromatickém jádře; maximální estrogenní odezvu vykazuje terciární oktylfenol¹¹. Výraznou estrogenitu lze očekávat obecně u fenolů substituovaných v *para* poloze jediným alkylem sestávajícím ze 6 až 8 atomů uhlíku, z nichž ten nejbližší aromatického jádra je terciární¹⁴.



Obr. 1. Struktura vybraných látek s estrogenním účinkem; (a) endogenní estrogény, (b) fytoestrogény, (c) mykoestrogény, (d) xenoestrogény

4. Zdroje estrogenů

Hlavní podíl látek estrogenního charakteru v městských odpadních vodách pochází z lidské moči¹⁵. Moč žen obsahuje estriol, estradiol, estron, případně ethynylestradiol (při užívání hormonální antikoncepce)¹⁵. Ethynylestradiol bývá v odpadních vodách přítomen v koncentracích řádově 10^1 ng l^{-1} až 10^2 ng l^{-1} (cit.¹⁶). Městské odpadní vody obsahují také rezidua léků na bázi estrogenů¹⁷.

Převážná část estrogenů se z těla vylučuje v konjugovaných formách jako glukuronidy nebo sírany, které jsou biologicky podstatně méně aktivní než formy volné¹⁵. Avšak již během transportu odpadních vod dochází k dekonjugaci, která dále pokračuje při kontaktu s aktivovaným kalem na čistírnách odpadních vod^{4,15}. Za dekonjugaci jsou zodpovědné zejména bakterie *Escherichia coli*^{15,18}.

Městské odpadní vody dále obsahují širokou škálu syntetických chemikálií s estrogení aktivitou, které pocházejí z detergentů, prostředků pro osobní hygienu, kosmetických přípravků, potravin, pesticidů aj.¹⁷. Běžně lze v odpadní vodě detegovat např. nonylfenol, oktylfenol, bisfenol A a další látky^{13,17}.

Vydatným zdrojem steroidních estrogenů jsou odpady z chovu hospodářských zvířat, jejichž fekálie obsahují v závislosti na původci 17α -estradiol, 17β -estradiol, estron a estriol, a to konjugované i volné¹⁹. Kontaminovány bývají také nádrže s užitkovou vodou na farmách nebo v blízkosti pastvin²⁰.

5. Účinky exogenních estrogenů na organismy

Environmentální estrogény většinou imitují hormony, vážou se místo nich na estrogení receptory a vyvolávají odezvu (stejnou nebo jinou než endogenní hormony); existuje několik různých mechanismů účinku^{3,5}. Některé xenoestrogeny na receptory působí chemicky a aktivují je, některé je naopak inaktivují, jiné narušují metabolismus hormonů apod.^{5,8}. Existují dva typy estrogenních receptorů: α a β (cit.³). Např. 17β -estradiol, 17α -ethynylestradiol a diethylstilbestrol se přednostně vážou na receptory α , xenoestrogeny a fytoestrogeny mají zpravidla stejnou afinitu k receptorům α i β (výjimkou jsou např. isoflavonoidy, které preferují receptor β)^{3,21}.

Estrogenní účinek environmentálních estrogenů bývá ve srovnání s přirozenými hormony nižší (estrogení potenciál se liší až o několik řádů), což ovšem často bývá kompenzováno vyšší koncentrací těchto látek ve vodách. Některé studie (např. cit.⁵) navíc uvádějí, že se environmentální estrogény mohou na estrogení receptory vázat přednostně před 17β -estradiolem. V případě současného výskytu více xenoestrogenů se jejich účinky mohou pravděpodobně i násobit.

V těle ryb exponovaných estrogením látkám dochází k nepřiměřené indukci tvorby vitellogeninu^{16,22}. Vitelloge-

nin je fosfolipoglykoprotein, který slouží jako prekurzor bílkovin vaječného žloutku nižších obratlovců, syntetizuje se v játrech a krví se transportuje do vaječníků, kde z něj vznikají bílkoviny a stávají se součástí vyvíjejících se vajíček^{5,20}. Tvorba vitellogeninu je regulována estrogenem a je indukovatelná nejen u samic, ale i u samečků, jsou-li exponováni látkám s estrogením účinkem²⁰. K indukci postačuje např. koncentrace ethynylestradiolu ve vodě $0,1 \text{ ng l}^{-1}$ (cit.¹²). Nadměrná syntéza vitellogeninu představuje pro organismy metabolický stres, riziko poškození jater a ledvin, event. úbytek vápníku z kostí²³.

S kontaminací životního prostředí endokrinními disruptory bývá dáván do souvislosti narůstající výskyt vývojových poruch člověka^{12,24}. Estrogení látky pro člověka totiž znamenají potenciální riziko vzniku různých abnormalit v estrogeních cílových tkáních plodu^{5,24}. Některá fakta dokonce nasvědčují tomu, že u lidské populace na různých místech světa postupně dochází k poklesu produkce spermií, a předpokládá se, že příčinou je expozice environmentálním estrogenům²⁵. Avšak znalostí o vlivu endokrinních disruptorů na lidské zdraví je dosud velice málo. V divokých populacích vodních i některých suchozemských organismů byl prokázán vliv kontaminace vody xenoestrogeny a přirozenými estrogény na plodnost, sexuální diferenciaci a vývoj^{3,5,12,17,26}. Příkladem je extrémní výskyt vývojových poruch aligátorů v jezeře Apopka na Floridě, téměř kompletní úhyn určitého vývojového stádia pstruha v jezeře Ontario v Kanadě nebo poruchy reprodukce ryb v mnoha jiných lokalitách³. Udává se²⁶, že chronická expozice ryb a vodních bezobratlých živočichů exogením estrogenům může způsobovat vývojové a reprodukční poruchy již při koncentracích řádově ng l^{-1} . V případě nonylfenolu byla při pokusech s potkany jednoznačně prokázána jeho testikulární toxicita, v jejímž důsledku dochází k narušení spermatogeneze; analogické účinky lze očekávat i u člověka²⁵.

Naopak působení fytoestrogenů na lidský organismus bývá hodnoceno pozitivně. Přisuzují se jim preventivní účinky proti rakovině, antioxidační efekt, kardioprotektivní vlastnosti, ochranné účinky před osteoporózou aj.^{5,7,21}. Při konzumaci přiměřeného množství potravin bohatých na fytoestrogeny se není třeba obávat odezvy organismu na estrogení stimulaci, protože fytoestrogeny disponují relativně nízkou estrogení aktivitou, obecně jsou rozpustnější než ostatní skupiny látek s estrogením účinkem a nekumulují se ve tkáních⁷.

6. Kvantitativní vyjádření estrogenity

Porovnáním intenzity estrogeních účinků látek lze stanovit jejich tzv. relativní estrogení potenciál, přičemž jednotkový estrogení potenciál náleží 17β -estradiolu³. V literatuře³ lze nalézt hodnoty estrogeního potenciálu vybraných látek, stanovené různými metodami. Je-li estrogení potenciál 17β -estradiolu roven 1, pak průměrné estrogení potenciály činí: diethylstilbestrol 3,0; 17α -

ethynylestradiol 2,2; estriol 0,18; estron 0,03; genistein $6,6 \cdot 10^{-3}$; kumestrol $4,9 \cdot 10^{-3}$; 4-*terc*-oktylfenol $1,6 \cdot 10^{-4}$; bisfenol A $6,1 \cdot 10^{-4}$; 4-nonylfenol $5,2 \cdot 10^{-4}$ (cit.³). Srovnáním výsledků získaných jednotlivými metodami lze zjistit, že se liší afinita některých látek k estrogením receptorům α a β . V rámci jiné studie¹² byly na základě hodnot EC_{50} vypočítány následující relativní estrogení potenciály: 1,15 pro 17 α -ethynylestradiol, 0,25 pro estron a 0,08 pro estriol.

Koncentrace estrogeních látek ve vodách se často vyjadřuje v tzv. estradiolových ekvivalentech EEQ (cit.^{3,13}). Hodnota EEQ vzorku se vypočítá jako suma koncentrací jednotlivých látek estrogeního charakteru násobených jejich relativním estrogením potenciálem³, nebo jako podíl hodnot EC_{50} 17 β -estradiolu a vzorku¹³.

7. Biodegradace estrogeních sloučenin na čistírnách odpadních vod

Biodegradace estradiolu jsou schopny rozličné druhy mikroorganismů¹⁹, z aktivovaného kalu se podařilo izolovat²⁷ např. gram-negativní bakterie *Novosphingobium sp.* Mechanismus biodegradace (nejen) během aktivačního procesu spočívá v oxidaci na estron^{15,19}, pak následuje hydroxylace aromatického kruhu a jeho štěpení a/nebo hydroxylace cyklu na opačném konci molekuly¹⁹.

Biodegradace ethynylestradiolu je podmíněna nitrifikační kapacitou aktivovaného kalu²⁸. Nitrifikační bakterie totiž ethynylestradiol spolu s dalšími organickými látkami kometabolizují²⁸. Vzhledem ke značnému rozšíření nitrifikačních bakterií v půdě i ve vodách lze předpokládat, že biodegradace ethynylestradiolu pokračuje i po opuštění ČOV²⁸. Data publikovaná v práci¹² ovšem naopak svědčí o biologické stabilitě ethynylestradiolu v povrchových vodách.

Ve splaškových odpadních vodách se koncentrace steroidních estrogenů obvykle pohybuje v rozmezí od 1 ng l⁻¹ do 80 ng l⁻¹ (cit.^{17,18}). Koncentrace vybraných

estrogeních látek v přítocích na čistírny byly monitorovány např. na souboru ČOV v Římě a byly zjištěny následující dlouhodobé průměry: estron 15 ng l⁻¹ až 60 ng l⁻¹, estradiol 10 ng l⁻¹ až 31 ng l⁻¹, estriol 23 ng l⁻¹ až 48 ng l⁻¹, bisfenol A 332 ng l⁻¹ až 339 ng l⁻¹, nonylfenol 4194 ng l⁻¹ až 8767 ng l⁻¹ (cit.⁸). Na vybraných ČOV v Paříži byly zaznamenány¹² hodnoty pohybující se spíše při spodním okraji těchto rozsahů: estron 9,6 ng l⁻¹ až 17,6 ng l⁻¹, estradiol 11,1 ng l⁻¹ až 17,4 ng l⁻¹, estriol 11,4 ng l⁻¹ až 15,2 ng l⁻¹, navíc je uveden ethynylestradiol 4,9 ng l⁻¹ až 7,1 ng l⁻¹, naopak nebyla sledována koncentrace bisfenolu A ani nonylfenolu.

Ze studie¹⁷, která pojednává o odstraňování estrogenity během čistícího procesu na dvaceti městských ČOV ve Švédsku, vyplývají následující poznatky:

- nejvyšší účinnosti dosahují ČOV s aktivací,
- nízkou účinnost vykazují biofiltry,
- při chemickém srážení prakticky nedochází k poklesu estrogenity,
- účinnost lze zvýšit prodloužením doby zdržení v aktivační nádrži,
- příznivý vliv má zařazení anoxického stupně.

Účinnost odstranění estrogeních sloučenin je na různých ČOV rozdílná a závisí především na složení přítékajících odpadních vod, typu čistírny, technologických parametrech, teplotě aj. Např. účinnost odstranění na jedné z ČOV v Římě se uvádí¹⁵ pro estron 61 %, estradiol 87 %, estriol 95 %, ethynylestradiol 85 %. Relativně malý úbytek estronu lze vysvětlit tím, že současně vzniká oxidací estradiolu¹⁵. Podstatně nižší účinnost odstranění estrogení aktivity byla zaznamenána na skupině vybraných ČOV ve Francii¹²: estron 44 % až 59 %, estradiol 43 % až 60 %, estriol 40 % až 67 %, ethynylestradiol 34 % až 45 %. Na stejném souboru ČOV byla na základě testování estrogení aktivity *in vitro* shledána účinnost odstranění estrogenity v rozmezí 62 % až 97 %, což je však o 20 % až o 40 % vyšší účinnost, než jaká byla vypočtena na základě bilance estrogeních látek v přítoku a v odtoku¹². Tento rozdíl je připisován¹² přítomnosti neidentifikovaných rozložitelných

Tabulka I

Přehled koncentrace vybraných estrogenů v odtocích z různých čistíren odpadních vod

Látka	Koncentrace v odtocích ze sledovaných ČOV [ng l ⁻¹] v zemích					
	V. Británie	Francie	Německo	Itálie	Švédsko	Kanada
Estron	1 až 80	4,3 až 7,2	< ms až 70	5 až 30	5,8	< ms až 48
Estradiol	1 až 50	4,5 až 7,2	< ms až 3	3 až 8	1,1	< ms až 64
Ethynyl-estradiol	< ms až 7	2,7 až 4,5	< ms až 15	x	4,5	< ms až 42
Bisfenol A	x	x	16	13 až 36	490	x
Nonylfenol	< ms až 5400	x	199	1120 až 2235	840	800 až 15000
Literatura	17, 31	12	4, 17	8	22	17, 30

ms – mez stanovení; x – hodnoty nejsou k dispozici

xenoestrogenů v přítoku nebo naopak stabilních kontaminantů s antiestrogenním účinkem v odtoku. Rozdíly mezi estrogenní aktivitou odhadovanou a zjištěnou při testech *in vitro* lze také vysvětlit tím, že nelze předpokládat aditivitu estrogenního účinku.

Na celkové estrogenní odtoků z ČOV má největší podíl zpravidla estradiol, estron a ethynylestradiol¹⁸. Podle některých pramenů (např. cit.¹⁵) bývá koncentrace estronu v odtocích z ČOV minimálně desetkrát vyšší než estradiolu, proto je v nich estron hodnocen jako nejzávažnější estrogenní disruptor pocházející z ČOV¹⁵. Jiné práce (např. cit.¹⁸) uvádějí, že koncentrace estronu a estradiolu v odtocích je obvykle srovnatelná. Ethynylestradiol zodpovídá např. za 14 % až 19 % estrogenní aktivity odtoků z ČOV (týká se Paříže)¹². Ve srovnání s jinými evropskými zeměmi má Španělsko (resp. některé jeho oblasti) v odtocích z ČOV a následně i v řekách extrémně vysoké koncentrace nonylfenolu, což je dáno jednak hojným používáním alkylfenoethoxylátů, jednak nepříznivým poměrem objemu vypouštěných odpadních vod a průtoku vody v řekách (zvláště v letních měsících)²⁹. Obvyklé střední hodnoty koncentrací estrogenů nejběžněji se vyskytujících v odtocích z ČOV uvádí tabulka I. V přepočtu na estradiolové ekvivalenty EEQ se estrogenní odtoků z městských ČOV pohybuje zpravidla v rozmezí od 2,5 ng l⁻¹ do 25 ng l⁻¹ (zjištěno v Německu)¹³.

V důsledku neúplného odstraňování na ČOV látky s estrogenní aktivitou přecházejí do povrchových vod, případně se adsorbují na sedimenty a mohou kontaminovat podzemní vodu^{4,12}. Odtoky z ČOV jsou hlavním zdrojem estrogenních látek v povrchových vodách¹².

8. Estrogenita a biodegradabilita alkylfenolů

Vzhledem k širokému měřítku použití a současně vysoké biologické stabilitě a nezanedbatelné estrogenní aktivitě patří alkylfenoly mezi nejzávažnější environmentální estrogeny.

Nonylfenol obecně vyvolává estrogenní odezvu^{31,32}, avšak rozhodující je struktura nonylu. Autoři práce³¹ zjistili, že estrogenní potenciál směsi rozvětvených isomerů je vyšší než lineárního nonylfenolu. Naopak jiní autoři¹¹ našli téměř stejné interakce s estrogenními receptory 4-*n*-nonylfenolu jako směsi rozvětvených isomerů 4-nonylfenolu. Záleží tedy na aplikované metodě stanovení estrogenní. Nejvýraznější estrogenní aktivitu vykazuje isomer 4-(1,1,4-trimethylhexyl)fenol (cit.¹⁴). Estrogenní potenciál 4-*terc*-oktylfenolu je vyšší než směsi rozvětvených isomerů 4-nonylfenolu (cit.¹¹) a lineární 4-oktylfenol estrogenní účinky prakticky nemá³³. Estrogenní působení nonylfenolu na ryby bylo prokázáno např. na lososech *Salmo salar*²³, na kaprech *Cyprinus carpio*³², na halančících *Oryzias latipes* (již od koncentrace 0,1 μg l⁻¹)³⁴. Rovněž byla zaznamenána bioakumulace nonylfenolu v těle ryb³².

Účinného odstranění estrogenní nonylfenolu lze docílit pomocí ligninolytických enzymů^{27,35}. Tyto extracelulární enzymy, produkované některými stopkovými

houbami, rozkládají rovněž estradiol, ethynylestradiol, bisfenol A a další látky²⁷.

Avšak vůči směsným kulturám mikroorganismů přítomným v aktivovaném kalu, v povrchových vodách nebo v půdě jsou alkylfenoly velmi rezistentní. Ve značné míře se adsorbují na sedimenty, půdní částice a organickou hmotu v kalových agregátech, což snižuje jejich biologickou dostupnost pro mikroorganismy a současně mobilitu v prostředí^{30,36}. Biodegradace alkylfenolů je podmíněna dostatečným přístupem kyslíku³⁰. Proto v sedimentech nebo v půdě rozklad probíhá zpravidla pomaleji než ve vodním sloupci. Anaerobně stabilizovaný kal z ČOV obvykle obsahuje vysoké koncentrace nonylfenolu, který se v případě aplikace kalu v zemědělství dostává do půdy³⁶. V anaerobních podmínkách uvnitř kalových agregátů je nonylfenol rezistentní, biodegradaci podléhá pouze na povrchu agregátů nebo v homogenizované směsi půdy a kalu za dostatečného přístupu kyslíku³⁶.

Biodegradabilita nonylfenolu významně závisí na teplotě, což bylo prokázáno např. pomocí laboratorního modelu SCAS (semi-continuous activated sludge – semi-kontinuální model s aktivovaným kalem): zatímco při teplotě v rozmezí 10 °C až 15 °C bylo dosaženo účinnosti odstranění nonylfenolu 30 % až 50 %, při teplotě kolem 28 °C činil stupeň odstranění až 99 % (cit.³⁷). Rovněž byl sledován³⁸ pozitivní vliv vyšší teploty na rozklad nonylfenolu v sedimentech.

Důležitým faktorem z hlediska biologické rozložitelnosti alkylfenolů je struktura alkyly. Respirometrické testy biodegradability se směsnou kulturou mikroorganismů (podle ČSN EN 29408) prokázaly, že zatímco směs rozvětvených isomerů 4-nonylfenolu nejvíce za daných podmínek žádné známky rozkladu, lineární 4-nonylfenol podlehl alespoň částečné biodegradaci. Stupeň rozkladu 4-*n*-nonylfenolu, vypočítaný na základě biochemické spotřeby kyslíku za 28 dní činil 60 %, což je právě limitní hodnota pro hodnocení látky jako snadno rozložitelné.

Z aktivovaného kalu byly izolovány³⁹ kvasinky *Candida maltosa*, které jsou schopné rozkládat nonylfenol výhradně s lineárním alkylem. Rozvětvené isomery nonylfenolu za určitých podmínek využívají např. bakterie rodu *Pseudomonas*³⁸ nebo *Sphingomonas*⁴⁰.

9. Kontaminace povrchových vod

Ačkoliv se estrogenní látky značně adsorbují na sedimenty a půdní částice, současně zůstávají dostatečně mobilní na to, aby kontaminovaly vodu¹⁹. Silnou afinitu k sedimentům vykazují např. alkylfenoly, podstatně slabší estrogenní steroidy, prakticky zanedbatelnou bisfenol A (cit.⁴¹).

Koncentrace estrogenních látek v podélném profilu vodních toků klesá po proudu s rostoucí vzdáleností od vyústění odtoků z ČOV (cit.⁴²). Tato skutečnost je dána nejen naředěním a promícháním vyčištěné odpadní vody s povrchovou vodou, ale také pokračujícím rozkladem alespoň některých estrogenních látek, případně jejich sorp-

cí na tuhé částice. Koncentrace se rovněž mění s časem, což pravděpodobně souvisí s proměnlivými srážkami, s kolísáním kvality i průtoku vypouštěné vody z ČOV, s teplotními změnami apod. Nejnižší estrogenitu povrchové vody vykazují obvykle v letních měsících⁴². Zajímavé je, že v mokřadním ekosystému byl shledán⁴² větší úbytek estrogenního potenciálu než na stejně dlouhém úseku v řece.

Např. v řekách v okolí Paříže se koncentrace estrogenů pohybuje řádově v jednotkách ng l^{-1} , přičemž na estrogenním potenciálu vody se asi ze 35 % až 50 % podílí ethynylestradiol (cit.¹²). V některých lokalitách, např. v okolí Barcelony, dominuje nonylfenol, jehož koncentrace v řekách dosahuje až stovek $\mu\text{g l}^{-1}$ (cit.²⁹). V řekách v jižním Německu byly nalezeny⁴ koncentrace steroidních estrogenů i bisfenolu A řádově v jednotkách ng l^{-1} , alkylfenolů v jednotkách až desítkách ng l^{-1} . Srovnatelné hodnoty byly stanoveny⁸ ve vzorcích z italské řeky Tiber, pouze koncentrace nonylfenolu se pohybovala poněkud výše (kolem 1400 ng l^{-1}).

Snížit přísun estrogenních látek do recipientů lze pomocí legislativních opatření, která omezí nebo dokonce zakážou aplikaci těchto látek v průmyslových produktech. Např. oxyethylenáty alkylfenolů již jsou zařazeny do seznamu nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejichž uvádění na trh je zakázáno nebo omezeno (Vyhláška MŽP č. 221/2004 Sb.). Sdružení větších výrobců pracích prostředků se v rámci dobrovolné dohody s MŽP zřeklo aplikace tenzidů na bázi alkylfenoethoxylátů v detergentech pro domácnost. V nařízení vlády ČR č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod jsou uvedeny imisní limity pro nonylfenoly ($0,33 \mu\text{g l}^{-1}$) a pro oktylfenol ($0,01 \mu\text{g l}^{-1}$).

Pokud se povrchová voda upravuje na pitnou, je třeba vzít v úvahu riziko kontaminace endokrinními disruptory¹². Mohou být přítomny v nezanedbatelných koncentracích – v jisté vodovodní vodě např. bylo stanoveno $2,1 \text{ ng l}^{-1}$ estradiolu a $0,5 \text{ ng l}^{-1}$ ethynylestradiolu (cit.¹²). Autoři práce⁴¹ zjistili, že ve vodonosné vrstvě dochází k poměrně rychlé biodegradaci estradiolu i 4-*n*-nonylfenolu (s poločasem rozpadu 2 d resp. 7 d) a k pomalé biodegradaci ethynylestradiolu (s poločasem rozpadu 81 d), avšak vždy je nezbytným předpokladem aerobní prostředí.

10. Metody stanovení látek s estrogenní aktivitou

Je třeba rozlišovat mezi analytickým stanovením jednotlivých látek a stanovením jejich celkových estrogenních účinků. Analytické metodiky pro stanovení endokrinních disruptorů ve vodách jsou založeny na separaci látek ze vzorku (většinou se používá extrakce tuhou fází) a následném stanovení vhodnou chromatografickou technikou. Podrobnosti o možnostech analytického stanovení estrogenních sloučenin lze nalézt např. v literatuře⁸. Tyto meto-

dy sice umožňují identifikaci a kvantifikaci látek estrogenního charakteru, avšak pro posouzení estrogenity se jeví vhodnější metody využívající biologické materiály, které stanoví estrogenní aktivitu vzorku.

Estrogenitu lze detegovat různými technikami, založenými na aktivaci určitých genů či enzymů, na kontrole proliferace jistých buněk, nebo využívajícími specifické bioindikátory⁵. V praxi se používají jak testy *in vitro*, tak testy *in vivo*. Jednotlivé metody pracují za různých podmínek, vykazují rozdílnou citlivost a výsledky bývají vzájemně obtížně srovnatelné³.

Jako bioindikátor se používá např. vitellogenin^{5,23}, laktoferrin⁵, specifické bílkoviny *Zrp* (bílkoviny *Zona radiata*)²³, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa nebo ornithin dekarboxylasa⁴³. Je-li vitellogenin detegován v krvi samců, dokazuje expozici estrogeny⁵. Laktoferrin je glykoprotein vázající železo, který má mnoho biologických funkcí; k důkazu estrogenů se využívá jeho zvýšená hladina v děloze pokusných myší⁵. Bílkoviny *Zrp* slouží jako obal vyvíjejících se vajíček a jeví se dokonce mnohem citlivějším indikátorem estrogení stimulace než vitellogenin²³.

Byly vyvinuty také speciální metody pro stanovení estrogenity, které jsou založeny na zkoumání vazby mezi látkou a receptorem (viz např. studie¹¹).

LITERATURA

1. Crisp T. M., Clegg E. D., Cooper R. L., Anderson D. G., Baetcke K. P., Hoffmann J. L., Morrow M. S., Rodier D. J., Schaefer J. E., Touart L. W., Zeeman M. G., Patel Y. M., Wood W. P.: *Risk Assessment Forum US EPA*, Washington D.C., 1997.
2. Bonefeld-Jørgensen E. C.: *Sci. Total Environ.* 331, 215 (2004).
3. Gutendorf B., Westendorf J.: *Toxicology* 166, 79 (2001).
4. Kuch H. M., Ballschmiter K.: *Environ. Sci. Technol.* 35, 3201 (2001).
5. Holoubek I., Čadová L.: *Klinická onkologie (zvláštní číslo)*, 25 (2000).
6. http://www.pharmanews.cz/2004_03/cimicifuga.htm, staženo 16.7.2004.
7. Kaprál A., Fait T.: *Praktická gynekologie* 4/03, 10 (2003).
8. Laganà A., Bacaloni A., De Leva I., Faberi A., Fago G., Marino A.: *Anal. Chim. Acta* 501, 79 (2004).
9. Wober J., Weißwange I., Vollmer G.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1782, 1 (2003).
10. <http://menofem.softis.cz>, staženo 16.7.2004.
11. Hu J.-Y., Aizawa T.: *Wat. Res.* 37, 1213 (2003).
12. Cargouët M., Perdiz D., Mouatassim-Souali A., Tami-sier-Karolak S., Levi Y.: *Sci. Total Environ.* 324, 55 (2004).
13. Körner W., Bolz U., Süßmuth, Hiller G., Schuller W., Hanf V., Hagenmaier H.: *Chemosphere* 40, 1131 (2000).
14. Kim Y.-S., Katase T., Sekine S., Inoue T., Makino M.,

- Uchiyama T., Fujimoto Y., Yamashita N.: *Chemosphere* 54, 1127 (2004).
15. D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi R.: *Sci. Total Environ.* 302, 199 (2003).
 16. Hill R. Jr., Janz D. M.: *Toxicology* 63, 417 (2003).
 17. Svenson A., Allard A.-S., Ek M.: *Wat. Res.* 37, 4433 (2003).
 18. Desbrow C., Routledge E. J., Brighty G. C., Sumpter J. P., Waldock M.: *Environ. Sci. Technol.* 32, 1551 (1998).
 19. Hanselman T. A., Graetz D. A., Wilkie A. C.: *Environ. Sci. Technol.* 37, 5471 (2003).
 20. Irwin L. K., Gray S., Oberdörster E.: *Aquat. Toxicol.* 55, 49 (2001).
 21. <http://menostop.sweb.cz>, staženo 16.7.2004.
 22. Parkkonen J., Larsson D. G. J., Adolfsson-Erici M., Pettersson M., Berg A. H., Olsson P.-E., Förlin L.: *Mar. Environ. Res.* 50, 191 (2000).
 23. Arukwe A., Celius T., Walther B. T., Goksøyr A.: *Mar. Environ. Res.* 46, 133 (1998).
 24. Sultan Ch., Balaguer P., Terouanne B., Georget V., Paris F., Jeandel C., Lumbroso S., Nicolas J.-C.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 178, 99 (2001).
 25. Jager C. de, Bornman M. S., Horst G. van der: *Andrologia* 31, 99 (1999).
 26. Segner H., Caroll K., Fenske M., Janssen C. R., Mack G., Pascoe D., Schafers C., Vandenberg G. F., Watts M., Wenzel A.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302 (2003).
 27. Suzuki K., Hirai H., Murata H., Nishida T.: *Wat. Res.* 37, 1972 (2003).
 28. Vader J. S., Ginkel C. G. van, Sperling F. M. G. M., Jong J. de, Boer W. de, Graaf J. S. de, Most M. van der, Stokman P. G. W.: *Chemosphere* 41, 1239 (2000).
 29. Solé M., López de Alda M. J., Castillo M., Porte C., Ladegaard-Pedersen K., Barceló D.: *Environ. Sci. Technol.* 34, 5076 (2000).
 30. Ying G.-G., Williams B., Kookana R.: *Environ. Int.* 28, 215 (2002).
 31. Balaguer P., François F., Comunale F., Fenet H., Boussioux A.-M., Pons M., Nicolas J.-C., Casellas C.: *Sci. Total Environ.* 233, 47 (1999).
 32. Villeneuve D. L., Villalobos S. A., Keith T. L., Snyder E. M., Fitzgerald S. D., Giesy J. P.: *Chemosphere* 47, 15 (2002).
 33. Kim K. B., Seo K. W., Kim Y. J., Park M., Park Ch. W., Kim P. Y., Kim J. I., Lee S. H.: *Chemosphere* 50, 1167 (2003).
 34. Kashiwada S., Ishikawa H., Miyamoto N., Ohnishi Y., Magara Y.: *Wat. Res.* 36, 2161 (2002).
 35. Tsutsumi Y., Haneda T., Nishida T.: *Chemosphere* 42, 271 (2001).
 36. Hesselsoe M., Jensen D., Skals K., Olesen T., Moldrup P., Roslev P., Mortensen G. K., Henriksen K.: *Environ. Sci. Technol.* 35, 3695 (2001).
 37. Tanghe T., Devriese G., Verstraete W.: *Wat. Res.* 32, 2889 (1998).
 38. Yuan S. Y., Yu C. H., Chang B. V.: *Environ. Pollut.* 127, 425 (2004).
 39. Corti A., Frassinetti S., Vallini G., D'Antone S., Fichi C., Solaro R.: *Environ. Pollut.* 90, 83 (1995).
 40. Corvini P. F. X., Vinken R., Hommes G., Schmidt B., Dohmann M.: *Biodegradation* 15, 9 (2004).
 41. Ying G.-G., Kookana R. S., Dillon P.: *Wat. Res.* 37, 3785 (2003).
 42. Hemming J. M., Allen H. J., Thuesen K. A., Turner P. K., Waller W. T., Lazorchak J. M., Lattier D., Chow M., Denslow N., Venables B.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 303 (2004).
 43. An B.-S., Choi K.-Ch., Kang S. K., Hwang W. S., Jeung E.-B.: *Reprod. Toxicol.* 17, 311 (2003).

H. Kujalová, V. Sýkora, and P. Pitter (*Department of water technology and environmental engineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Estrogenic Substances in Water**

A broad spectrum of substances showing estrogenic activities in aquatic and terrestrial organisms occur in wastewaters. An overwhelming majority of the compounds are insofar biologically stable that their removal by water treatment is incomplete and thus they contaminate the environment. Chronic exposures to estrogens cause reproduction disorders and evolution defects in a number of animals. With humans, it is assumed that inadequate actions of estrogens in organisms can lead to lower fertility and a higher occurrence of evolution abnormalities. Due to the adverse effects of estrogens, the problems of their occurrence, transport and biotransformation are very topical. The review gives substances of estrogenic nature including their chemical structure, origin, occurrence and interactions with organisms. It brings the usual concentration ranges of most important estrogens in waste and surface waters and documents their poor removability in wastewater purifying plants. Their estrogenic potentials are compared and their biodegradability is evaluated.

KOROZNÍ VLASTNOSTI FYZIKÁLNĚ NANÁŠENÝCH TENKÝCH VRSTEV

JAN MACÁK^a, MARTINA PAZDEROVÁ^b, IVO JIŘÍČEK^a, PAVEL MALÝ^b, KAREL OLYŠAR^c, LADISLAV CVRČEK^c a JAN VOŠTA^a

^a Ústav energetiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Výzkumný a zkušební letecký ústav, a.s., Beranových 130, 199 05 Praha 9, ^c HVM Plasma, s.r.o., Na Hutance 2, 158 00 Praha 5

Došlo 22.6.06, přepracováno 14.2.07, přijato 1.3.07.

Klíčová slova: protikoroziční ochrana, PVD vrstvy, kadmiování, elektrochemické koroziční testy, plazma, naprašování, napařování, magnetron

Obsah

1. Úvod
2. Metody nanášení vrstev
 - 2.1. Chemická depozice z plynné fáze
 - 2.2. Fyzikální depozice z plynné fáze
3. PVD vrstvy a jejich koroziční vlastnosti
 - 3.1. Povlaky na bázi titanu a jeho sloučenin
 - 3.2. Povlaky na bázi chromu a jeho sloučenin
 - 3.3. Povlaky na bázi zirkonia a jeho sloučenin
 - 3.4. Povlaky na bázi uhlíku
 - 3.5. Povlaky na bázi hliníku
 - 3.6. Další typy povlaků
4. Závěr

1. Úvod

Nanášení vrstev za velmi nízkých tlaků je proces známý již přes 150 let. Při studiu doutnavých výbojů zaznamenal William Grove jev, označený později jako „naprašování“ (sputtering); na vyleštěné stříbrné destičce zapojené jako anoda v elektrickém oblouku vytvořil nános stříbra, jehož zdrojem byl drát zapojený jako katoda¹. Grove se tímto jevem dále nezabýval a dnes jsou známější jeho práce v oblasti elektrochemie, např. vynález palivového článku. V jedné ze svých prací, zabývajících se studiem optických vlastností jemných částic zlata, popsal Michael Faraday vznik tenké vrstvy, nanesené z plynné fáze během „prudkého spalování zlata pomocí Voltovy baterie v blízkosti skla²...“. I v tomto případě se jednalo spíše o „vedlejší produkt“ bádání, a tak první detailní popis obloukového nanášení vrstev pochází od profesora A. W.

Wrighta (Yale University) o 20 let později³. Autorem několika patentů, popisujících využití vakuového nanášení kovů, je T. A. Edison^{4,5}. Techniku nanášení kovů v elektrickém oblouku využil např. k vytváření matric pro svůj fonograf. Rozsáhlý pohled na výzkumné studie, které připravily půdu k bouřlivému rozvoji technik vakuového nanášení v posledních dvaceti letech, přináší např. práce D. M. Mattox⁶. Lze mezi nimi jmenovat Penningův objev možnosti vázat plazma v blízkosti povrchu kombinací elektrického a magnetického pole⁷, což byla pionýrská práce v oblasti magnetronového naprašování, nebo Bradleyho práci o depozici uhlíku v elektrickém oblouku⁸. Naopak depozice pyrolytického uhlíku popsána Sawyerem a Manem⁹ již v roce 1880 je jednou z prvních prací týkajících se tzv. chemické depozice z plynné fáze (Chemical Vapour Deposition – CVD). Pionýrskou prací v oblasti iontového plátování (Ion Plating) byla Mattoxova studie z roku 1963, popisující vliv potenciálu na urychlení iontů během nanášení z plazmatu¹⁰.

Jedna z prvních zmínek o použití vakuového nanášení vrstev k protikorozičním účelům se týká vakuového kadmiování¹¹. Vakuovým kadmiováním se lze totiž vyhnout jedné nepříjemné vlastnosti, kterou se vyznačuje elektrolytické kadmiování, a sice penetraci vodíku do struktury chráněného kovu, vedoucí k vodíkovému křehnutí chráněného materiálu. Problémem všech kadmiových vrstev pochopitelně zůstává jiná negativní vlastnost kadmia, a tou je toxicita.

Právě toxicita kadmia je důvodem řady legislativních restrikcí umožňujících použití kadmiových vrstev jen pro speciální protikoroziční aplikace (např. direktivy EU 91/338/EEC a 76/769/EEC).

Tato práce stručně diskutuje několik základních způsobů nanášení tenkých vrstev za nízkých tlaků a přináší přehled korozičních vlastností běžnějších typů vrstev, nanášených fyzikální depozicí.

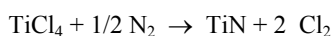
2. Metody nanášení vrstev

Obecnou podstatou těchto metod je tvorba vrstvy kondenzací z plynné fáze. Podle toho, zda se při tvorbě vrstvy uplatňují fyzikální principy, nebo zda vrstva vzniká chemickou reakcí prekurzorů, lze tyto metody rozdělit na fyzikální depozici z plynné fáze (metody PVD – Physical Vapour Deposition) nebo na již zmíněnou depozici chemickou (metody CVD).

2.1. Chemická depozice z plynné fáze

Metody CVD jsou starší než PVD a jejich podstatou je to, že k tvorbě povlaku dochází chemickou reakcí na povrchu povlakovaného substrátu. Tím je vytvářena tuhá

vrstva požadované látky. Obvyklá tloušťka naneseného povlaku se pohybuje v rozmezí 0,1 až 10 μm . CVD je systém s otevřeným vstupem a výstupem plynu a zařízení se skládá z následujících částí: systém pro zplyňování, chemický reaktor s objemem v rozsahu cm^3 až m^3 , v němž jsou umístěny povlakované předměty, a odpadní systém pro zreagovaný plyn. Vstupní sloučeniny mohou být anorganické (např. halogenidy, hydridy, karbonyly) nebo organické (např. alkyloxidy nebo organokovové sloučeniny). Struktura povlaku je výsledkem několika kroků: adsorpce – desorpce, povrchové reakce, difuze povrchem, nukleace, vytvoření vrstvy a procesů stárnutí ve vrstvě během nanášení. Povrchové chemické reakce, představující vlastní depozici, neprobíhají samovolně. Používá se proto řada způsobů aktivace, z nichž nejběžnější je termická (TCVD – Thermal CVD). Provádí se buď zahřátím reaktoru obsahujícího vzorky (teplotěnný reaktor) nebo pouhým zahřátím vzorků (chladnostěnné procesy) na teplotu nanášení. Příkladem vysokoteplotního CVD procesu může být depoziční reakce nitridu titanu¹²:



kteřá probíhá při teplotě 1100 °C. Chemická reakce na povrchu může být také aktivována laserem. V takovém případě je možné lokální nanášení v jednotkách mikrometrů. Laserový proces CVD může být převážně tepelný nebo převážně fotochemický (foto CVD) a umožňuje povlakování povrchů přímým laserovým zápisem. Rychlost nanášení (0,1–1 $\mu\text{m min}^{-1}$) je většinou kompromisem mezi strukturou povlaku a nanášeným práškem. Tepelně aktivované nanášení CVD se průmyslově využívá při výrobě tvrdých povlaků (TiC, TiN, Al_2O_3) a v depozičních procesech při výrobě elektronických součástek (Si, SiO_2 , Si_3N_4). Nutnost udržení substrátu na vysoké teplotě po dostatečně dlouhou dobu lze považovat za základní nevýhodu metody CVD, která ji pro řadu použití diskvalifikuje. Metodu TCVD nelze z tohoto důvodu použít např. pro povlakování vysoce pevných ocelí, neboť vystavení takového substrátu vysoké teplotě by mělo za následek změny v jeho struktuře a vedlo by ke ztrátě mechanických vlastností získaných předchozím tepelným zpracováním. Použití nižších teplot je možné např. při plazmově aktivovaném povlakování CVD (Plasma Activated CVD – PACVD), které je též označováno jako PECVD (Plasma Enhanced CVD). K iniciaci plazmatu se využívá stejnosměrný výboj nebo střídavý výboj v rozmezí frekvencí od MHz do GHz. Ve stejnosměrném výboji je vzorek zapojen jako katoda a výboj se iniciuje mezi anodou a katodou. Povrch katody se povlakuje a současně je bombardován kladnými ionty, urychlenými polem o intenzitě několika stovek V m^{-1} a proudovou hustotou 1–10 mA cm^{-2} . Jestliže je povlakovaný vzorek izolant, je nutné užití střídavého výboje, aby se předešlo vlivu nabíjení. Různá pohyblivost iontů a elektronů vede k vytvoření vrstvy prostorového náboje s potenciálovým spádem podobným jako ve stejnosměrné plazmě. Plazma může jednak tvorbou meziproductů, radikálů, excitovaných molekul a iontů měnit složení plynné fáze (daleko od vzorků) a může také upravovat plynnou

fázi a podmínky povlakování (přímo nad povlakovaným povrchem). Metody PACVD se využívá k výrobě tvrdých povlaků na ocelích a při výrobě elektronických prvků (Si_3N_4).

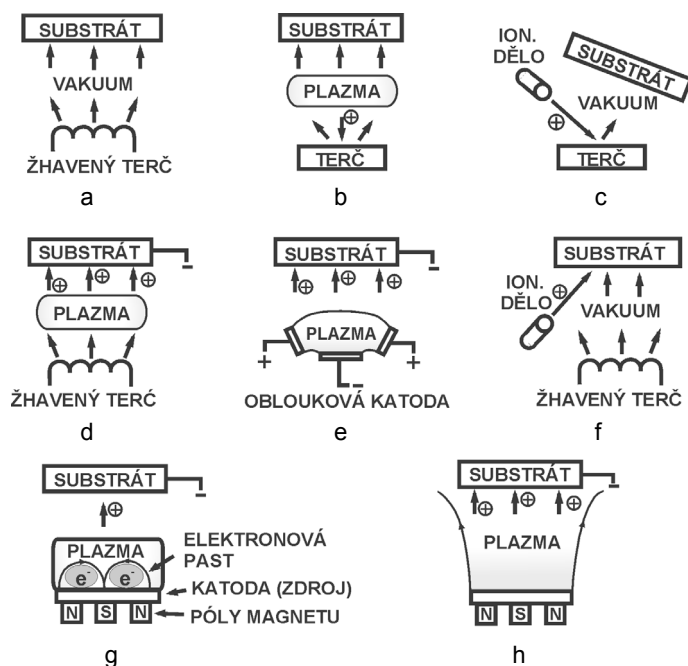
Vzhledem k tomu, že při povlakování CVD je nezbytné udržet vysokou teplotu substrátu, aby na povrchu mohla proběhnout chemická reakce, nelze tento postup použít na všechny druhy substrátů. Další nevýhodou je omezený rozsah prvků, majících sloučeniny v plynném skupenství. Proto v posledních letech získává převahu povlakování PVD, které nevyžaduje setrvání substrátu na vysoké teplotě a teplota povlakovacího procesu je celkově nižší.

2.2. Fyzikální depozice z plynné fáze

Při fyzikální depozici z plynné fáze je látka zvolená k povlakování uvolňována z kapalného nebo tuhého zdroje (terče) ve formě atomů nebo molekul, transportována ve formě páry nízkotlakým prostředím nebo plazmatem k substrátu, na jehož povrchu kondenzuje. Příklady procesů PVD jsou schematicky znázorněny na obr. 1. Obvykle se technologie PVD využívají k nanášení vrstev, jejichž tloušťka se pohybuje v rozmezí 10^{-3} až 10 μm , lze je rovněž použít k nanášení multivrstev, vrstev o proměnném složení, jakož i velmi silných vrstev (až mm). Na rozdíl od technik CVD se používají velmi nízké pracovní tlaky (<100 Pa). Technologii PVD lze nanášet širokou škálu anorganických vrstev (kovy, slitiny, směsi atd.) stejně jako některé organické vrstvy. Procesy PVD lze rozdělit zhruba do dvou základních kategorií – naprašování (obr. 1b,c) a napařování^{13,14} (obr. 1a).

Napařování je proces založený na sekundární emisii iontů. Dochází při něm k přenosu kinetické energie z energetické částice (např. iontu), dopadající na pevný nebo kapalný zdroj (terč). To vede k vypuzení povrchových atomů nebo molekul do plynné fáze. Zdrojem energetických částic může být iontové dělo nebo plazma za nízkého tlaku (<0,5 Pa), ve kterém částice vypuzené z povrchu procházejí minimem srážek. Terč a substrát jsou umístěny ve vakuové komoře s tlakem 10^{-2} – 10^{-5} Pa. Terč (katoda) je připojen ke zdroji záporného přepětí a substrát je většinou umístěn proti terči. Jako terč se používají prvky, slitiny, směsi nebo chemické sloučeniny. Pokud jsou nanášeny sloučeniny (např. nitridy nebo karbidy), jsou v plazmatu přítomny částice reaktivního (pracovního) plynu (např. dusíku nebo acetyleny).

Vložením magnetického pole do systému získáme magnetronové napařování (obr. 1g,h), vyznačující se výrazně vyšší účinností ionizace. Existuje několik prostorových uspořádání magnetronového povlakování. Může to být cylindrický, rovinný nebo magnetronový S-rozprašovač. Cylindrický magnetron je velice výhodný při vytváření rovnoměrných povlaků na velkých plochách, protože využívá dlouhé katody. Kromě toho je tato metoda účinná pro povlakování složitě tvarovaných předmětů. Kovové a dielektrické filmy se připravují při vyšších rychlostech nanášení s rovinným magnetronem. Magnetronem s S-rozprašovačem lze nejlépe vytvářet vrstvy na tepelně



Obr. 1. Schematické znázornění příkladů procesů PVD; (a) vakuové napařování, (b) plazmové napařování, (c) vakuové napařování, (d) iontové plátování s termálním zdrojem, (e) iontové plátování s obloukovým zdrojem, (f) depozice podporovaná iontovým svazkem (IBAD – Ion Beam Assisted Deposition), (g) napařování s rovnovážným magnetronem, (h) napařování s nerovnovážným magnetronem

citlivé substráty (např. elektronické součástky), neboť tato metoda umožňuje dobrou izolaci substrátu od plazmy. Magnetron může být dále ještě rovnovážný (obr. 1g) a nerovnovážný (obr. 1h), přičemž druhá z uvedených možností je výhodnější, protože umožňuje, aby se plazma lépe dostal k substrátu a povlakovací proces je tedy účinnější.

Při napařování se materiál převede do stavu páry různými způsoby zahřátí (odporově, indukčně, katodickým a anodickým obloukem, elektronovým paprskem nebo laserem). Napařování se provádí ve vakuu 10^{-3} – 10^{-8} Pa. Nevýhodou obloukového napařování je vznik drobných kapek během procesu nanášení, které negativně ovlivňují kvalitu povlaku. Tento problém lze odstranit použitím elektromagnetického filtru, který makročástečky odstraní, ale zároveň dojde ke zpomalení procesu.

Smišeným PVD procesem je iontové plátování (Ion Plating); proces je občas nazýván též Ion Assisted Deposition (IAD), kdy dochází k vytváření atomárního filmu procesem, při kterém je povrch substrátu a/nebo nanášený film vystaven proudu částic s vysokou energií, dostatečnou k tomu, aby způsobila změny na rozhraní mezi filmem a substrátem. Může tak dojít ke změnám přilnavosti filmu, morfologie filmu, hustoty nebo napětí. Zdrojem nanášených částic může být napařování, napařování, plyn nebo pára. Iontové plátování lze uskutečnit v prostředí plazmatu, ze kterého pocházejí ionty bombardující substrát (obr. 1d,e), nebo ve vakuu. V takovém případě je zdrojem

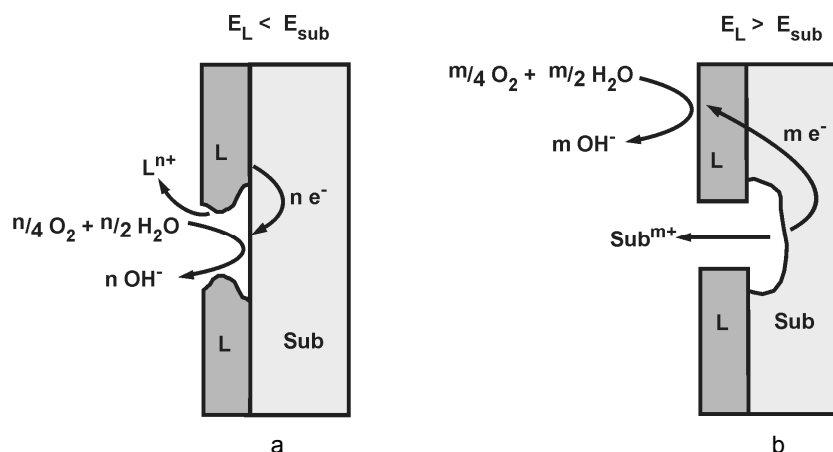
iontů „iontové dělo“ a tato konfigurace se často označuje jako Ion Beam Assisted Deposition (IBAD) (obr. 1f).

Existuje též řada hybridních procesů, např. spojením obloukové a magnetronové technologie vznikla metoda ABS (Arc Bond Sputtering), při které je adhezivní mezivrstva nanášena obloukovým napařováním. Na tuto vrstvu je pak další vrstva napařována magnetronem¹².

Velká přizpůsobivost procesů PVD umožňuje nanášet celou řadu materiálů, včetně kovů, slitin, polovodičů, supravodičů, polymerů a připravovat různé typy kompozitů (vláknový, částicový). Každá z uvedených metod má svoje výhody a nevýhody a je třeba zvážit další použití povlakovaného předmětu a zvolit vhodný postup nanášení.

3. PVD vrstvy a jejich korozní vlastnosti

Tvrdé PVD vrstvy (nitridy, karbidy, karbonitridy, oxidy...) jsou nanášeny na různé typy substrátů (ocel, sklo, plasty...) za účelem zlepšení jejich funkčních či estetických vlastností. Povlakováním lze měnit ve velmi širokém spektru povrchové vlastnosti předmětu, které často zásadně ovlivňují i jeho vlastnosti funkční. Jedná se o vlastnosti optické (barva, lesk, absorpce záření), přes změny vlastností chemických (korozní odolnost, rozpustnost aj.), až po změny vlastností elektrických (vodivost), či mechanických (tvrdost, koeficient tření aj.). Rozmanitost vlastností ovlivnitelných nanášením vhodného povlaku se



Obr. 2. Obecná zjednodušená schémata korozního procesu s kyslíkovou depolarizací, probíhajícího v systému vodivý porézní povlak (L) – kovový substrát (Sub) o různé elektrochemické ušlechtilosti; (a) substrát ušlechtilější než povlak – v pórech probíhá preferenčně katodický děj, (b) povlak ušlechtilější než substrát – anodický děj probíhá preferenčně v pórech

odráží i v širší aplikačních možnostech: od ochrany povrchů a funkce dekorativní, přes zvyšování životnosti nástrojů a součástí ve strojírenství a zdravotnictví, až po optické filtry či mikroelektroniku.

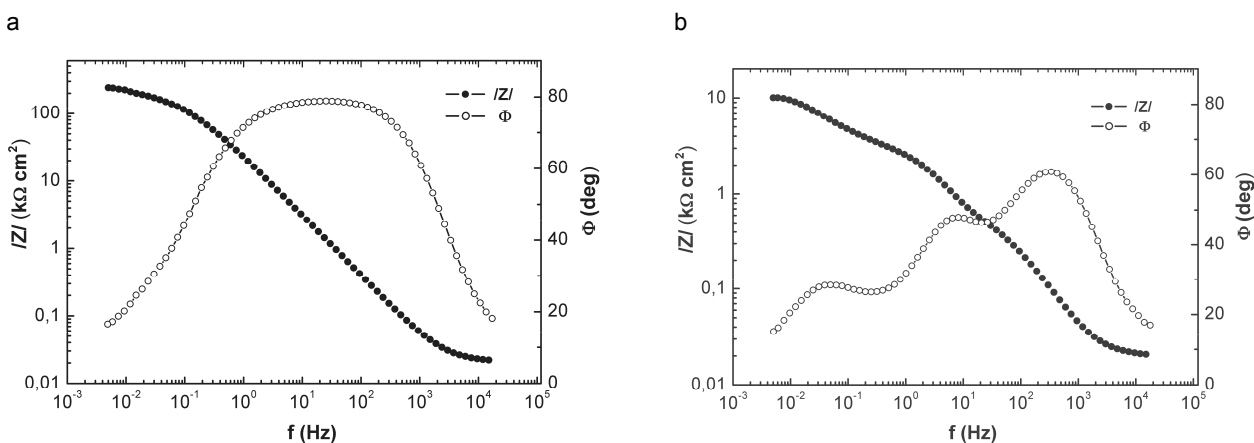
Nejčastěji sledované parametry vrstev PVD zahrnují tloušťku, přilnavost k substrátu, odolnost vůči otěru, odolnost povlaku vůči korozi a poréznost. Z hlediska korozních charakteristik PVD je právě poréznost kritickým parametrem. Řada vrstev se vyznačuje sloupcovou strukturou (např. vrstvy na bázi nitridu titanu¹⁵), pro niž je typická poréznost vertikální vůči povrchu¹³. Důsledkem je relativně snadná penetrabilita vrstvy elektrolytem a následný rozvoj koroze substrátu. Poréznost multivrstev bývá nižší, neboť vrchní vrstva často uzavře póry ve vrstvě podložní. Dalším problémem PVD vrstev mohou být poruchy vzniklé během nanášení – vměstky nebo makropóry (tzv. „pinholes“) o průměru často až desítek mikrometrů. Jejich přítomnost vede k velmi rychlému koroznímu napadení. Z korozního hlediska důležitou vlastností většiny tvrdých PVD vrstev (tedy vrstev na bázi uhlíku, nitridů, karbidů, boridů a případně oxidů chromu, titanu a zirkonia) je jejich vyšší elektrochemická ušlechtilost vůči substrátu z běžných ocelí. V jejím důsledku představují tyto vrstvy sice bariérovou, ale nikoliv elektrochemickou ochranu proti korozi (obr. 2a). Kapilární kondenzace vlhkosti či průnik elektrolytu pórem vede pak většinou k rozvoji korozního napadení, urychlenému lokálními galvanickými články mezi povlakem, chovajícím se jako katoda a méně ušlechtilým substrátem, tvořícím dno póru a majícím anodické chování. Vysoký poměr plochy katody ku anodě pak může vést k vysoké proudové hustotě na anodě, a tedy k vysoké korozní rychlosti. Často dochází během relativně krátké expozice k podkorodování vrstvy PVD a její delaminaci. Výjimku tvoří vrstvy PVD na bázi hliníku, které jsou naopak většinou elektrochemicky méně ušlechtilé než ocel a jsou tedy v zásadě schopny poskytovat ocelovému

substrátu elektrochemickou ochranu podobným způsobem jako vrstvy zinku či kadmia (obr. 2b).

Ke studiu korozních vlastností vrstev PVD bývají aplikovány klasické expoziční korozní testy (např. expozice v solné mlze nebo v kondenzační komoře), velmi často se užívají elektrochemické metody. Uvádí se¹⁶, že při stanovení porozity mají elektrochemické metody výhodu před rastrovací elektronovou mikroskopií, která není schopna mikropóry identifikovat. Z elektrochemických metod lze zmínit např. měření korozního potenciálu, měření korozního šumu, stejnosměrné techniky (měření polarizačního odporu lineární polarizací, měření polarizačních křivek) nebo střídavé techniky (elektrochemická impedanční spektroskopie – EIS). Použití poslední uvedené techniky pro studium přenosového chování porézních materiálů bylo popsáno již před více než čtyřiceti lety^{17,18}. Aplikace impedanční spektroskopie na studium korodujících substrátů pokrytých povlakem PVD přináší řadu výhod, umožňuje např. okamžitou identifikaci průniku elektrolytu póry, sledování rozvoje důlkové koroze substrátu na dně póru i dalších dějů, souvisejících např. s přenosem hmoty během korozních dějů (obr. 3).

3.1. Povlaky na bázi titanu a jeho sloučenin

Čistý titan sice patří k elektrochemicky málo ušlechtilým prvkům, je ovšem velmi snadno pasivovatelný. Pasivní vrstva na titanu je složena obvykle z rutilu (nicméně i další modifikace oxidu titaničitého mají ochranné vlastnosti) a vyznačuje se většinou značnou homogenitou a chemickou odolností. Nejběžnější sloučeninou titanu nanášenou procesem PVD je bezesporu nitrid. Má vynikající tvrdost a ořezuvzdornost a vysoce estetický zlatolesklý vzhled, a je tak předurčen i k dekorativním aplikacím. Vrstvy na bázi nitridu titanu se často aplikují na namáhané



Obr. 3. Bodeho diagramy impedance (tj. závislost modulu impedance a úhlu fázového posunu na frekvenci) měřené ve 3% NaCl při 20 °C, substrát uhlíková ocel, PVD povlak CrCxNy o tloušťce 2,4 μm; (a) expozice 3 h – dosud nedošlo k průniku elektrolytu póry, substrát je intaktní. (b) expozice 10 h – koroze substrátu v pórech povlaku, korozní děj řízen difúzí korozními produkty (cit.⁷⁴)

nástroje, hroty vrtáků, řezné nástroje apod. Mezi potenciálně významné technické aplikace patří depozice povlaku TiN na povrch lopatek parních turbín. Vysoká tvrdost TiN vede ke zvýšení odolnosti vůči korozně-eroznímu napadení, způsobenému mokrou párou^{19,20}.

Elektrochemickými vlastnostmi titanových povlaků se zabývala celá řada autorů. Creus a spol. sledovali elektrochemické vlastnosti Ti povlaku²¹ a zjistili, že hodnoty potenciálu klesají od hodnot blízkých koroznímu potenciálu pasivního titanu (–380 mV vůči nasycené kalomelové elektrodě (SCE)) až na –550 mV vs. SCE, což jsou hodnoty blízké koroznímu potenciálu oceli v mořské vodě. Další vývoj potenciálu je podobný jako u oceli, což potvrzuje, že vrstva je porézní a dochází k degradaci základního materiálu. Korozní potenciál oceli pokryté titanovým povlakem PVD se po 15 dnech v mořské vodě pohybuje okolo –560 mV vs. SCE. Tento střední korozní potenciál je výsledkem koroze oceli pod titanovou vrstvou²².

Korozní odolnost uhlíkové a korozivzdorné oceli s povlakem TiN studovali Liu a spol.²³. Ukázalo se, že metoda EIS je vhodná při stanovení korozních vlastností a kvality povlaku TiN naneseném na korozně aktivním substrátu (uhlíková ocel). Využitelnost této metody pro sledování korozních vlastností vrstvy TiN na pasivním substrátu (nerez ocel) je z důvodu podobnosti odezvy povlaku a substrátu omezená.

Vzhledem k tomu, že metoda EIS je nedestruktivní, umožňuje následná dlouhodobá měření. Modelováním EIS spekter vzorků s různou dobou expozice v korozním prostředí umožňuje sledovat změnu korozní odolnosti oceli s povlaky PVD (cit.^{15,24–26}).

Senna a spol. prováděli zkoušky povlaků Ti_xN_y s proměnlivým obsahem uhlíku a dusíku. Povlak s vyšším obsahem uhlíku je tvrdší a vykazuje lepší adhezi, ale zároveň s rostoucím obsahem uhlíku klesá korozní odolnost. Důvodem je evidentně rostoucí poréznost a tedy vyšší hustota korozního poškození v těchto povlácích²⁷.

Rudjenja a spol. studovali vliv předúpravy nitridací na korozní odolnost TiN. Ukázalo se, že takto předupravené vzorky jsou odolnější proti koroznímu napadení²⁸. Odolnost povrchu povlaků TiN proti oxidaci je možné zvýšit implantací hliníku do vrstvy. Implantace vede k vytvoření nových fází, (TiAl)N nebo AlN, v povrchové vrstvě²⁹. O nich bude pojednáno v odstavci 3.5. Rovněž implantace chromu do vrstvy nitridu titanu ovlivňuje pozitivně korozní vlastnosti^{30,31}.

3.2. Povlaky na bázi chromu a jeho sloučenin

Ochranné vlastnosti vrstev na bázi chromu a jeho sloučenin jsou podobné jako v případě titanových vrstev způsobené tím, že povlak je korozně odolnější než ocel. Tato vlastnost je opět spojena s vyšší elektrochemickou ušlechtilostí, a tudíž jakékoliv poškození nebo nehomogenita snižují korozní odolnost systému.

Studium morfologie a korozní odolnosti TiN a CrN pomocí rastrovací elektronové mikroskopie, rentgenové difrakce (XRD) a EIS odhalilo, že povlaky na bázi chromu mají hutnější, jemně zrnitou strukturu a menší poréznost než vrstvy na bázi titanu a jejich protikorozní ochrana je tak lepší¹⁵. Jestliže vzniknou korozně aktivní důlky pod povlakem nitridu titanu³², dochází k jejich rozšiřování mnohem rychleji než u CrN.

Hodnoty elektrodových kapacit získané pomocí impedančních měření prováděných na PVD vrstvách chromu a titanu, nanesených na inertním substrátu, sloužily k odhadu skutečného povrchu povlaku PVD. Vzhledem k tomu, že velikost skutečného povrchu závisí významně na hustotě a velikosti pórů, lze těchto dat využít k odhadu poréznosti³³. Byla též nalezena souvislost morfologie povrchu vrstev PVD a jejich korozní odolnosti. Elektrochemická měření potvrdila, že vrstvy CrN poskytují podstatně nižší ochranu ocelovému substrátu, než multivrstva CrN/

NbN. Důvodem je již výše uvedená nižší hustota defektů, postupujících multivrstvovými až k substrátu³⁴.

XRD a elektrochemická měření na vrstvách Cr, Cr₂N a CrN nanášených pomocí katodového oblouku prokázala souvislost jejich mikrostruktury a protikorozních ochranných schopností³⁵. Vrstvy CrN vykázaly nejnižší poréznost.

Výsledky elektrochemických měření ukázaly, že povlaky na bázi karbonitridu chromu mají až o dva řády vyšší poréznost než povlaky nitridu chromu. V případech obou typů vrstev došlo při měření k delaminaci povlaku, způsobené lokální korozí³⁶.

Impedanční spektroskopie byla aplikována též ve formě měření v elektrochemické mikrocele o rozlišení 10 μm ke studiu chování defektů ve vrstvách CrN_x a TiC_xN_y (cit.^{37,75}).

3.3. Povlaky na bázi zirkonia a jeho sloučenin

Korozní zkoušky povlaků Zr, ZrN a ZrN/Zr ukázaly, že dvouvrstvý povlak ZrN/Zr má lepší korozní odolnost než jednoduché vrstvy³⁸.

Milošev a spol.³⁹ porovnávali chování povlaků ZrN, TiN a CrN, přičemž zjistili, že povlaky ZrN vykazují podobnou kinetiku a průběh atmosférické oxidace jako povlaky TiN. Bylo zkoumáno též korozní chování povlaků ZrB a ZrBN a možnost jejich využití v protikorozní ochraně⁴⁰. Povlak ZrB je v porovnání s CrN a TiN méně kompaktní a hutný a jeho struktura se vyznačuje vysokou hustotou heterogenit (tj. vměstků, důlků, pórů). Důsledkem je malá korozní odolnost tohoto povlaku. Struktura povlaku ZrBN vykazovala nižší hustotu heterogenit, a tedy lepší korozní odolnost než ZrB, problematické oblasti představovaly pouze hranice makročásteček a důlků. Pro povlaky na bázi zirkonia platí stejné pravidlo jako u TiN a CrN – jsou elektrochemicky ušlechtlejší než běžné oceli a poškozování povlaku většinou vede k intenzivní korozí substrátu a následně až k delaminaci povlaku⁴².

3.4. Povlaky na bázi uhlíku

V poslední době vzrostla obliba vrstev PVD na bázi uhlíku^{43–49} označovaných často jako vrstvy DLC (diamond like carbon). Tyto povlaky jsou vyhledávány pro svoje zvláštní vlastnosti: vysokou tvrdost, dobrou tepelnou vodivost, vynikající tribologické vlastnosti, chemickou inertnost a biokompatibilitu. V závislosti na podmínkách povlakování mohou mít grafitovou, diamantovou nebo polymerní strukturu. Vrstvy s polymerní strukturou obsahují často značné množství vodíku a jsou označovány jako tzv. vrstvy C:H. Přípravují se pomocí plazmové depozice (PECVD) při nízkých teplotách (již 100 °C). Zároveň bohužel vykazují vysoké pnutí a horší adhezi k některým materiálům. Poslední dobou se zkoumá možnost nanášení vrstev DLC s příměsí, např. křemíkem, který podstatně zlepšuje adhezi a tepelnou odolnost, nebo fluorem, zlepšujícím smáčivost. Vynikající vlastnosti jsou uváděny u vr-

stev DLC dopovaných karbidem wolframu, které se vyznačují výbornou adhezí k oceli, vysokou pružností a vynikajícími tribologickými vlastnostmi⁵⁰.

3.5. Povlaky na bázi hliníku

Hliník se často užívá jako součást lázni pro žárové zinkování oceli (tj. zinkování ponorem do roztavené směsi zinku a hliníku). Žárové povlaky zinek–hliník poskytují dobrou galvanickou ochranu a jejich úbytky jsou výrazně nižší než úbytky povlaků čistého zinku. Rovněž vrstvy PVD hliníku mají výhodné elektrochemické vlastnosti. Za většiny podmínek poskytují substrátu z běžné uhlíkové oceli galvanickou ochranu, neboť působí v podstatě jako obětovaná anoda. Výhodné elektrochemické chování a relativně dobrá protikorozní odolnost vede k tomu, že povlaky PVD na bázi hliníku jsou považovány za potenciální náhradu kadmiování^{51,52}. Při nanášení hliníku procesem PVD vzniká amorfní a dobře přilnavý povlak. Jeho protikorozní ochranné vlastnosti závisí, podobně jako u titanu, na vytvoření pasivního oxidového filmu na povrchu. Tento oxidický film se skládá ze dvou vrstev: vnitřní tenké vrstvy, která je v přímém kontaktu s kovem (bariérový film) a vnější porézní vrstvy s hexagonální strukturou zrn. Anodické chování vrstev PVD hliníku vůči substrátu z uhlíkových a nízkolegovaných ocelí potvrdily dlouhodobé expoziční testy v prostředí roztoku NaCl. Vlivem tvorby galvanického článku mezi ocelí a hliníkem dochází k rozpouštění hliníkové vrstvy. Rozpouštění se projevuje tvorbou, růstem a rozšiřováním pórů^{21,53–55}.

Podstatného zlepšení korozních vlastností lze dosáhnout nanášením multivrstev Ti/Al. Titan jako mezivrstva se zdá být velmi dobrým řešením, neboť galvanické články ocel–titan a titan–hliník jsou mnohem měkčí než článek ocel–hliník. Současně se titan ukazuje jako nevhodná poslední vrstva, neboť jeho značná poréznost vede k intenzivní korozí podložní hliníkové vrstvy⁵⁶.

Velmi rozsáhlé výzkumné aktivity jsou zaměřeny na zlepšení vlastností hliníkových vrstev PVD přidávkou dalších složek. Patří sem např. iontově napařované povlaky s přidávkou hořčíku, vyznačující se vysokou rychlostí nanášení a velmi dobrou přilnavostí k ocelovému substrátu^{57,58}. Dobré korozní vlastnosti z hlediska bodové koroze vykazoval již při velmi nízké tloušťce směsný povlak hliníku s 10 % hořčíku. Další variantou představuje hliníkový povlak s příměsí molybdenu⁵¹. Kombinací několika vrstev s různým obsahem molybdenu lze vytvořit povrchovou ochranu, která je z hlediska korozních, mechanických i tribologických vlastností schopna zastoupit kadmium.

Jinou možností, jak zlepšit korozní a mechanickou odolnost hliníkového povlaku, představuje příměs chromu nebo titanu. Korozní chování substrátu s Al–Cr povlaky výrazně závisí na obsahu chromu. Při obsahu Cr 18 % poskytuje oceli katodickou ochranu zajištěnou rozpouštěním hliníku. Zvyšující se obsah chromu zvyšuje vlastní korozní odolnost povlaku PVD. Současně se jeho korozní potenciál posouvá do kladnějších hodnot a snižuje se účinnost katodické ochrany^{52,59}.

Kromě povlaků kovového hliníku je vzhledem ke svým zajímavým vlastnostem častým objektem korozního výzkumu i nitrid hliníku. Vrstvy této sloučeniny jsou elektrickým izolátorem, jsou chemicky inertní a do určité tloušťky (desetiny μm) jsou průhledné. Měření impedančních spekter ukázala, že použití podkladové vrstvy (chemicky nebo galvanicky nanášený nikl a PVD nanášený titan) pod povlak PVD nitridu hliníku značně zlepšuje korozní odolnost systému⁶⁰. U této kombinace vrstev byl z hlediska ochrany proti korozi pozorován synergický efekt, neboť nízkofrekvenční hodnoty impedance multivrstev AlN/Ni nebo AlN/Ti měřené v 0,5 M NaCl jsou výrazně vyšší než prostý součet hodnot naměřených na jednotlivých vrstvách.

Z nitridů obsahujících hliník je v literatuře nejvíce informací o (Ti,Al)N. Elektrochemické údaje získané pro (Ti,Al)N jsou velmi podobné hodnotám TiN povlaků. Z impedančních spekter je zřejmé, že povlaky nejsou příliš kompaktní a obsahují defekty, které představují základ pro lokální korozní napadení⁶².

Z korozního hlediska zajímavé vlastnosti vykazují povlaky s proměnlivým chemickým složením v závislosti na vzdálenosti od substrátu (tzv. „gradientní vrstvy“). Lze je připravit celkem jednoduše, prostou změnou koncentrace reaktivního plynu (dusíku v případě nitridů) během procesu nanášení. Jako u ostatních vrstev PVD ovlivňuje vlastnosti jednovrstvého i gradientního povlaku (Ti,Al)N napětí použité při nanášení. S jeho růstem klesá počet mikročástic na povrchu a snižuje se tvrdost díky poklesu obsahu hliníku. Vlastnosti ovlivňuje také tlak dusíku v povlakovacím zařízení^{63,64}. Rovněž porovnání vlastností povlaků (Ti,Al)N a (Cr,Al)N potvrdilo, že jejich strukturu významně ovlivňuje tlak dusíku při nanášení. Obecně platí, že povlaky (Ti,Al)N mají strukturu s jemnějším zrnem⁶⁵.

3.6. Další typy povlaků

Z praktického hlediska jsou velmi zajímavé povlaky karbidů wolframu, vyznačující se značnou tvrdostí, otěruvzdorností, pevností, výbornými tribologickými vlastnostmi, ale i určitou plasticitou. Korozní odolnost vrstev karbidu wolframu byla rovněž zjišťována elektrochemickými metodami⁶⁶. Míra poréznosti byla stanovena z výsledků měření EIS. I v případě povlaků karbidu wolframu koroze substrátu silně závisí na poréznosti povlaku. Elektrolyt proniká póry až na ocelový substrát a za přítomnosti chloridů dochází k lokálnímu koroznímu napadení.

Řada studií^{67–69} byla prováděna na multivrstvách WC-(Ti_{1-x}Al_x)N a WC-(Cr_{1-x}Al_x)N. Tyto vrstvy se vyznačují tzv. „supermřížkovou“ (superlattice) strukturou – periodicky se opakující mikrovrstvy o tloušťce 5–25 nm jsou součástí společně jednotné supermřížky. Výhodou této struktury je vyšší tvrdost i pevnost v porovnání s jednoduchými vrstvami o stejném složení. Uvedené supermřížkové povlaky se vyznačují rovněž relativně nízkou porézností a dobrou korozní odolností. Z korozního hlediska je ovšem

nevýhodné, že tyto povlaky jsou – vzhledem k nízkému obsahu hliníku – elektrochemicky ušlechtilější než substrát z uhlíkové oceli.

Pokusy prováděné s vrstvami hořčiku⁷⁰, nanesenými magnetronovým naprašováním, prokázaly, že tlak pracovního plynu (argonu) a napětí významně ovlivňují morfologii a strukturu vrstev. Analýza vrstev provedená rentgenovou diffrakcí potvrdila vznik jemnějších struktur s převládající orientací krystalů ve směru [002] při vyšších tlacích a nízkých napětích. Tento typ vrstev má podstatně lepší korozní vlastnosti než hořčikový ingot, použitý ke srovnání.

Značnou chemickou odolností se vyznačují některé PVD povlaky obsahující kyslík. Byly např. testovány povlaky oxidů hliníku, chromu a křemíku a sloučenin TiNO a TiCNO nanesené na korozivzdorné oceli. Bylo zjištěno, že značně zvyšují odolnost substrátu proti důlkové korozi a současně snižují koeficient přestupu tepla⁷¹.

Elektrochemickými testy bylo zjištěno, že vrstvy TiC/Ni-Ti a WC-12Co, nanesené na oceli, jsou odolné proti korozi v mořské vodě⁷².

Pro speciální aplikace jsou často vyvíjeny povlaky, skládající se z vrstev, nanesených odlišnými metodami, např. PVD vrstvy chromu a titanu nanesené na substrátech C/C-SiC, nanesených chemickou depozicí⁷³. Díky nízké hustotě a vysoké pevnosti je uhlík velice atraktivním konstrukčním materiálem. Uhlíkové kompozity se používají např. jako tepelná clona pro kosmické lodě, výměníky tepla, turbinové motory atd. Použití uhlíkových vrstev je omezeno malou odolností uhlíku vůči oxidaci. Jednou z možností, jak zlepšit stálost uhlíku v oxidačním prostředí, je nanesení vrstvy CVD s obsahem karbidu křemíku. Ten je chemicky velmi stabilní, má však bohužel jinou tepelnou roztažnost než substrát. To může při tepelných změnách vést k tvorbě prasklin. V uvedené studii bylo testováno řešení, spočívající v překrytí vrstvy karbidu křemíku tenkou vrstvou PVD chromu nebo titanu.

4. Závěr

Vzhledem ke značné různorodosti povlaků, které lze nanášet PVD procesy a velké variabilitě podmínek při nanášení, je v současné době možno vytvořit vrstvy PVD vyznačující se širokým spektrem vlastností – od povlaků velmi tvrdých a pevných s výbornými tribologickými vlastnostmi, dobrou elektrickou vodivostí a značnou korozní odolností až po povlaky měkké, případně elektrochemicky méně ušlechtilé.

Významný je přínos technologií PVD z ekologického hlediska, procesy PVD jsou totiž v podstatě bezodpadové. Použití vrstev PVD jako plnohodnotné náhrady klasických protikorozních povlaků (zinek, kadmium atd.) je dosud do určité míry limitováno jednak ekonomickými faktory, ale zejména některými negativními vlastnostmi povlaků PVD. Nejběžnější povlaky na bázi karbidů a nitridů titanu a chromu se vyznačují např. porézností a vyšší elektrochemickou ušlechtilostí vůči běžné konstrukční oceli. Tato

kombinace vlastností vede při dlouhodobé expozici v korozivním prostředí k rozvoji korozí ocelového substrátu v pórech. V současné době se zdá, že pro účely protikorozní ochrany budou perspektivnější povlaky na bázi hliníku. Jsou většinou elektrochemicky méně ušlechtilé než běžné oceli a jsou tedy schopny poskytnout ocelovému substrátu určitý stupeň galvanické ochrany. Za perspektivní se považují např. povlaky hliníku s příměsí molybdenu, nebo vícevrstvé povlaky titan–hliník. O těchto povlacích se uvažuje jako o potenciální budoucí náhradě klasických kadmiových protikorozních povlaků.

Seznam zkratk

PVD	fyzikální nanášení z plynné fáze (Physical Vapour Deposition)
CVD	chemické nanášení z plynné fáze (Chemical Vapour Deposition)
TCVD	tepelné CVD (Thermal CVD)
PACVD	plazmatem aktivované CVD (Plasma Activated CVD)
PECVD	plazmatem aktivované CVD (Plasma Enhanced CVD)
IAD	iontově podporované nanášení (Ion Assisted Deposition)
IBAD	nanášení podporované iontovým svazkem (Ion Beam Assisted Deposition)
ABS	nanášení kombinující obloukovou a magnetronovou technologii (Arc Bond Sputtering)
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie (Electrochemical Impedance Spectroscopy)
XRD	rentgenová difrakce (X-Ray Diffraction)
DLC	uhlík podobný diamantu (Diamond Like Carbon)

Tento text vznikl v rámci projektů MŠMT 6046137304 a MPO FD-K3/011.

LITERATURA

- Grove W. R.: Phil. Trans. Royal. Soc. 142, 87 (1852).
- Faraday M.: Phil. Trans. Royal. Soc. 147, 145 (1857).
- Wright A. W.: Am. J. Sci. Arts 13, 49 (1877).
- Edison T. A.: *Art of Plating One Material on Another*, U.S. Patent n. 526147 (1894).
- Edison T. A.: *Process of Duplicating Phonograms*, U.S. Patent n. 484582 (1892).
- Mattox D. M.: *The Foundations of Vacuum Coating Technology*, Noyes Publications, William Andrew Publishing, Norwich (2003).
- Penning F. M.: Physica (Utrecht) 3, 873 (1936).
- Bradley D. E.: Brit. J. Appl. Phys. 5, 65 (1954).
- Sawyer W. E., Man A.: U.S. Patent n. 229335 (1880).
- Mattox D. M.: Electrochem. Technol. 2, 295 (1964).
- Military Specification MIL-C-8837-ASG, 3 *Vacuum Cadmium Plating* (1958).
- Valter J., Vyskočil J.: Strojárstvo 9, 82 (2000).
- Bohnet M. (ed.): *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7.th edition, J. Willey, Weinheim 2005.
- Window B.: Surf. Coat. Technol. 71, 93 (1995).
- Liu C., Leyland A., Bi Q., Matthews A.: Surf. Coat. Technol. 141, 164 (2001).
- Mäntylä A., Kettunen T.: J. Vac. Sci. Technol. A4(6), 2911 (1986).
- De Levie R.: Electrochim. Acta 8, 751 (1963).
- De Levie R.: Electrochim. Acta 9, 1231 (1964).
- Lee M. K., Whung W., Rhee Ch. K., Lee W. J.: Metall. Mater. Trans. A30(4), 961 (1999).
- Böhmová V., Jiříček I., Olyšar K.: *Corrosion Resistance of PVD Coatings on Stainless Steel Substrate*, Workshop „6th Sheffield ABS Days“, Sheffield, UK, (2000).
- Creus J., Idrissi H., Mazille H., Charier C., Jacquot P.: *1st Online Corr. Conf. „Intercorr96“*, Houston, USA (1996).
- Avers J. D., Schaefer R. J., Bojar F. D., McCafferty E.: Corrosion 37, 55 (1981).
- Liu C., Leyland A., Lyon S., Matthews A.: Surf. Coat. Technol. 76–77, 623 (1995).
- Liu C., Bi Q., Leyland A., Matthews A.: Corros. Sci. 45, 1243 (2003).
- Liu C., Bi Q., Leyland A., Matthews A.: Corros. Sci. 45, 1257 (2003).
- Liu C., Leyland A., Lyon S., Matthews A.: Surf. Coat. Technol. 76–77, 623 (1995).
- Senna L. F., Achete C. A., Hirsch T., Freire Jr. F. L.: Surf. Coat. Technol. 94–95, 390 (1997).
- Rudnja S., Leygraf C., Pan J., Kulu P., Talimets E., Mikli V.: Surf. Coat. Technol. 114, 129 (1999).
- Zhou Q. G., Bai X. D., Xue X. Y., Chen X. W., Xu J., Wang D. R.: Surf. Coat. Technol. 191, 212 (2005).
- Penttinen I. M., Korhonen A. S., Harju E., Turkia M. A., Forsén O., Ristolainen E. O.: Surf. Coat. Technol. 50, 161 (1992).
- Jenh H. J., Thiergaren F., Ebersbalm E., Fabian D.: Surf. Coat. Technol. 50, 45 (1991).
- Liu C., Bi Q., Matthews A.: Corros. Sci. 43, 1953 (2001).
- Robyr C., Agarwal P., Mettraux P., Landolt D.: Thin Solid Films 310, 87 (1997).
- Tomlinson M., Lyon S. B., Hovsepian P., Munz W.-D.: Vacuum 53, 117 (1999).
- Ahn S. H., Choi Y. S., Kim J. G., Han J. G.: Surf. Coat. Technol. 150, 319 (2002).
- Merl D. K., Panjan P., Čekada M., Maček M.: Electrochim. Acta 49, 1527 (2004).
- Polaská M., Hamelmann T., Moehring A., Lohrengel M. M.: Electrochim. Acta 47, 2127 (2002).
- Chou W. J., Yu G. P., Juany J. H.: Surf. Coat. Technol. 167, 59 (2003).
- Milošev I., Strehblow H. H., Navinšek B.: Thin Solid Films 303, 246 (1997).
- Ürgen M., Çakir A. F., Eryilmaz O. L., Mitterer C.: Surf. Coat. Technol. 71, 60 (1995).
- Schulz U., Schmücker M.: Mat. Sci. Eng. A276, 1

- (2000).
42. Hass D. D., Slifka A. J., Wadley H. N. G.: *Acta Mater.* 49, 973 (2001).
 43. Grill A.: *Diamond Relat. Mater.* 8, 428 (1999).
 44. Vercammen K., Haefke H., Gerbig Y., Van Hulsel A., Pflüger E., Meneve J.: *Surf. Coat. Technol.* 133, 466 (2000).
 45. Zajíčková L., K. Veltruská, Tsud N., Franta D.: *Vacuum* 61, 269 (2001).
 46. Voevodin A. A., Schneider J. M., Caperaa C., Stevenson P., Matthews A.: *Ceram. International* 22, 1 (1996).
 47. Zeng A., Liu E., Zhang S., Tan S. N., Hing P., Annergren I. F., Gao J.: *Thin Solid Films* 426, 258 (2003).
 48. Zeng A., Liu E., Annergren I. F., Tan S. N., Zhang S., Hing P., Gao J.: *Diamond Relat. Mater.* 11, 160 (2002).
 49. Liu Z. H., Lemoine P., Zhao J. F., Zhou D. M., Mailley S., McAdams E. T., Jaguáre P., McLaughlin J.: *Diamond Relat. Mater.* 7, 1059 (1998).
 50. Gahlin R., Larsson M., Hedenqvist P.: *Wear* 249, 302 (2001).
 51. Bielawski M.: *Surf. Coat. Technol.* 179, 10 (2004).
 52. Steyer P., de Araujo P., Millet J.-P., Damond E., Stauder B., Jacquot P., Veysiere G.: *Proc. of Eurocorr 2003, European Corrosion Federation, 28.9.–2.11.2003, Budapest, Budapest* 2003.
 53. Creus J., Idrissi H., Mazille H., Sanchette F., Jacquot P.: *Thin Solid Films* 346, 150 (1999).
 54. Vacandio F., Massiani Y., Gravier P., Rossi S., Bonora P. L., Fedrizzi L.: *Electrochim. Acta* 46, 3827 (2001).
 55. Vacandio F., Massiani Y., Eyraud M., Rossi S., Fedrizzi L.: *Surf. Coat. Technol.* 137, 284 (2001).
 56. Charrier C., Jacquot P., Denisse E., Millet J. P., Mazille H.: *Surf. Coat. Technol.* 90, 29 (1997).
 57. Navinšek B., Panjan P., Milošev I.: *Surf. Coat. Technol.* 116–119, 476 (1999).
 58. Shedden B.A., Samandi M., Windows B.: *Surf. Coat. Technol.* 97, 557 (1997).
 59. Creus J., Billard A., Sanchette F.: *Thin Solid Films* 466, 1 (2004).
 60. Vacandio F., Massiani Y., Gravier P., Rossi S., Bonora P. L., Fedrizzi L.: *Electrochim. Acta* 46, 3827 (2001).
 61. Vacandio F., Massiani Y., Eyraud M., Rossi S., Fedrizzi L.: *Surf. Coat. Technol.* 137, 284 (2001).
 62. Souto R. M., Alanyali H.: *Corros. Sci.* 42, 2201 (2000).
 63. PalDey S., Deevi S. C.: *Mater. Sci. Eng., A* 361, 1 (2003).
 64. Bujak J., Walkowicz J., Kungsiński J.: *Surf. Coat. Technol.* 180, 150 (2004).
 65. Wuhler R., Yeung W. Y.: *Skripta Materialia* 50, 1461 (2004).
 66. Collazo A., Nóvoa X. R., Perez C.: *Electrochim. Acta* 44, 4289 (1999).
 67. Ahn S. H., Yoo J. H., Choi Y. S., Kim J. G., Han J. G.: *Surf. Coat. Technol.* 162, 212 (2003).
 68. Ahn S. H., Yoo J. H., Kim J. G., Han J. G.: *Surf. Coat. Technol.* 163–164, 611 (2003).
 69. Lee J. H., Ahn S. H., Kim J. G.: *Surf. Coat. Technol.* 190, 417 (2005).
 70. Lee M. H., Bae I. Y., Kim K. J., Moon K. M., Oki T.: *Surf. Coat. Technol.* 169–170, 670 (2003).
 71. Arezzo F.: *Eur. Comm. Monograph*, 669.14/ EUR/116658, 83 (1997).
 72. Guilemany J. M., Fernández J., Paco de J. M., Sanchez J.: *Surf. Engineering* 14, 133 (1998).
 73. Roos E., Maile K., Lyntovich A., Lauf S., Kockelmann H., Gusko A.: *Mater. Sci. Eng., A* 271, 503 (1999).
 74. Pazderová M., Macák J., Malý P., Jiříček I., Machníková E., Novotný V., Vošta J.: *Konference AKI, Znojmo, 19–21. října 2004, Sborník přednášek (CD) (Joska L., ed.)*.
- J. Macák^a, M. Pazderová^b, I. Jiříček^a, P. Malý^b, K. Olyšar^c, L. Cvrček^c, and J. Vošta^a** (^a*Institute of Chemical Technology, Prague*, ^b*Research and Test Institute for Aeronautics, Prague*, ^c*HVM Plasma Ltd, Prague*): **Corrosion Properties of Physically Deposited Thin Coatings (PVD coatings)**
- Sputtering, the first invented physical vapour deposition (PVD) coating technology has been known for more than 150 years. Although the PVD and related technologies have been commercialized for over 70 years, their expansion in the last 20 years has become enormous – from decorative and cutting tool to special optical applications and microelectronics. This is due to their excellent properties such as chemical inertness, hardness, tribological, tribochemical and optical properties. In many applications the PVD coatings are exposed to corrosive environments. Moreover, PVD coatings of environment-friendly nature are often considered to be potential successors of cadmium-based anticorrosion coatings. This fact promotes numerous studies of corrosion properties of thin coatings. Hard coatings (including nitrides, carbides and oxides) are usually more corrosion-resistant than the base material. Some of them (e.g. titanium nitride, the most common PVD coating) have columnar microstructure which brings about the possibility of high micropore density. In local defects and/or pores, local corrosion can be promoted by galvanic effects. As a result, this type of hard coatings is useless for anticorrosion purposes. As perspective anticorrosion coatings, PVD-deposited aluminium-based coatings are frequent subjects of studies. Similarly to cadmium coatings, they usually provide sacrificial properties, which can be enhanced by alloying with magnesium. Tribological properties and corrosion resistance can be enhanced by alloying with molybdenum. Given the excellent flexibility, adaptability of PVD technology and its ability to deposit multilayers or graded coatings, new coatings with functional properties comparable with traditional anticorrosion coating systems could be developed.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

FOTOKATALYTICKY AKTIVNÍ MEMBRÁNOVÁ SEPARACE – VÝVOJ PROCESU A LABORATORNÍ TECHNIKY

JAROSLAV PŘIDAL, JIŘÍ PŘIDAL a ANTONÍN
URBAN

*Mikropur, s.r.o., Wonkova 385, 500 02 Hradec Králové 2
jara.pridal@mikropur.cz*

Došlo 13.10.05, přepracováno 15.4.06, přijato 27.6.06.

Klíčová slova: membránové procesy, membránové
fotoreaktory, fotokatalýza

Úvod

Pokroky nanotechnologie ve výzkumu katalytických vlastností polovodičů dnes již umožňují využití poznatků pro zcela nové průmyslové technologie, šetrné k životnímu prostředí, které zlepšují kvalitu života bez nároků na další zhoršování ekologické rovnováhy Země.

Fotokatalýza může být velmi účinným postupem pro čištění a dezinfekci proudů vody nebo vzduchu. Základem procesu je chemická reakce, při níž jsou organické nečistoty přítomné v tekutině rozkládány působením styku organické molekuly s fotokatalyzátorem. Podmínkou reakce je intenzivní expozice světlu o vlnové délce, na kterou je fotokatalyzátor citlivý. Použití fotokatalýzy má tyto hlavní přednosti:

- organická látka může být zcela rozložena na oxid uhličitý, vodu a anorganické produkty,
- nevznikají další odpady, které je nutno likvidovat,
- postup je použitelný i pro toxické a biotoxické látky.

Spojení fotokatalýzy s membránovou filtrací může být procesem pro zpracování odpadních proudů v průmyslu a zemědělství. Je možné očekávat, že tato kombinace odstraní dosavadní nedostatky membránových postupů, ale i nedostatky oxidačního procesu.

Vlivy procesu fotokatalýzy
na účinnost membránové separace
a oxidačního procesu

Rozklad molekul kontaminantu v blízkosti membrány může mít za následek zvýšení kvality permeátu, snížení rychlosti zanášení membrán a zmenšení objemu retentátu,

jehož likvidace je často nákladná a obtížná. Na straně druhé, oddělování nízkomolekulárních podílů membránovou separací může zvýšit rychlost fotokatalytické oxidace, protože při oddělení nízkomolekulárních meziproductů rozkladu lze světelnou energii využít především na rozklad původní znečišťující látky. Membránovou filtrací jsou odstraněny anorganické ionty vzniklé rozkladem, které inhibují proces fotodestrukce. Jsou odváděny permeátem z procesu. Při výrobě nových látek parciální oxidací může membrána zprostředkovat optimální manipulaci s produkty, např. oddělení produktu ve správné fázi procesu.

Oblasti použití kombinace fotokatalýzy a membránové filtrace

Předpokládanou oblastí využití je zejména odstraňování nízkých koncentrací vysoce toxických polutantů, látek které nejsou biodegradabilní, či získávání tekutin o vysoké čistotě. Příkladem jsou tyto procesy zpracování odpadních proudů:

- dekontaminace odpadních vod, barevné vody, vysoce toxické vody, biologicky kontaminované vody,
 - dekontaminace vzduchu z výrobních zdrojů a pracovních prostor,
 - odstraňování herbicidů z vod v zemědělství.
- Jiným příkladem je technologické využití těchto procesů:
- vybrané oxidační procesy,
 - příprava velmi čisté vody pro zdravotnictví a mikroelektroniku.

Návrh procesu vyžaduje interdisciplinární přístup. V tomto článku je podán stručný přehled tematiky a je uveden příklad laboratorní aplikace procesu.

Dosavadní poznatky

Princip fotokatalýzy

Světlo, dopadající na polovodičový katalyzátor, způsobí přesun elektronu z energeticky nižší (valenční) hladiny na vyšší (vodivostní) hladinu, tím jsou vytvářena elektricky nabitá centra :



kde e^- je pohyblivý elektron, h^+ je kladně nabitě centrum (elektronová mezera, angl. „hole“, díra).

Podáři-li se tato centra odděleně využít, uvolňuje se elektrická energie nebo probíhá chemická reakce. Elektron působí redukci, na straně kladného centra dojde k oxidaci. Hlavní a nejpravděpodobnější reakcí je však opětné sloučení obou center a degradace světelné energie na teplo. O úspěšném výsledku fotokatalýzy rozhoduje kinetika

vyvolaných chemických reakcí. Kladná centra jsou sama o sobě silná oxidační činidla. Je-li přítomna voda, vznikají radikály $\text{OH}\cdot$, které jsou (po elementárním fluoru) nejsilnějšími známými oxidačními činidly:



Organické látky jsou na povrchu katalyzátoru nebo v jeho blízkosti oxidovány na oxid uhličitý, vodu a anorganické oxidační produkty. Elektron z fotoexcitace působí redukčně. Může být využit pro redukci kovových iontů na elementární kovy, které tak mohou být získávány nebo jako polutanty odstraňovány. V přírodě jsou v řetězci fotosyntézy elektrony účinně využívány pro redukci oxidu uhličitého a výstavbu organických látek.

Typy fotokatalyzátorů

Fotokatalyzátory se hledají mezi látkami s obsazenou valenční sférou a volnou vodivostní sférou pro vstup elektronů. Mají vlastnosti polovodičů a patří k nim oxidy, případně sulfidy nebo nitridy přechodných kovů, např. TiO_2 , SnO_2 , ZnO , WO_3 , CdO , Fe_2O_3 , ZnS , MoS_2 , CdS , CdSe , TaON , Ta_3N_5 a nově i některé organické polymery. Technicky velmi vhodným katalyzátorem je oxid titaničitý. Je chemicky stálý, levný a netoxický. Excitace TiO_2 však vyžaduje zdroj UV záření s maximem intenzity pod $\lambda = 388 \text{ nm}$, takže zatím pro jeho excitaci nelze účinně využít sluneční energie.

Spojení fotokatalýzy s membránovou separací

Při výzkumu byla zpracována literární rešerše týkající se uvedeného tématu⁶. Z přehledu literatury plyne, že pokusy zaměřené na součinnost obou procesů byly prováděny zatím jen v omezené míře. Podle našich znalostí není dosud prověřen souběh membránové separace a fotokatalýzy. Byly vyvinuty a použity fotokatalytické membrány pro vyčištění čisté vody na superčistou vodu pro mikroelektroniku o čistotě pod 1 ppb, avšak membrány byly mikrofiltrační s velikostí pórů 2,5 až 4 μm a sloužily jen jako nosič imobilizovaného katalyzátoru. Dále byla použita membránová mikrofiltrační jednotka pro separaci dispergovaného katalyzátoru², kterou byl během degradace kontaminantů separován prášek katalyzátoru ze suspenze. V dalších pracích^{3,4} již byly používány membrány odpovídající velikosti separovaných kontaminantů, spíše než separační účinek membrán byl však zjištěn a vyhodnocen jejich účinek adsorpční. Při separaci trichlorethylenu z vody byl při osvětlení membrány, opatřené fotokatalyzátorem, vyhodnocen kladný vliv fotokatalýzy na snížení koncentrace trichlorethylenu v permeátu⁵. Membrána s dělicím řezem (cut-off) 500 však sama nemohla zadržovat trichlorethylen.

Umístění katalyzátoru v reaktoru, chemicko-inženýrské řešení

Z hlediska umístění fotokatalyzátoru v reaktoru jsou známy dva základní typy reaktoru, reaktor se suspendovaným katalyzátorem a reaktor s imobilizovaným katalyzátorem. Každý má své výhody a nevýhody. Za výhodu katalyzátoru v suspenzi se považuje vyšší intenzita přestupu hmoty, a tím i vyšší měrná účinnost na gram fotokatalyzátoru. Nevýhodou tohoto uspořádání je nutnost účinné separace katalyzátoru na konci procesního řetězce, protože velikost částic katalyzátoru je 10–30 nm. Tento problém odpadá při použití imobilizovaného katalyzátoru. Použití imobilizovaného katalyzátoru se jeví jako princip vhodný pro vývoj multifunkční membrány, která by vedle separační funkce měla i funkci destruktivní. Na tento problém je zaměřena tato práce. Je věnována využití imobilizovaného katalyzátoru.

Konstrukční princip fotokatalytického reaktoru se suspendovaným katalyzátorem

Reakční částí reaktoru je osvětlený vnitřní prostor, obsahující zpracovávanou kapalinu, ve které je suspendován fotokatalyzátor. Reaktor má v případě solárního osvětlení podobu průtočných panelů osazených průhlednými trubkami. Katalyzátor je po reakci oddělován v separačním stupni (membrány, odstředivka apod.).

Konstrukční princip fotokatalytického reaktoru s imobilizovaným katalyzátorem

K reakci je využíván různě upravený vnitřní prostor reaktoru, na němž je nanesen fotokatalyzátor. Jsou popsány reaktory s optickými vlákny^{9–12}, s velmi tenkými trubkovými světlovody¹³, trubkové reaktory¹⁴, reaktory s potaženými stěnami¹⁵, s voštinovými konstrukcemi tvaru včelího plástu¹⁶, membránové reaktory^{1,17,18}.

Experimentální část

Cíl experimentálního výzkumu

Cílem popsané etapy výzkumu je vývoj zařízení pro experimentální sledování spojení membránové separace a fotokatalýzy. K tomuto cíli bylo nutno vyvinout fotokatalyticky aktivní vrstvu vhodnou pro aplikaci na membránu, připravit fotokatalyticky aktivní separační membrány a vyvinout vhodné membránové fotoreaktory, ve kterých je možné membrány testovat.

Suroviny

Pro přípravu fotokatalyticky aktivních vrstev byl použit roztok isopropoxidu titanu (dodavatel Aldrich) v isopropylalkoholu. Fotokatalytická účinnost byla sledována rozkladem organických barviv a potravinářského barviva.

Membrány

Nanofiltrační membrány: PVD1 – (polyesterový nosič, polysulfonová vrstva, aktivní povrchová vrstva derivát polyvinylalkoholu), dělicí řez neudán, Hydranautics, USA.

NF ETNA 01PP – kompozitní fluoropolymer, PVDF s hydrofilní úpravou, dělicí řez (MWCO) 1 kD, odolnosti: pH 1–11, 1–10 bar, 60 °C, Alfa Laval, Dánsko.

Mikrofiltrační membrány: MF FSMO 45PP – fluoropolymer, PVDF, dělicí řez 0,45 μm, odolnosti: pH 1–11, 1–10 bar, 60 °C, Alfa Laval, Dánsko.

Zdroje světla

UV světlo: A – středotlaká rtuťovou výbojka RVK 250 W – maximum vyzařování při $\lambda = 350\text{--}370$ nm, Teslamp Praha, B – jednopaticová zářivka Sylvania LYNX SCF-S 9W BL 350, maximum vyzařování při $\lambda = 350$ nm, C – jednopaticová zářivka Philips TUV PL-S 9W, maximum vyzařování při $\lambda = 254$ nm.

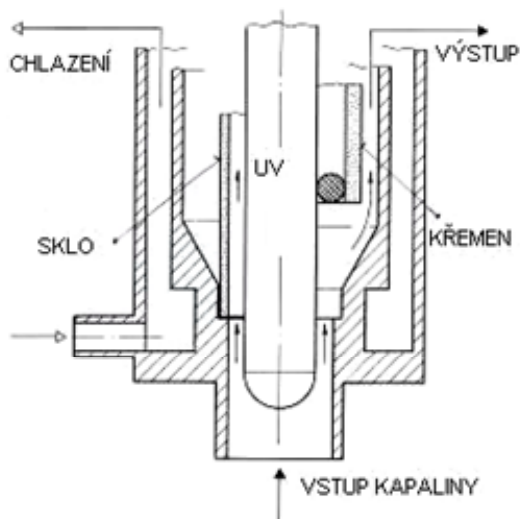
Imitace denního světla: D – metalhalogenidová výbojka pro denní světlo 150 W, typ MH-DE 150 W/UVS/FS/6K, teplota záření 6500 K, výrobcem deklarovaný filtr odstíňující UV-záření bez bližší specifikace, Venture Light

ting International, Inc., USA. E – metalhalogenidová výbojka 70 W pro denní světlo, typ MH-DE 70 W/UVS/4K, světelná teplota 4200 K, výrobcem deklarovaný filtr odstíňující UV-záření bez bližší specifikace, Venture Lighting International, Inc., USA.

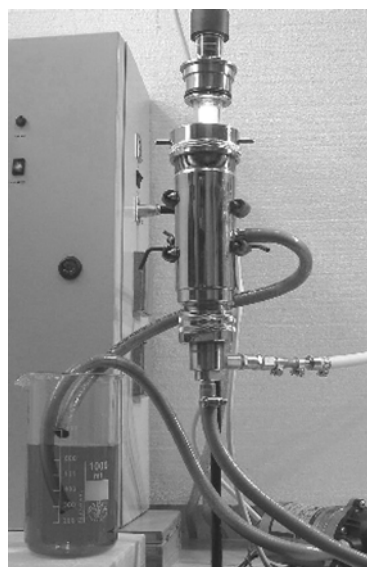
Laboratorní fotokatalytické reaktory

Anulární fotoreaktor APF II

Byl použit kontinuální reaktor, jehož podrobný popis zařízení byl již zveřejněn dříve⁷. V komoře reaktoru je umístěn váleček ze skla nebo z křemene, opatřený citlivou fotokatalytickou vrstvou. Váleček je navlečen na ochrannou trubici lampy. Do této trubice je možno uložit různé lampy, jejichž průměr je menší než 25 mm. Při experimentech byly používány tyto lampy typu A, D, E. Jak je vidět z levé části obr. 1, ochrannou trubici lampy a skleněným válečkem je vymezena koaxiální štěrbina o šířce 1,6 mm. Štěrbina o stejné šířce je vymezena v případě použití křemenného válečku mezi tímto válečkem a vnitřní stěnou reaktoru (obr. 2 – pravá strana). Tak je zajištěno, že toto uspořádání umožňuje studovat při téměř stejných hydrodynamických podmínkách jak proces fotokatalýzy při osvětlování fotokatalytické vrstvy ze strany zpracovávané kapaliny (na skleněném válečku potaženém zevnitř), tak při osvětlování vrstvy ze strany podložky (na křemenném válečku potaženém z vnější strany). Vedle uvedené flexibility má anulární reaktor (obr. 2) některé další přednosti, např. zpracovávaná kapalina zprostředkovává většinu potřebného chlazení lampy a není proto nutno lampu opatřovat dvojitým chladicím pláštěm, který by ubíral světlu na intenzitě, nebo protože jde o kontinuální proces, je možné ho snadno kombinovat např. se sériově zapojenou membránovou separační jednotkou.



Obr. 1. Fotoreaktor APF II, řez



Obr. 2. Fotoreaktor APF II, pohled

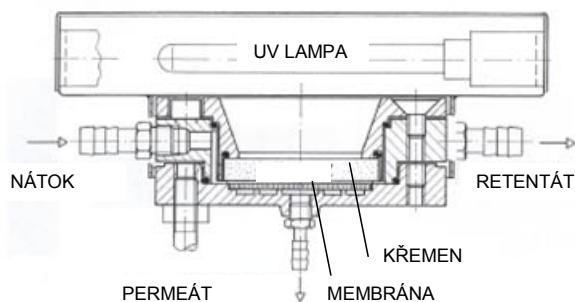
Fotokatalytická dynamická cela FDC-85

Cela byla podrobně popsána jinde⁸. Reakční komora cely, která se nalézá nad membránou o průměru 85 mm, je pouze 0,8 mm vysoká a byla původně osvětlována dvěma nízkotlakými UV zářivkami (zdroje B, C) externě umístěnými v horní osvětlovací části jednotky (obr. 3, 4). Jednotka byla dále doplněna výměnným osvětlovacím blokem s vlastním vzduchovým chlazením, umožňujícím používat jak středotlaké UV lampy 250 W (zdroj A), tak metalhalogenidové výbojky D, E.

Postupy přípravy a testování fotokatalytických systémů

Příprava imobilizované fotokatalytické vrstvy

Z výchozího isopropoxidu titanu byly připraveny roztoky v isopropylalkoholu o koncentracích 2, 6 a 10 %. Aktivní vrstva byla vytvářena nanášením na skleněné válečky jejich postupným namáčením v roztoku. Vnitřní povrch válečků byl 70 cm², povrch byl předem čištěn chromsírovou směsí a vodou. Po vysušení a hydrolýze byly nanesené vrstvy vyhřáty v laboratorní peci na 550 °C



Obr. 3. Fotodynamická cela FDC-85, řez



Obr. 4. Fotodynamická cela FDC-85, pohled

a přírůstek hmotnosti zvážen. Obdobný postup byl využit pro vytváření vrstev na nerezových sítích a na separačních membránách, kde ale bylo nutno respektovat teplotní odolnosti materiálů.

Stanovení stability vrstvy fotokatalyzátoru

Stabilita vrstev, nutná pro technické využití v průtočném reaktoru, byla měřena z úbytku hmotnosti (zjišťované vážením) po opláchnutí v proudě vody.

Test fotokatalytické účinnosti

Fotokatalytická účinnost byla testována v průtočném anulárním reaktoru APF II rozkladem organického barviva Saturnová oranž L7G (obr. 5).

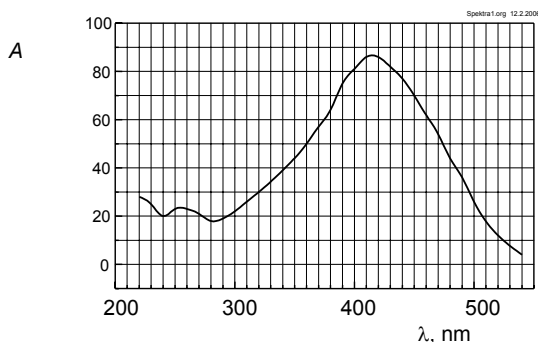
Výsledky a diskuse

Optimalizace přípravy vrstvy fotokatalyzátoru

Vrstva citlivá na světlo byla optimalizována. Byla sledována schopnost vrstvy rozkládat molekuly testovaného kontaminantu v závislosti na způsobu její přípravy. K optimalizaci byl použit statisticky hodnocený faktorový pokus. Vrstvy, připravené sol-gel postupem z isopropoxidu titanu na skleněném podkladu, byly posuzovány z hledisek, významných pro technologické využití:

- hmotnost vrstvy v g m⁻²,
- stabilita vrstvy na podkladu,
- fotokatalytická účinnost.

Předem byl orientačně ověřen vliv plošné hmotnosti vrstvy katalyzátoru na proces v rozmezí 0,3–1 g m⁻². Se stoupající hmotností vrstev se účinnost zvyšovala. Test mechanické stability vrstvy však prokázal, že se přilnavost vrstvy ke skleněnému povrchu, a tím její stabilita, s rostoucí hmotností významně snižuje. Byl hledán tedy kompromis mezi vysokým obsahem imobilizovaného katalyzátoru a mechanickou odolností vrstvy. Ukázalo se, že

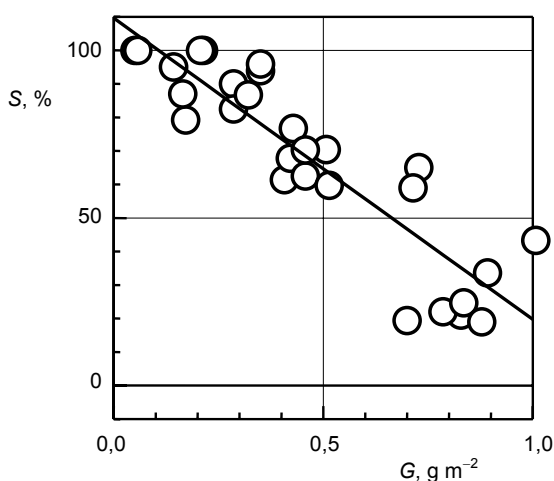


Obr. 5. UV/VIS spektrum barviva Saturnová oranž L7G; A – absorbance

Tabulka I

Barviva použitá jako testovací látky při sledování účinnosti fotokatalytického procesu

Název	Světlostálost v síle vybarvení		Popis	RMH	Vzorec
	1/1	1/6			
Egacidová oranž II	3	2	Acid Orange 7 C.I. 15 510	350,3	$C_{16}H_{11}N_2O_4SNa$
Saturnová oranž L7G	6–7	5	Direct Orange 39, 46 C.I. 40 215	683	$C_{20}H_{16}N_5O_{12}S_3Na_3$
Saturnová nám. modř LFG	6	4	Direct Blue 85	1099	$C_{43}H_{26}N_8O_{14}S_4Na_4$
Karamelové barvivo			Caramel177, Roquette, France	polydisperzní spektrum	

Obr. 6. Stabilita fotokatalytické vrstvy; S – hmotnostní podíl katalyzátoru, stabilní po omytí proudem vody, G – plošná hmotnost nanášené vrstvy

přilnavost souvisí s koncentrací a počtem vrstev nanášeného prekursoru TiO_2 . Technicky využitelné vrstvy tak nepřesahují 400 mg m^{-2} (obr. 6). Hmotnosti vrstev nanášených na síta jsou vyšší než hmotnosti vrstev nanášených na skleněné válečky, což přisuzujeme zanesení koutů ve styčných bodech vláken sít.

Vliv teploty kalcinace

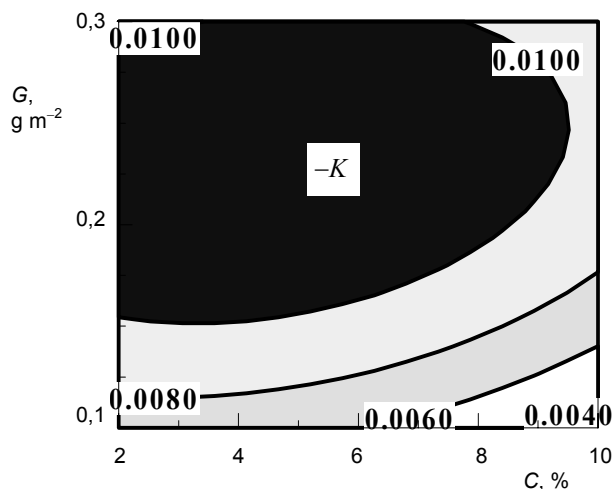
Teplota závěrečné kalcinace katalyzátorových vrstev je obecně významná z hlediska tvorby účinné krystalické modifikace. Za nejaktivnější je pokládána anatasová modifikace, jako optimální pro její vznik je uváděno rozmezí teploty $400\text{--}600 \text{ }^\circ\text{C}$. Pro optimalizační pokus byla zvolena konstantní teplota kalcinace $500 \text{ }^\circ\text{C}$.

Do faktorového pokusu byly pak zařazeny jako sledované faktory:

- koncentrace výchozího isopropoxidu titanu,
- výsledná plošná hmotnost vrstvy, pokud její stabilita byla alespoň 80 %.

Stanovení fotokatalytické účinnosti

Zkoušky byly provedeny na anulárním reaktoru APF II s výbojkou Teslamp 250 W postupem, popsaným v pokusné části. Podíl přímé fotolýzy byl stanoven jako průměr 9 samostatných pokusů s válečky bez vrstvy katalyzátoru. Z měření byly vyhodnoceny hodnoty rychlostní

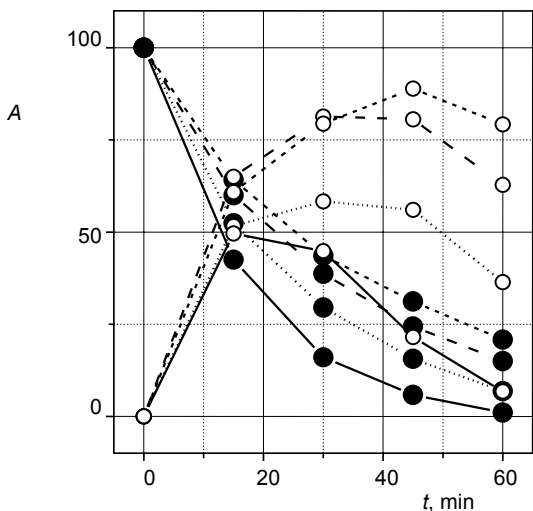
Obr. 7. Výsledky optimalizačního pokusu, vliv na rychlostní konstantu rozkladu testovacího barviva je znázorněn vrstevnicemi výsledkové plochy; G – hmotnost vrstvy (g m^{-2}), C – koncentrace výchozího Ti-tetraizopropoxidu (hm.%), K – rychlostní konstanta rozkladu barviva (min^{-1})

konstanty reakce 1. řádu. Hodnoty byly určeny z linearizované logaritmické závislosti absorbance na čase. Výsledná hodnota rychlostní konstanty byla $0,0157 \pm 0,0005 \text{ min}^{-1}$. Rychlostní konstanta, připadající na vlastní fotokatalytickou reakci, byla pak vypočtena jako rozdíl rychlostních konstant celkové a přímé fotolytické reakce. Optimalizační pokus vymezil oblast podmínek, za kterých byla rychlostní konstanta fotokatalytické reakce nejvyšší.

Na obr. 7 je znázorněna závislost rychlostní konstanty fotokatalytické reakce na podmínkách přípravy vrstvy katalyzátoru. Vrstevnice výsledkové plochy odpovídají jednotlivým úrovním rychlostní konstanty (min^{-1}). Příklady naměřených reakčních rychlostí rozkladu jsou uvedeny na obr. 8. Z tohoto obrázku je patrné, že rozklad barviva probíhá jistou rychlostí i bez katalyzátoru vlivem pouhé fotolýzy (krátké čárky). Rozklad s fotokatalyzátorem probíhá rychleji. Reakční rychlost při tom roste s rostoucí hmotností vrstvy. V horní části obrázku jsou křivky, orientálně zobrazující vznik a rozklad následných nebarevných meziproductů (absorbance při 254 nm – prázdné body). Vliv katalyzovaného procesu na rozklad těchto meziproductů je ještě výraznější.

Membráno-fotokatalytická separace

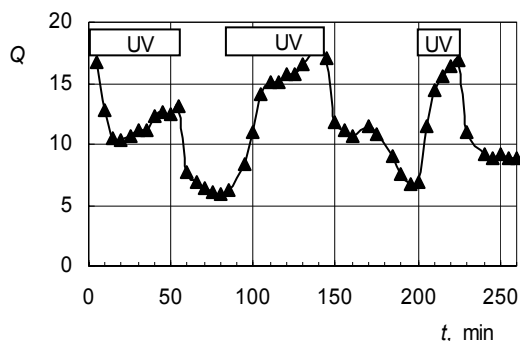
Pro ilustraci průběhu integrovaného procesu byla zvolena membráno-fotokatalytická separace karamelového-



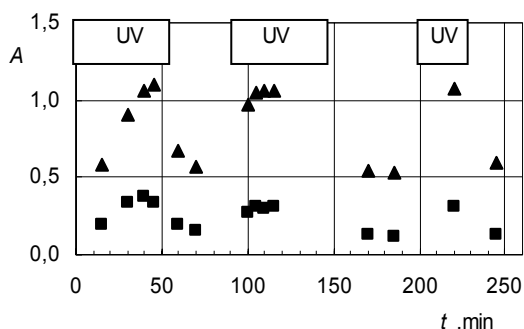
Obr. 8. Výsledky destrukce organického barviva získané na anulárním průtokovém fotoreaktoru APF II; A – absorbance (% z výchozího stavu), t – celková doba cirkulace v reaktoru v minutách, ● hodnoty absorbancí při 410 nm (původní brvivo), ○ hodnoty absorbancí při 254 nm (meziproducty destrukce), - - - bez katalyzátoru, - - - 8 vrstev 2% tetraisoopropoxidu titanu, $1,7 \text{ g m}^{-2} \text{ TiO}_2$, 16 vrstev 2% tetraisoopropoxidu titanu, $2,6 \text{ g m}^{-2} \text{ TiO}_2$, plná 8 vrstev 8% tetraisoopropoxidu titanu, $10,4 \text{ g m}^{-2} \text{ TiO}_2$

ho barviva na NF membráně PVD 1 Hydranautics, potažené 10 tenkými vrstvami fotokatalyzátoru na bázi TiO_2 . Roztok karamelového barviva (Caramel 177, Roquette, France) se skládal z polydisperzního spektra molekul o různých velikostech a byl zvolen proto, že se předpokládala jeho schopnost silně zanášet použitou NF membránu. Oproti rozkladu jednodušších látek je rozklad karamelového barviva složitější proces, autoři však byli vedeni snahou ověřovat synergii membránové separace a fotokatalýzy v podmínkách co nejbližších možným praktickým aplikacím.

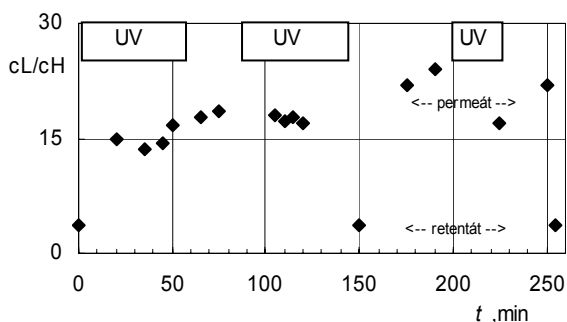
Roztok cirkuloval kontinuálně z 3000 ml velkého zásobníku přes dynamickou celu FDC-85 při přetlaku 3 bar průtokem $0,8 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$. Cela byla osvětlována externě umístěnou lampou tak, že se střídala období s osvětlením a bez osvětlení, při čemž byl sledován průběh procesu za těchto dvou režimů. Určitým problémem bylo, kterou fází pokusu vzít za základ vyhodnocení, protože se membrána v průběhu separace zanášá a nikdy se již nevrací na počáteční hodnoty své propustnosti a selektivity. Začne-li se osvětlením, není charakterizován separační proces na nepoužité membráně bez osvětlení. Začne-li se bez osvětlení, není charakterizováno, jak osvětlení působí na průběh procesu u čisté membrány. Pro ilustraci je na obr. 9 znázorněn případ začínající osvětlením. Jako představitelé vysokomolekulárních a nízkomolekulárních látek byly brány látky vykazující absorpci světla v oblastech $\lambda=400 \text{ nm}$ (vysokomolekulární) a $\lambda=270 \text{ nm}$ (nízkomolekulární). Pro zjednodušení se předpokládá, že koncentrace těchto látek jsou přímo úměrné jejich absorbancím A400, A270. Z výsledků uvedených na obr. 9 je zřejmé, že v obdobích bez osvětlení rychle klesá výkon membrány (Q), velmi přibližně podle známých znalostí zanášením membrány. Při osvětlení se membrána postupně čistila, což bylo vidět také na její barvě, která byla po obdobích bez světla vždy hnědavá, zatímco po obdobích s osvětlením vždy bílá a její výkon (Q) se postupně zvyšuje až na několiknásobek hodnoty výkonu bez osvětlení. Toto čištění a zvýšení výkonu membrány lze



Obr. 9. Výkon Q [$\text{dm}^3 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-2}$] NF membrány PVD 1 Hydranautics při separaci karamelového barviva při osvětlení UV (mezi minutami 0–55, 85–145, 200–225) a bez osvětlení



Obr. 10. Koncentrace vysoko- (c_H) a nízkomolekulárních (c_L) látek v permeátu během separace karamelového barviva, vyjádřená absorbcí A při osvětlení UV (mezi minutami 0–55, 85–145, 200–225) a bez osvětlení; ■ CH, ▲ CL



Obr. 11. Poměr koncentrací nízkomolekulárních látek (c_L) a vysokomolekulárních látek (c_H) látek (c_L/c_H) v permeátu (horní řada bodů) a v retentátu (dolní řada bodů); ◆ CL/CH

přisoudit fotokatalytické destrukci částic, zanášejících membránu. Absorbance vysoko- a nízkomolekulárních látek v permeátu (c_H , c_L) byly vždy nižší bez světla než se světlem, což je zřejmé z výsledků uvedených na obr. 10. Vysvětlujeme si to tím, že bez světla má zanesená membrána s eventuální dynamicky vytvořenou přídatnou membránou na povrchu vyšší retenci oproti čisté membráně. Nadějně bylo zjištění, že poměr c_L/c_H v permeátu nebyl příliš závislý ani na osvětlení ani na celkové době pokusu (viz obr. 11). Hodnota c_L/c_H u permeátu byla v průměru 4 až 6× vyšší (14–24), než u retentátu, kde byla 3,8. Svědčí to o zachování separační schopnosti membrány, kterou je zapotřebí sledovat, protože UV osvětlení může mít destrukční vliv na polymerní membránu, což by se projevilo změnou hodnoty c_L/c_H .

Závěr

V dalších pracích budou jako nosiče fotokatalytické vrstvy zkoumány membrány, které mají vyšší odolnost proti UV světlu (PVDF, anorganické). Pokud se opakovaně prověří nalezené chování membrán opatřených fotokatalytickou vrstvou, dalo by se obecně z technologického hlediska očekávat zvýšení výkonu membrán při nezměněných separačních schopnostech, event. i snížení produkovaného množství retentátu, což by obojí mělo značný praktický význam.

Práce byly provedeny díky spolufinancování výzkumu z grantu Ministerstva zemědělství č. QF 3044 a grantu Ministerstva průmyslu a obchodu č. FT TA/023.

LITERATURA

1. Bellobono I.: *J. Membr. Sci.* 102, 139(1995).
2. Sopajaree K.: *J. Appl. Electrochem.* 29, 1111 (1999).
3. Molinari R.: *Catalysis Today* 67, 273 (2000).
4. Molinari R.: 2001., *J. Membr. Sci.* 206, 399 (2002).
5. Tsuru T.: *J. Chem. Eng. Japan* 34, 844 (2001).
6. Přidal J.: *Fotokatalýza a její součinnost s membránovou separací – perspektivní technologie pro zemědělství*. Firemní literatura fy Mikropur, s.r.o.
7. Přidal J.: *16. mezinárodní kongres CHISA 2004, Praha, 22.–26.8.2004*. Poster, Praha 2004.
8. Přidal J.: *Filtech Europa 2005, Wiesbaden, Germany, 11–13.10.2005*. Poster, Wiesbaden 2005.
9. Wang W.: *J. Photochem. Photobiol.* 159, 47 (2003).
10. Peill N. J.: U.S. Patent 6,051,194, 18.4.2000.
11. Choi W.: *Appl. Catal., B* 31, 209 (2001).
12. Danion A.: *Appl. Catal., B* 52, 213 (2004).
13. Ray A. K.: *Catal. Today* 40, 73 (1998).
14. Dijkstra M. F. J.: *AIChE J.* 49,734 (2003).
15. Dijkstra M. F. J.: *Chem. Eng. Sci.* 56, 547 (2001).
16. Higgins R. J.: *A Photocatalytic Membrane Reactor for Enhanced Destruction of Chloro-Organics in Aqueous Media*. Firemní literatura CeraMem Corporation, USA.
17. Pina M. P.: *Catalytic Membrane Reactors for Partial Oxidation Applications*. mapina@posta.unizar.es
18. SBIR Project: *Photocatalytic Membranes for Producing Ultrapure Water, Coordinated by Technology Assessment and Transfer, Annapolis*. Office of Industrial Technologies report, U.S. Department of Energy (2001).

Jar. Přidal, J. Přidal, and A. Urban (*Mikropur Ltd., Hradec Králové*): **Membrane Separation Coupled with Photocatalysis Process and Laboratory Instrumentation Development**

Procedures for preparation of immobilized photocatalytic layers on various technical surfaces, stable in aqueous solutions, were developed and optimized. The degra-

ation efficiency of the layers was tested with organic dyestuffs and other pollutants, such as caramel dyes, herbicides, toluene, and hydroponics solutions. Laboratory equipment for testing photocatalytic processes, possibly in combination with membrane separation, was developed. Basic chemical-engineering data for photocatalytic as well as membrane separation – photocatalytic processes were obtained and evaluated for technological applications.

ANTIFUNGÁLNÝ ÚČINOK LAKTOBACILOV NA PLESNE RODU *FUSARIUM* A *ASPERGILLUS*

JAROSLAV HUDÁČEK^a, ZSOLT ZALÁN^b,
JANA CHUMCHALOVÁ^a a ANNA HALÁSZ^b

^a Ústav technológie mlieka a tuků, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, ^b Central Food Research Institute, Herman O. str. 15, 1022 Budapest, Hungary
jaroslav.hudacek@vscht.cz

Došlo 28.11.06, prijaté 5.4.07.

Klíčové slová: *Lactobacillus*, antifungálna aktivita, aflatoxín B1, *Fusarium*, *Aspergillus*

Úvod

Mikroskopické vláknité huby plnia v prírode nezastupiteľnú úlohu destruentov pri rozklade rastlinných a živočíšnych zbytkov, lebo sú schopné produkovať celú radu enzýmov (napr. celulózy, chitinázy a amylázy). Človekom sú niektoré z nich využívané v potravinárskom priemysle napr. pri výrobe syrov, kyseliny citrónovej, vo farmaceutickom priemysle pri výrobe antibiotík i iných liečiv a v ďalších biotechnológiách. Naproti tomu mnohé mikroskopické huby môžu pôsobiť z hľadiska človeka nepriaznivo, a to hlavne: rozkladom potravín a krmív uskladnených za nevhodných podmienok, produkciou mykotoxínov do týchto produktov a niektoré saprotrofné mikromycéty môžu byť príležitostne i patogénne ako pre živočíchov, vrátane človeka, tak i pre rastliny. Niektoré plesne sú schopné produkovať viac než jeden mykotoxín, niektorý mykotoxín je naopak produkovaný viacerými druhmi. Medzi najznámejšie toxínogénne druhy patria *Aspergillus* (*Asp.*), *Penicillium*, *Fusarium* (*F.*), *Alternaria*, *Cladosporium* a *Stachybotrys*.

Druhy rodu *Fusarium* sa vyskytujú v pôdnom ekosystéme, môžeme ich definovať ako toxínogénne „poľné“ mikromycéty. Tieto druhy parazitujú prevažne na obilninách, ale i na iných potravinách ako jablká, paradajky, zemiaky¹. V skladoch vyvolávajú plesnivenie kukurice a kazenie jadrového ovocia. Ich rast a produkcia mykotoxínov závisí na vlhkosti, teplote, zložení substrátu, prítomnosti kyslíku, mykologickom profile mikromycét, sporulácii a na mikrobiálnych interakciách. Za významné mykotoxíny rodu *Fusarium* považujeme tri skupiny mykotoxínov. Prvú skupinu tvoria trichothecény, ako deoxynivalenol (DON) a T-2 toxín. Ďalšia skupina zahŕňa zearalenon (ZEN) a jeho deriváty. Do tretej kategórie radíme fumonisíny (FB₁)^{1,2}. Rod *Aspergillus* patrí k najrozšírenejším sa vy-

skytujúcim rodom plesní, jednotlivé druhy môžu byť izolované z pôdy, zo vzduchu, z potravín, z organických zbytkov a z mnoho ďalších zdrojov. Veľmi často býva izolovaný hlavne z burských orieškov a cereálií. Za významné mykotoxíny rodu *Aspergillus* považujeme asperthecin, flavacol, ochratoxíny a hlavne aflatoxíny. Aflatoxín produkujúce plesne môžu rásť za rôznych okolitých podmienok³ a na mnohých poľnohospodárskych a potravinárskych komoditách^{4,5}. Produkcia aflatoxínov silne závisí na teplote, vlhkosti, prístupe vzduchu, štruktúre a chemickom zložení substrátu. Plesne sú na rozdiel od baktérií všeobecne prispôsobivejšie na určité extrémne podmienky prostredia; lepšie znášajú nižšie hodnoty pH, nižší obsah využiteľnej vody (nižšie hodnoty a_w) a nižšie teploty. V posledných rokoch sa odborníci sústreďujú na vplyv rôznych nižších mikroorganizmov na rast plesní a s nimi spätou produkciu mykotoxínov.

Baktérie mliečneho kysnutia koexistujú s vláknitými hubami a kvasinkami v mnohých ekosystémoch, napr. v rôznych fermentovaných potravinách, kde môžu inhibovať rast plesní a tým je možné ich využiť ako bioochranu⁶. Z baktérií mliečneho kysnutia sa najviac štúdií, na potlačenie rastu plesní, zabyva kmeňmi rodu *Lactobacillus* a rodu *Lactococcus* (*Lc.*). Taktiež, najvýznamnejší vplyv na mykotoxíny vykazovali druhy rodu *Lactobacillus* a *Lactococcus*, konkrétne *Lbc. rhamnosus* GG a *Lbc. rhamnosus* LC-705. Nedávno boli objavené nové antimikrobiálne aktivity vo filtráte kultúry *Lbc. plantarum* aktívne i proti plesniam ako *F. avenaceum*. *F. graminearum* bol inhibovaný ako pôsobením *Lbc. plantarum*, tak aj *Lbc. alimentarius*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lbc. brevis* a *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*⁷. Baktérie mliečneho kysnutia tiež produkujú nízkomolekulárne zlúčeniny⁸, peptidy⁹ a proteíny¹⁰ s antifungálnymi vlastnosťami. V súčasnosti sa mnoho nevie o tom, ako tieto látky pôsobia na rast plesní. Niektoré baktérie produkujú prchajúce metabolity, ktoré môžu pôsobiť na rast a sporuláciu plesní¹¹.

V rámci práce sa sledovala antifungálna aktivita desiatich kmeňov rodu *Lactobacillus* proti plesniam rodu *Fusarium* a *Aspergillus*. Antifungálna aktivita živých buniek a neutralizovaného a tepelne ošetrovaného supernatantu sa testovala difúznou agarovou metódou. V ďalšej časti práce sa sledoval inhibičný účinok laktobacilov na rast a produkciu aflatoxínu B1 (AFB1) kmeňov rodu *Aspergillus* počas spoločnej kultivácie v tekutom médiu.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Bakteriálne kmene

Bakteriálne kmene *Lbc. plantarum* 01, *Lbc. paracasei* 05, *Lbc. casei* 154, *Lbc. paracasei* SF1, *Lbc. rhamnosus* VT1 použité v práci pochádzajú zo Zbierky baktérií, plesní a kvasiniek z Ústavu technológie mlieka a tuků, VŠCHT Praha, Česká republika. Bakteriálne kmene *Lbc. plantarum*

2142, *Lbc. casei* 2750, *Lbc. curvatus* 2768, *Lbc. curvatus* 2775, *Lbc. casei* Shirota použité v práci pochádzajú z Central Food Research Institute, Budapešť, Maďarsko.

Kmene plesní

Kmene plesní *F. proliferatum* M 5689, *Asp. flavus* DMF 0802, *Asp. parasiticus* DMF 0805 použité v práci pochádzajú zo Zbierky baktérií, plesní a kvasiniek z Ústavu technológie mlieka a tuků, VŠCHT Praha, Česká republika. A kmene plesní *F. culmorum* 301, *F. culmorum* 302, *F. graminearum* 608 pochádzajú z Výzkumného ústavu rostlinné výroby, Oddělení šlechtitelských metod, Praha, Česká republika.

Kultivácia bakteriálnych kultúr

Kmene laktobacilov boli kultivované v MRS bujóne, ktorý bol zaočkovaný 1 obj.% inokula, kultivácia prebiehala anaeróbne pri 37 °C po dobu 18 h. Pre udržanie životaschopnosti boli mikroorganizmy pravidelne preočkovávané raz týždenne. Pri pokuse boli vždy používané čerstvo pripravené kultúry.

Príprava supernatantov

Testované kmene (inokulum 1 obj.%) boli kultivované v 10 ml MRS bujónu pri teplote 37 °C po dobu 18 h za anaeróbných podmienok. Po kultivácii boli bunky odstredené za podmienok 1710 g/ 20 min/4 °C. U získaných supernatantov bolo upravené pH na hodnotu 6,5 použitím 10 hm.% a 1 hm.% NaOH. Následne sa supernatanty prefiltrovali cez mikrofilter (0,22 μm, Millipore, Írsko). Supernatanty boli tepelne ošetrované pri 90 °C po dobu 10 min a uchovávané pri teplote –20 °C.

Kultivácia plesní

Všetky použité kmene plesní boli kultivované a uchovávané na šikmom PDA agare. Kultivácia prebiehala pri izbovej teplote po dobu 5 až 10 dní, do dosiahnutia optimálneho mycélia a tvorby spór. Kmene boli preočkovávané raz za mesiac. Pri pokuse boli vždy použité čerstvo pripravené kultúry.

Príprava inokula o presnom počte spór

Čerstvo pripravená kultúra kmeňov plesní na PDA agare bola vytrepáním prevedená do 5–6 ml fyziologického roztoku s Tweenom 80 (cit.¹²) do sterilnej skúmavky. Počet spór suspenzie bol spočítaný pomocou Bürkerovej komôrky. Koncentrácia spór bola upravená na $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^7$ spór na ml fyziologického roztoku.

Stanovenie antifungálnej aktivity metódou dvojitého agarového platní použitím živých buniek

Do 5 ml vysterilovaného MRS bujónu sa zaočkovalo 100 μl suspenzie skúmaného kmeňa baktérie čerstvo nakultivovaného v MRS bujóne ($1 \cdot 10^8$ – $1 \cdot 10^9$ KTJ ml⁻¹). Na Petriho miskú sa nalial modifikovaný MRS agar (hmotnostný podiel octanu sodného bol vynechaný)¹³. Po zatuhnutí sa doprostred zaočkovalo 5 μl nariedenej sus-

penzie skúmaného bakteriálneho kmeňa. Misky boli kultivované anaeróbne pri 37 °C po dobu 18 h. Po kultivácii sa miska preliala 10 ml soft PDA agaru obsahujúceho výslednú koncentráciu $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ spór. Misky boli kultivované aeróbne pri teplote 30 °C po dobu 72 h.

Stanovenie antifungálnej aktivity metódou dvojitého agarového platní použitím supernatantu

Na Petriho miskú sa nalial modifikovaný MRS agar (hmotnostný podiel octanu sodného bol vynechaný)¹³. Po zatuhnutí sa doprostred korkovrtom vytvoril otvor, do ktorého sa naočkovalo 450 μl neutralizovaného a tepelne ošetrovaného supernatantu. Po difúzií supernatantu do agaru sa miska preliala 10 ml soft PDA agaru obsahujúceho upravenú koncentráciu spór ($1 \cdot 10^5$ spór na ml fyziologického roztoku). Misky boli kultivované aeróbne pri teplote 30 °C po dobu 72 h. Výsledky sa získali z dvoch nezávislých sledovaní.

Príprava laktobacilov a plesní rodu *Aspergillus* pre spoločnú kultiváciu v tekutom médiu

Príprava laktobacilov

Kmene laktobacilov boli kultivované v MRS bujóne, ktorý bol zaočkovaný 1 obj.% inokula, kultivácia prebiehala anaeróbne pri 30 °C po dobu 24 h. Po kultivácii sa kmene zriedili sterilnou destilovanou vodou na výslednú koncentráciu 10^6 KTJ ml⁻¹. Pre experiment sa použilo 500 μl takto pripravenej suspenzie laktobacilov.

Príprava plesní

Plesne *Asp. flavus* DMF 0802 a *Asp. parasiticus* DMF 0805 boli kultivované na šikmom PDA agare. Kultivácia prebiehala pri izbovej teplote po dobu 7 dní, do dosiahnutia optimálneho mycélia a tvorby spór. Čerstvo pripravená kultúra kmeňov plesní na PDA agare bola vytrepáním prevedená do 10 ml fyziologického roztoku s 0,1 obj.% Tween 80. Získaná suspenzia spór sa prefiltrovala cez sterilnú bavlnu a filtrát sa zriedil 100 násobne sterilným fyziologickým roztokom. Pre experiment sa použilo 500 μl takto pripravenej suspenzie plesní.

Spoločná inkubácia laktobacilov a plesní

Do 5 ml sterilného média, obsahujúceho glukózu, tryptofán, kvasničný extrakt, mäsový extrakt, NaCl, Na₂HPO₄ o pH 6,8; sa naočkovalo 500 μl laktobacilovej suspenzie a 500 μl suspenzie spór plesne. Taktiež sa naočkovalo do média 500 μl suspenzie spór plesne samotnej, ako kontrola. Spoločná kultivácia prebiehala pri 30 °C počas 0, 5, 8, 14, 20 dní.

Príprava vzoriek pre stanovenie hmotnosti mycélia

Po spoločnej kultivácii sa médium v príslušných dňoch sledovania prefiltrovalo cez sklenenú fritu S4. Zachytený tuhý podiel, mycélium, sa nechal dosušiť na filtračnom papieri v termostate pri 20 °C do ďalšieho dňa. Suché mycélium sa následne vážilo na analytických vá-

hach. Získané hodnoty hmotnosti mycélia sa prepočítali ako prírastok, resp. úbytok, hmotnosti mycélia vzhľadom ku kontrole v každom príslušnom dni sledovania.

Príprava vzoriek pre stanovenie koncentrácie aflatoxínu B1

Tekuté médium sa v príslušných dňoch sledovania, po odstránení mycélia (frita S4), prefiltrovalo cez 0,22 µm porézny mikrofilter (Millipore, Írsko) do sterilnej skúmavky. Vzorky sa zriedili vodou a naniesli sa na imunoafinitnú kolónu (IAC – AflaTest® WB from VICAM). Následne sa kolóna premyla 10 ml vody a použitím striekačky sa vzduchom vysušila. Zachytený toxín sa z imunoafinitnej kolóny vymyl 2 ml metanolu do sklenenej viálky. Koncentrácia aflatoxínu B1 v takto pripravenej vzorke sa stanovila pomocou HPLC s fluorescenčným detektorom^{14,15}.

Výsledky a diskusia

Stanovenie antifungálnej aktivity metódou dvojitéch agarových platní použitím živých buniek a supernatantu

V tejto práci sa sledovala antifungálna aktivita 10-tich kmeňov rodu *Lactobacillus* proti plesniam rodu *Fusarium* a *Aspergillus*. Antifungálna aktivita sa stanovovala metódou dvojitéch agarových platní a to použitím živých bakteriálnych buniek alebo supernatantu po kultivácii laktobacilových kmeňov v MRS bujone. Najvyššia aktivita buniek bola zistená u kmeňov *Lbc. curvatus* 2775 a *Lbc. curvatus* 2768, ktoré inhibovali rast všetkých plesní (tab. I). V prípade aktivity supernatantu boli najúčinnější kmene *Lbc. paracasei* 05 a *Lbc. curvatus* 2768 (tab. I).

Antifungálna aktivita jednotlivých kmeňov rodu *Lactobacillus* sa prisudzuje tvorbe organických kyselín, peroxidu vodíka, tvorbe bakteriocínu a ďalších metabolitov. Zo získaných výsledkov (tab. I), ak bol inhibičný účinok len v prípade použitia živých buniek (+/-) usudzujeme, že antifungálny účinok bol spojený s tvorbou a následným pôsobením organických kyselín. Ak bola aktivita len v prípade použitia supernatantu (-/+) usudzujeme, že inhibičný účinok nenastáva vplyvom organických kyselín, keďže sa supernatant neutralizuje a tepelne ošetruje, ale pravdepodobne pôsobením naprodukovaných látok s antifungálnou aktivitou (nízko molekulárne a tepelne stabilné zlúčeniny, bakteriocíny), ktoré sú v dostatočnom množstve na začiatku rastu sledovanej plesne, a tým pádom dochádza k inhibičnému účinku. Inhibičný efekt sa na miskách prejavoval tvorbou inhibičnej zóny okolo kolónie živých buniek alebo okolo korkovrtu s difundovaným supernatantom, a to úplným potlačením rastu plesne alebo degradáciou mycélia a zamedzením sporulácie.

Medzi obligátne heterofermentatívne kmene laktobacilov, ktoré produkujú antifungálne látky, patrí *Lbc. sanfrancisco* CB1, ktorý bol izolovaný z kvásku. Tento kmeň produkoval široké spektrum organických kyselín s antifungálnou aktivitou. Medzi ne patrí kyselina octová a kapronová, ktoré inhibujú rast plesne *F. graminearum*¹⁶. Z *Lbc. plantarum* MiLAB 393 bola okrem cyklických dipeptidov vyizolovaná kyselina 3-fenylmliečňá s pomerom L(+) a D(-) 9:1. Toto spektrum látok pôsobilo inhibične proti *F. sporotrichioides* a *Asp. fumigatus*¹⁷. Nové typy zlúčenín produkoval kmeň *Lbc. plantarum*. Konkrétne sa jednalo o kyselinu benzoovú a 5-metyl-2,4-imidazolidinedion. Tieto látky boli aktívne samostatne, ale hlavne s 1% prídavkom kyseliny mliečnej, kedy účinok vzrástol. Ich inhibičná aktivita bola hlavne proti *F. avenaceum*⁸.

Tabuľka I

Inhibičný účinok laktobacilov, použitím živých buniek a supernatantu, proti plesniam rodu *Fusarium* a *Aspergillus* kultivovaných 72 h pri 30 °C

Kmeň	<i>F. culmorum</i> 301	<i>F. culmorum</i> 302	<i>F. proliferatum</i> M 5689	<i>F. graminearum</i> 608	<i>Asp. flavus</i> DMF 0802	<i>Asp. parasiticus</i> DMF 0805
01	+ / +	+ / -	- / -	+ / +	+ / +	- / -
05	+ / +	+ / +	- / +	- / +	+ / +	- / +
154	+ / +	+ / -	+ / +	+ / +	+ / +	- / +
SF1	- / +	+ / +	- / -	+ / +	+ / +	- / +
VT1	+ / +	+ / +	+ / -	- / +	+ / +	- / -
2142	+ / +	+ / +	+ / +	- / +	+ / +	- / -
2750	+ / +	+ / -	- / -	+ / +	+ / +	- / +
2768	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +
2775	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / -
Shirota	+ / +	+ / +	+ / -	- / +	+ / +	- / +

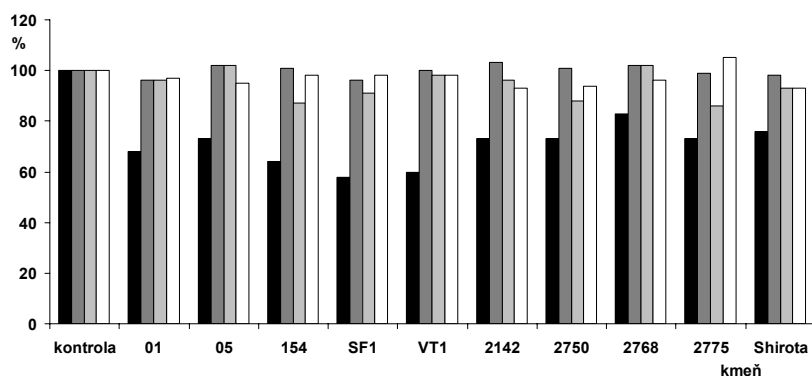
aktivita živých buniek / aktivita supernatantu, + ... inhibícia, - ... žiadna inhibícia

Existujú tiež laktobacily, ktoré produkujú organické kyseliny na báze mastných kyselín. Okrem mastných kyselín sú tiež niektorými kmeňmi produkované i estery mastných kyselín. Konkrétne z *Lbc. rhamnosus* VT1 sa izolovali metylestery a 2-metyl-5-hydroxyhexanová kyselina¹⁸. Nesmieme však zabudnúť zohľadniť vplyv okolitých podmienok, ako je doba a teplota inkubácie, pH a kmeň. Preukázalo sa, že inhibícia plesní nie je spôsobená iba produkciou organických kyselín, ale i okolitými podmienkami¹⁹. Lavermicocca a spol.⁷ referovali produkciu antifungálnych zlúčenín fenylmliečnej kyseliny a 4-hydroxyfenylmliečnej kyseliny z kmeňa *Lbc. plantarum* izolovaného z kysnutého cesta. Nedávno bolo objavené, že *Lbc. coryniformis* S13 môže produkovať antifungálne látky na základe bielkovín¹⁰. Taktiež boli identifikované antifungálne cyklické dipeptidy z *Lbc. plantarum* izolovaného zo siláže¹⁷.

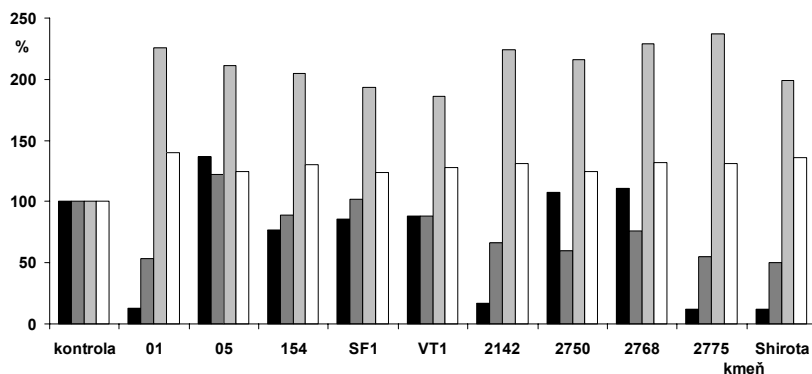
Sledovanie inhibície laktobacilov na rast plesní a produkciu aflatoxínu B1 počas spoločnej kultivácie v tekutom médiu

V ďalšej časti práce sme sledovali vplyv laktobacilov na rast plesní a tvorbu aflatoxínu B1 v tekutom médiu pri spoločnej kultivácii po dobu 20 dní pri 30 °C. Boli použité dva kmene plesní, *Asp. flavus* DMF 0802 a *Asp. parasiticus* DMF 0805. Rast plesní bol sledovaný metódou váženia mycélia. Výsledky sú znázornené graficky (obr. 1, 2).

Sledovaním rastu *Asp. flavus* DMF 0802 počas spoločnej kultivácie s laktobacilmi v priebehu 20 dní sa najvýraznejšia zmena hmotnosti mycélia vzhľadom ku kontrole zaznamenala v počiatočnej fáze rastu plesne, a to v 5. dni sledovania. V prítomnosti všetkých bakteriálnych kmeňov



Obr. 1. Hmotnosť mycélia *Asp. flavus* DMF 0802 v priebehu spoločnej kultivácie s laktobacilmi pri 30 °C v percentuálnom vyjadrení vzhľadom ku kontrole; ■ 5. deň, ■ 8. deň, ■ 14. deň, □ 20. deň



Obr. 2. Hmotnosť mycélia *Asp. parasiticus* DMF 0805 v priebehu spoločnej kultivácie s laktobacilmi pri 30 °C v percentuálnom vyjadrení vzhľadom ku kontrole; ■ 5. deň, ■ 8. deň, ■ 14. deň, □ 20. deň

Tabuľka II

Sledovanie rastu a produkcie aflatoxínu B1 kmeňa *Asp. flavus* DMF 0802 počas spoločnej kultivácie s laktobacilmi v tekutom médiu v priebehu 20 dní pri 30 °C

Kultúra	Doba kultivácie [dni]	Hmotnosť mycélia [mg]	AFB1 [ng ml ⁻¹]	Kultúra	Doba kultivácie [dni]	Hmotnosť mycélia [mg]	AFB1 [ng ml ⁻¹]
Kontrola	5	45,8 ± 0,6	nd	Kontrola	5	45,8 ± 0,6	nd
	8	48,5 ± 0,6	nd		8	48,5 ± 0,6	nd
<i>Asp. flavus</i>	14	29,5 ± 0,4	nd	<i>Asp. flavus</i>	14	29,5 ± 0,4	nd
	20	24,8 ± 0,3	nd		20	24,8 ± 0,3	nd
<i>Asp. flavus</i>	5	31,2 ± 0,4	nd	<i>Asp. flavus</i>	5	33,3 ± 0,4	nd
	8	46,7 ± 0,6	nd		8	49,8 ± 0,6	nd
<i>Lbc. plantarum</i> O1	14	28,2 ± 0,3	nd	<i>Lbc. plantarum</i> 2142	14	28,2 ± 0,3	nd
	20	24,0 ± 0,3	nd		20	23,1 ± 0,3	nd
<i>Asp. flavus</i>	5	33,6 ± 0,4	nd	<i>Asp. flavus</i>	5	33,5 ± 0,4	nd
	8	49,4 ± 0,6	nd		8	49,1 ± 0,6	nd
<i>Lbc. paracasei</i> O5	14	30,2 ± 0,4	nd	<i>Lbc. casei</i> 2750	14	26,1 ± 0,3	nd
	20	23,6 ± 0,3	nd		20	23,3 ± 0,3	nd
<i>Asp. flavus</i>	5	29,3 ± 0,4	nd	<i>Asp. flavus</i>	5	37,8 ± 0,5	nd
	8	48,9 ± 0,6	nd		8	49,3 ± 0,6	nd
<i>Lbc. casei</i> 154	14	25,6 ± 0,3	nd	<i>Lbc. curvatus</i> 2768	14	30,1 ± 0,4	nd
	20	24,3 ± 0,3	nd		20	23,9 ± 0,3	nd
<i>Asp. flavus</i>	5	26,5 ± 0,3	nd	<i>Asp. flavus</i>	5	33,4 ± 0,4	nd
	8	46,6 ± 0,6	nd		8	48,1 ± 0,6	nd
<i>Lbc. paracasei</i> SF1	14	26,7 ± 0,3	nd	<i>Lbc. curvatus</i> 2775	14	25,3 ± 0,3	nd
	20	24,3 ± 0,3	nd		20	26,0 ± 0,3	nd
<i>Asp. flavus</i>	5	27,4 ± 0,3	nd	<i>Asp. flavus</i>	5	34,8 ± 0,4	nd
	8	48,3 ± 0,6	nd		8	47,5 ± 0,6	nd
<i>Lbc. rhamnosus</i> VT1	14	28,8 ± 0,3	nd	<i>Lbc. casei</i> Shiro-ta	14	27,4 ± 0,3	nd
	20	24,4 ± 0,3	nd		20	23,0 ± 0,3	nd

AFB1 – aflatoxín B1, nd – pod detegovateľným limitom 5,0 ng ml⁻¹ AFB1

rodu *Lactobacillus* bol nárast plesne, oproti kontrole, výrazne menší (58–83 %).

Najvýraznejšia zmena sa zaznamenala v 14. dni kultivácie *Asp. parasiticus* DMF 0805, kde došlo k tomu, že v prítomnosti takmer všetkých kmeňov laktobacilov sa prudko zvýšil hmotnostný prírastok mycélia oproti kontrole (86–137 %).

Rast *Asp. parasiticus* sledovaný vážením suchého mycélia bol spočiatku veľmi rýchly v zmesnej kultúre, než keď plesň rástla samotná, ale nárast plesne na konci inkubácie bol porovnateľný v oboch kultivovaných kultúrach. Je to možné tým, že bakteriálne metabolity môžu stimulovať rast plesne v počiatočnej fáze inkubácie²⁰. *Asp. nidulans* bol spoločne kultivovaný s *Lbc. coryniformis* MiLAB 123, u ktorého bol preukázaný menší inhibičný efekt²¹. Spoločná kultivácia s *Lbc. coryniformis* MiLAB

123 nespôsobila zmenu morfológie mycélia v tej samej miere ako s *Lbc. plantarum* MiLAB 393 (cit.²²).

Z filtrátu získaného po kultivácii sa následne izoloval, pomocou imunoafinitnej kolóny, aflatoxín B1 a jeho koncentrácia sa stanovila metódou HPLC. Pri spoločnej kultivácii kmeňa *Asp. flavus* DMF 0802 s laktobacilmi nedochádzalo k tvorbe aflatoxínu na rozdiel od prípadu kultivácie *Asp. parasiticus* DMF 0805, kde sme stanovili príslušné koncentrácie aflatoxínu B1 v priebehu 20 dní sledovania (tab. II, III).

Zo zistených hodnôt koncentrácie AFB1 vzhľadom ku kontrole, kde nedochádzalo k produkcii AFB1 (tab. III), sa domnievame, že rast prítomných laktobacilov spôsobil tvorbu AFB1 vyvolaním stresových rastových podmienok využívaním nutričných zložiek média a produkciou určitých metabolitov. Avšak v ďalších dňoch sledovania sme

Tabuľka III

Sledovanie rastu a produkcie aflatoxínu B1 kmeňa *Asp. parasiticus* DMF 0805 počas spoločnej kultivácie s laktobacilmi v tekutom médiu v priebehu 20 dní pri 30 °C

Kultúra	Doba kultivácie [dni]	Hmotnosť mycélia [mg]	AFB1 [ng ml ⁻¹]	Kultúra	Doba kultivácie [dni]	Hmotnosť mycélia [mg]	AFB1 [ng ml ⁻¹]
Kontrola	5	33,7 ± 0,4	nd	Kontrola	5	33,7 ± 0,4	nd
	8	50,4 ± 0,6	nd		8	50,4 ± 0,6	nd
	14	27,5 ± 0,3	nd		14	27,5 ± 0,3	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	20	29,3 ± 0,4	nd	<i>Asp. parasiticus</i>	20	29,3 ± 0,4	nd
	5	4,4 ± 0,1	nd		5	5,6 ± 0,1	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	8	26,9 ± 0,3	166 ± 6,7	<i>Asp. parasiticus</i>	8	33,4 ± 0,4	170 ± 6,9
	14	62,1 ± 0,7	6 ± 0,2		14	61,5 ± 0,7	41 ± 1,7
<i>Lbc. plantarum</i> O1	20	40,9 ± 0,5	nd	<i>Lbc. plantarum</i> 2142	20	38,4 ± 0,5	18 ± 0,7
	5	46,1 ± 0,6	32 ± 1,3		5	36,4 ± 0,4	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	8	61,4 ± 0,7	169 ± 6,8	<i>Asp. parasiticus</i>	8	30,1 ± 0,4	84 ± 3,4
	14	57,9 ± 0,7	36 ± 1,5		14	59,3 ± 0,7	40 ± 1,6
<i>Lbc. paracasei</i> O5	20	36,7 ± 0,4	6 ± 0,2	<i>Lbc. casei</i> 2750	20	36,5 ± 0,4	167 ± 6,8
	5	25,9 ± 0,3	25 ± 1,0		5	37,4 ± 0,4	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	8	45,1 ± 0,5	103 ± 4,2	<i>Asp. parasiticus</i>	8	38,5 ± 0,5	16 ± 0,6
	14	56,4 ± 0,7	23 ± 0,9		14	63,1 ± 0,8	37 ± 1,5
<i>Lbc. casei</i> 154	20	38,2 ± 0,5	11 ± 0,4	<i>Lbc. curvatus</i> 2768	20	38,7 ± 0,5	18 ± 0,7
	5	29,1 ± 0,3	31 ± 1,3		5	3,9 ± 0,05	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	8	51,4 ± 0,6	23 ± 0,9	<i>Asp. parasiticus</i>	8	27,5 ± 0,3	196 ± 7,9
	14	53,2 ± 0,6	18 ± 0,7		14	65,3 ± 0,8	48 ± 1,9
<i>Lbc. paracasei</i> SF1	20	36,4 ± 0,4	7 ± 0,3	<i>Lbc. curvatus</i> 2775	20	38,3 ± 0,5	33 ± 1,3
	5	29,8 ± 0,4	10 ± 0,4		5	4,1 ± 0,05	nd
<i>Asp. parasiticus</i>	8	44,3 ± 0,5	nd	<i>Asp. parasiticus</i>	8	25,1 ± 0,3	122 ± 4,9
	14	51,1 ± 0,6	33 ± 1,3		14	54,8 ± 0,7	15 ± 0,6
<i>Lbc. rhamnosus</i> VT1	20	37,4 ± 0,4	14 ± 0,6	<i>Lbc. casei</i> Shirota	20	39,9 ± 0,5	24 ± 1,0

AFB1 – aflatoxín B1, nd – pod detegovateľným limitom 5,0 ng ml⁻¹ AFB1

detegovali nižšie koncentrácie AFB1. Tento pokles koncentrácie AFB1 by mohol byť spôsobený práve prítomnosťou laktobacilov, kedy mohlo dochádzať k degradácii AFB1 na netoxické látky, poprípade naviazanie AFB1 na bunkovú stenu baktérii, alebo absorpcia AFB1 bakteriálnymi bunkami. V prípade spoločnej kultivácie *Asp. parasiticus* DMF 0805 s kmeňom *Lbc. casei* 2750 sme zaznamenali v 20. dni sledovania zvýšenie koncentrácie AFB1, čo mohlo byť spôsobené následnou autolýzou bakteriálnych buniek a uvoľnením AFB1, v nezmenenej forme, do tekutého média (tab. III).

Existujú dve teórie, ako dochádza k odstráneniu mykotoxínov z vodného média v prítomnosti baktérii mliečného kysnutia (BMK). Prvou je vplyv štruktúr v bunkovej stene, kedy dôjde k naviazaniu mykotoxínu na bunkovú stenu a tým dôjde k jeho inaktivácii. Druhý prístup pred-

pokladá, že k odstráneniu dôjde produkciou niektorých antimikrobiálnych metabolitov BMK. Haskard a spol.²³ vo svojej práci uvádza, že väzba je fyzikálnej povahy, nekovalentná a k väzbe dochádza s hydrofobnými miestami v bakteriálnej bunkovej stene. V poslednej dobe sa pozornosť sústreďuje na 3 hlavné body: a) väzba lactobacillus–mykotoxín; b) stabilita vzniknutého komplexu; c) vplyv inkubačného času na väzbu toxínu²⁴. Plesne *Asp. flavus* a *Asp. parasiticus* produkujú zmes mykotoxínov, hlavne aflatoxíny B1, B2, G1 a G2. Aflatoxín B1 je najznámejší mykotoxín z obavy pred jeho vysokou toxicitou a karcinogenicitou. Aflatoxín B1 sa vyskytuje prevažne na podzemnici olejnej, kukurici a na ďalších obilninách, ako sú ryža, pšenica, cirok a proso. Ak sú kravy kŕmené krmivom obsahujúce aflatoxín B1, toxický metabolit aflatoxín M1 sa vyskytuje v ich mlieku a následne v ďalších mliečnych

produktach²⁵. Produkcia aflatoxínu plesňou *Asp. parasiticus* bola značne menšia, hlavne po 3. dni inkubácie, keď *Lbc. casei* bol prítomný na rozdiel od samotného rastu plesne bez prítomnosti *Lbc. casei*²⁰. Viac ako 2 hm.% kyseliny mliečnej prítomnej v médiu nepodporoval len rast *Asp. parasiticus*, ale určitá koncentrácia stimulovala biosyntézu aflatoxínu²⁶. Redukcia aflatoxínu bola dosiahnutá v kontaminovaných arašidových orieškoch za kyslých podmienok po 60 min vo vriacom vodnom kúpeli s 10% roztokom peroxidu vodíka²⁷. Kinetika redukcie AFB1 na AFB2 a AFG1 na AFG2 kyselinou mliečnou bola skúmaná v zriedenom kyslom vodnom roztoku (pH 3,35–4,50) pri 37 °C. Rýchlosť reakcie prebiehala podľa prvého poriadku s ohľadom na koncentrácie kyseliny mliečnej a aflatoxínov, a nezávisle na koncentrácii vodíkových iónov²⁸. Efekt mliečnanu sodného na produkciu aflatoxínu je funkciou počiatočného pH. Nedisociované organické karboxylové kyseliny, než ich ionizovaná forma, majú sklon byť transportované cez bunkové membrány a spomaliť alebo zvýšiť metabolizmus bunky. Preto pH blízke neutrálnemu je nepriaznivé pre kyselinu mliečnu transportujúcu sa cez membránu, a to môže byť dôvod, prečo tieto zložky stimulujú produkciu aflatoxínu, keď médium malo počiatočnú hodnotu pH 4,2 (cit.²⁹).

Záver

Cieľom celého projektu je príprava doplnkových zmesných laktobacilových kultúr pri výrobe výrobkov obsahujúcich mliečnu a cereálnu zložku. Snaha je vyrobiť výrobok obsahujúci protektívnu kultúru, ktorá by inhibovala účinok možných vyskytujúcich sa plesní, najväčšie uplatnenie tejto technológie by mohlo byť pri výrobe dojčenskej a detskej výživy s cereálnou zložkou. V tejto práci sme sa zamerali na antifungálnu aktivitu príslušných laktobacilov proti plesniam rodu *Fusarium* a *Aspergillus*, a to použitím živých buniek a supernatantu. V súvislosti s produkciou mykotoxínov sme sledovali vplyv prítomnosti laktobacilov, počas spoločnej kultivácie s *Asp. parasiticus* 0805 v tekutom médiu, na koncentráciu aflatoxínu B1 v priebehu 20 dní spoločnej kultivácie. Z uskutočnených pokusov boli získané pozitívne výsledky, ktoré sa dajú v budúcnosti zohľadniť pri príprave doplnkových zmesných laktobacilových kultúr. Taktiež vlastnosti laktobacilov by sa dali v budúcnosti použiť v technológii výroby cereálnych výrobkov, kde by sa dali použiť ako ochrana proti výskytu plesní a produkcii mykotoxínov. Samozrejme pri výbere vhodných kmeňov baktérií mliečneho kysnutia ako bioochrany je potrebná určitá opatrnosť, lebo sú známe i výsledky pokusov dokazujúcich stimuláciu rastu plesní i produkciu toxínov.

Táto práca vznikla s podporou výskumného zámeru CEZ: MSM 6046137305 a projektu CZ – HU 5/2004. Autor ďalej ďakuje Mgr. Světlane Sýkorovej CSc. za poskytnutie kmeňov plesní rodu *Fusarium*.

LITERATÚRA

- Pitt J. I., Hocking A. D.: *Fungi and Food Spoilage*. London 1997.
- Frisvad J. C., Thrane U.: *Mycotoxin Production by Common Filamentous Fungi*. Utrecht 2002.
- Holmquist G. U., Walker H. W., Stahr H. M.: *J. Food Sci.* 43, 778 (1983).
- Bullerman L. B.: *Food Technol.* 40, 714 (1986).
- Hesseltine C. W., Shotwell O. L., Ellis J. J., Stubblefield R. D.: *Bacteriol. Rev.* 30, 795 (1966).
- Schnürer J., Magnusson J.: *Trends Food Sci. Technol.* 16, 70 (2005).
- Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobetti M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4084 (2000).
- Niku-Paavola M. L., Laitila A., Mattila-Sandholm T., Haikara A.: *J. Appl. Microbiol.* 86, 29 (1999).
- Okkers D. J., Dicks L. M. T., Silvester M., Joubert J. J., Odendaal H. J.: *J. Appl. Microbiol.* 87, 726 (1999).
- Magnusson J., Schnürer J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1 (2001).
- Wiseman D. W., Marth E. H.: *Mycopathologia* 73, 49 (1981).
- Suzuki I., Nomura M., Morichi T.: *Milchwissenschaft* 46, 635 (1991).
- Stiles J., Penkar S., Plocková M., Chumchalová J., Bullerman L. B.: *J. Food Prot.* 65, 1188 (2002).
- Stroka J., Anklam E.: *EUR 19027 EN*, (1999).
- Sobolev V. S., Dornier J. W.: *Food Chem. Contam.* 85, 641 (2002).
- Corsetti A., Gobetti M., Rossi J., Daminiani P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 253 (1998).
- Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4322 (2002).
- Petráková H.: *Diplomová práce*. VŠCHT, Praha 2002.
- Gourama H., Bullerman L. B.: *Int. J. Food Microbiol.* 34, 131 (1997).
- El-Gendy S. M., Marth E. H.: *J. Food Prot.* 44, 211 (1980).
- Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J., Schnürer J.: *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 129 (2003).
- Ström K., Schnürer J., Melin P.: *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 119 (2005).
- Haskard C., Binnion CH., Ahokas J.: *Chem.-Biol. Interact.* 128, 39 (2000).
- Peltonen K., El-Nezami H. S., Haskard C. A., Ahokas J., Salminen S.: *J. Dairy Sci.* 10, 2152 (2001).
- Van Egmond H. P. (ed.): *Mycotoxins in Dairy Products*. Bilthoven, Netherlands 1989.
- El-Gazzar F. E., Rusul G., Marth E. H.: *J. Food Prot.* 50, 940 (1987).
- Conzane R. S., Stenzel W. R., Kroh L. W.: *Dtsch. Lebensm.-Rundsch* 98, 321 (2002).
- Shukla R. S., Verma R. J., Mehta D. N.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 2737 (2002).
- Luchese R. H., Harrigan W. F.: *J. Appl. Bacteriol.* 69, 512 (1990).

J. Hudáček^a, Z. Zalán^b, J. Chumchalová^a, and A. Halász^b (^aDepartment of milk and fat technology, Institute of Chemical Technology, Prague, ^b Central Food Research Institute, Budapest, Hungary): **Antifungal Effect of Lactobacilli on *Fusarium* and *Aspergillus* Molds**

The aim of this project is selection of Lactobacilli cultures for production of fermented products which include both milk and cereal components. Antifungal activity of ten Lactobacilli strains from two culture collections against *Fusarium spp.* and *Aspergillus spp.* was tested by the agar diffusion method. In the following step the inhibitory effect of Lactobacilli on growth and mycotoxin production of *Asp. flavus* DMF 0802 and *Asp. parasiticus* DMF 0805 was determined by common cultivation in liquid media using the method of mycelium weight and aflatoxin B1 detection by HPLC. The highest activity of Lac-

tobacilli cells against molds was detected for strains *Lbc. curvatus* 2775 and *Lbc. curvatus* 2768. The supernatants of strains *Lbc. paracasei* 05 and *Lbc. curvatus* 2768 were the most active. The most significant weight change of the mycelia of *Asp. flavus* DMF 0802 compared with control was observed in the initial growth period of the mould on day 5 (58–83 %). An important change was detected on day 14 in cultivation of *Asp. parasiticus* DMF 0805, when the mycelium weight increased rapidly in the presence of almost all Lactobacilli strains compared with control (86–137 %). The production of aflatoxin B1 by *Asp. flavus* DMF 0802 strain was inhibited. The production of aflatoxin B1 by *Asp. parasiticus* DMF 0805 strain was detected on day 5 of joint cultivation with Lactobacilli, and the maximum concentration was detected on day 8 (20–200 ng ml⁻¹). In the next days of cultivation, the concentration of aflatoxin B1 decreased.

DETEKCE BODOVÝCH MUTACÍ V KIRSTEN *RAS 2* GENU METODOU LOCKED NUCLEIC ACIDS CLAMPED PCR

MARTIN BERÁNEK^a, JAN BUREŠ^b, MARTIN ŠÁCHA^c, LUKÁŠ SÁKRA^c, MILOŠ RAJMAN^c, PAVEL JANDÍK^d, EMIL RUDOLF^e a OLFERT LANDT^f

^a Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, ^b 2. Interní klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, ^c Chirurgická klinika, Krajská nemocnice Pardubice, ^d Chirurgická klinika, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové, ^e Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy Hradec Králové, ^f TIB MOLBIOL, Berlin, SRN
beranek@lfhk.cuni.cz

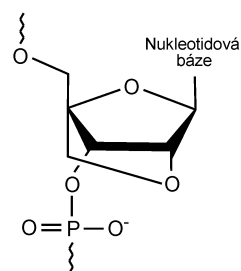
Došlo 28.2.07, přijato 9.5.07.

Klíčová slova: DNA, gen *K-ras*, polymerasová řetězová reakce, somatické mutace, kolorektální karcinom

Úvod

LNA molekuly (locked nucleic acids, tedy volně přeloženo nukleové kyseliny s „uzamčenou“ konformací) patří mezi syntetická analoga přirozených nukleotidů, která lze chemicky spojit v LNA oligonukleotidové řetězce. Vzniklé oligomery disponují řadou strukturních i funkčních odlišností oproti přirozeným řetězcům nukleových kyselin. Důležitou součástí každého LNA monomeru je methylenový můstek mezi 2'-hydroxylovou skupinou a 4'-uhlíkem furanosového kruhu (oxy-LNA), viz obr. 1. Hydroxylovou skupinu na 2'-uhlíku je možno též substituovat skupinou thiolovou (thio-LNA) nebo aminovou (amino-LNA). Methylenový můstek určující bicyklický charakter LNA nukleotidů fixuje ribosu v 3'-endo konformaci, což významně zvyšuje termodynamickou a biologickou stabilitu komplementárně vznikajících LNA/DNA či LNA/RNA dvoušroubovic v porovnání s jejich nemodifikovanými analogy^{1,2}. Začleněním jediného LNA nukleotidu do sekvence oligomeru lze po hybridizaci s komplementárním řetězcem zvýšit teplotu tání výsledné dvoušroubovice o 1–3 °C (cit.³).

Vyšší afinita ke komplementárním sekvencím, větší odolnost vůči účinkům nukleas, a následně delší biologické



Obr. 1. Chemická struktura oxy-locked nucleic acids (LNA)

ký poločas v porovnání s přirozenými analogy jsou důležité aspekty potenciálního využití LNA oligonukleotidů nejen v léčbě malignit, virových infekcí, autoimunitních onemocnění či alergií⁴, ale také v klinické diagnostice. Fluorescenčně značené sondy konstruované na bázi LNA oligomerů se používají při FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) analýzách nebo při detekci bodových mutací pomocí polymerasové řetězové reakce v reálném čase (real-time PCR, ve zkratce rt-PCR)³. Neznačené LNA oligomery jsou součástí kotvicích sond (tzv. LNA-capture probes) při vyšetření jednonukleotidových polymorfismů v mikrotitračních destičkách a při detekci somatických mutací, které provázejí maligní transformaci buněk v různých biologických tkáních^{5–7}.

Somatické bodové mutace v genu *K-ras* (Kirsten *ras 2* gen, lokalizace 12p12.1) se objevují u 30–50 % případů sporadického kolorektálního karcinomu; onemocnění provázeného genetickými změnami v mnoha protoonkogenech, tumor supresorových genech a genech opravných (reparových). Mutace v genu *K-ras* byly prokázány nejen v nádorové tkáni, ale též ve stolici⁸ a v krevní plasmě postižených osob⁹. Genetické změny vázané především na kodony 12 a 13 jsou jednou z klíčových událostí při transformaci buněk benigního střevního adenomu v zhoubný kolorektální karcinom¹⁰.

Konstrukcí plně komplementárních krátkých syntetických oligonukleotidů vůči „zdravým“ alelám genu *K-ras*, které byly vytvořeny na bázi PNA molekul (peptide nucleic acids, základ oligomeru tvoří 2-aminoethylglycinový řetězec) a jejich přidáním do reakční směsi lze takto zvýhodnit amplifikaci alel mutantních. Díky vytvoření komplementární „svorky“ mezi PNA oligomerem a alelami s normální sekvencí byl tento děj označen jako PCR clamping. Pomocí této modifikace metody PCR byla s velkou citlivostí a specifícností zjištěna přítomnost mutantních alel genu *K-ras* ve vzorcích cholangiokarcinomu, karcinomu pankreatu¹¹, endometria¹² a plic¹³. Relativními nevýhodami PNA oligomerů jsou nižší rozpustnost a precipitace během skladování, nižší teplota tání a v některých aplikacích též vyšší nespecifické pozadí při rt-PCR. Cílem naší studie bylo využít diagnostické možnosti neznačených LNA oligonukleotidů pro detekci mutací genu *K-ras* metodou rt-PCR clamping ve vzorcích malignizovaných tumorů tlustého střeva.

Experimentální část

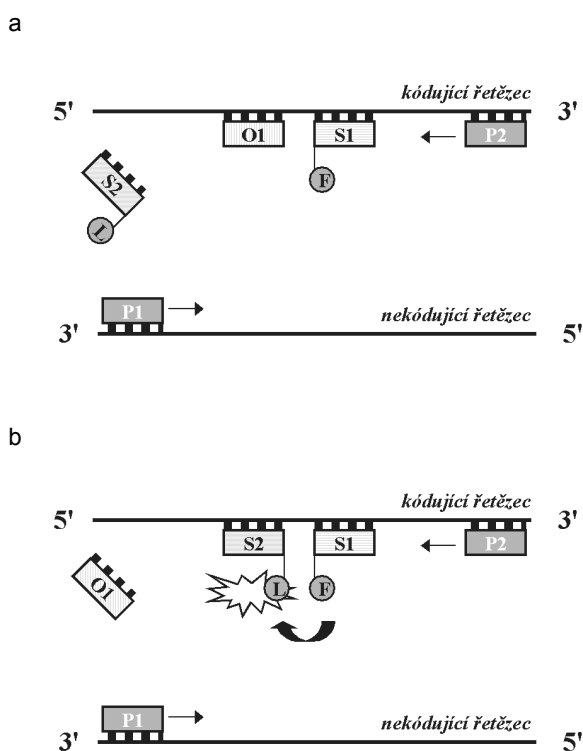
Do studie bylo zařazeno 133 vzorků primárních sporadických střevních adenokarcinomů pacientů Chirurgické kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové, Chirurgické kliniky Krajské nemocnice Pardubice a 2. Interní kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Každý kolorektální karcinom byl klasifikován klinicky dle TNM stupnice (zkratka z anglických slov tumor, node a metastasis) a histologicky dle stupně buněčné diferenciaci. Kontrolní skupinu tvořilo 20 bioptických vzorků morfologicky normální střevní sliznice osob s negativním koloskopickým vyšetřením. Studie byla schválena Etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a veškerý biologický materiál byl získán s informovaným souhlasem pacientů. Všechny vzorky tkání pocházely z čerstvých resektátů či vzorků čerstvě bioptovaných. Bezprostředně po odběru byly vzorky v plastových zkumavkách uloženy do mrazicího boxu na teplotu $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ani v jednom případě nebyl použit vzorek po fixaci ve formalínu nebo zalitý v parafinovém bločku.

Stabilizovaná buněčná linie lidského kolorektálního adenokarcinomu SW480 ($p53^{-/-}$, $APC^{-/-}$) byla získána z American Type Culture Collection (ATCC), USA. Tato linie obsahuje bodovou mutaci GGT \rightarrow GTT (G12V) v kodonu 12 genu *K-ras*. Buňky byly kultivovány v Dulbekově modifikovaném Eaglově médiu (Gibco, USA) obohaceném o 10% fetální hovězí sérum (Gibco, USA), penicilin G (100 U ml^{-1}) a streptomycin (100 mg ml^{-1}). Inkubace probíhaly v inkubátoru s řízenou atmosférou (5% CO_2) při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Buněčné kultury byly pasážovány dvakrát týdně pomocí 0,05% roztoku trypsin/EDTA dle protokolu společnosti ATCC.

DNA byla ze vzorků tumorů a z buněčného sedimentu linie SW480 izolována standardní fenol-chloroformovou extrakční metodou¹⁴. Vyšetření pomocí rt-PCR byla provedena v přístroji LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics, SRN). Reakční objem ve skleněných kapilárách byl 10 μl . Každá kapilára obsahovala 60 ng DNA templátu, 1 μl reakční směsi LightCycler DNA Master HybProbe (Roche), chlorid hořečnatý (finální koncentrace ve směsi 5 mmol l^{-1}), fluorescenčními značkami opatřené hybridizační sondy S1 a S2 (každá s finální koncentrací $0,3\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$), oxy-LNA oligomer O1 ($0,1\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$) a dva primery P1 a P2 ($0,5\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$). Sondy S1 a S2 hybridizovaly ke kódujícímu řetězci ve vzájemné vzdálenosti dva nukleotidy – pro účinný přenos fluorescenční rezonanční energie (FRET, fluorescence resonance energy transfer) mezi použitými fluorochromy. Sonda S1 byla na 3'-konci značena fluoresceinem (donor-fluorochrom s excitačním maximem 497 nm a emisním maximem 525 nm); sonda S2 byla na svém 5'-konci značena fluorescenční značkou LC RED 705 (akceptorový fluorochrom s emisním maximem 705 nm , Roche) a její hydroxylová skupina na 3'-uhlíku byla blokována fosforylací (v sekvenci sondy S2 označeno symbolem PH-3') pro zabránění polymerace. Stejným způsobem byl opatřen i 3'-konec použitého oxy-LNA oligomeru O1. Oba primery (P1 primer: $5\text{'-AGG CCT GCT GAA AAT GAC TG-3'}$

a P2 primer: $5\text{'-GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGC A-3'}$), sondy (S1, donor fluorescence: $5\text{'-CGT CCA CAA AAT GAT TCT GAA TTA GCT GTA TCG TCA AGG CAC T-fluorescein-3'}$; sonda S2, akceptor fluorescence: $5\text{'-LC RED 705-TTG CCT ACG CCA CAA GCT CCA A-PH-3'}$) a oxy-LNA oligomer O1 ($5\text{'-CCT ACG CCA CCA GCT CC-PH-3'}$) byly syntetizovány v TIB MOLBIOL, SRN podle návrhu Chen a spol.¹¹. Délka amplifikovaných PCR produktů byla 164 bp. Pozice nasedání primerů, sond a LNA oligomeru O1 na řetězce DNA schematicky znázorňují obr. 2a,b. Teplotní podmínky pro rt-PCR byly následující: iniciační denaturace 10 minut při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ následovaná 45 amplifikačními cykly (denaturace 5 s při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, hybridizace primerů 10 s při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, elongace 7 s při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$). Celková doba analýz se pohybovala okolo 60 minut.

Jako pozitivní kontrola byla použita DNA z nádorové buněčné linie SW480. Negativní amplifikační kontrolu



Obr. 2. Schematické znázornění pozic primerů (P1 a P2), sond (S1 a S2) a oxy-LNA oligomeru (O1) v exonu 1 genu *K-ras*; obr. 2a ukazuje situaci, kdy je ve vzorku přítomna DNA s normální sekvencí v genu *K-ras* a oligomer O1 díky vyšší komplementaritě vytěsňuje při optimální teplotě sondu S2 z vazby na DNA templát, což vede k ztrátě možnosti přenosu fluorescenční rezonanční energie mezi dvojicí fluorochromů vázaných na koncích hybridizačních sond, tj. fluoresceinu (F) jako donoru fluorescence a LC 705 (L) jako akceptoru fluorescence. Na obr. 2b je znázorněna situace, kdy v přítomnosti mutantní alely genu *K-ras* (v kodonu 12) přednostně hybridizuje sonda S2 a po přenosu fluorescenční rezonanční energie dochází k emisi záření fluorochromu LC 705 a k jeho následnému zachycení na detektoru

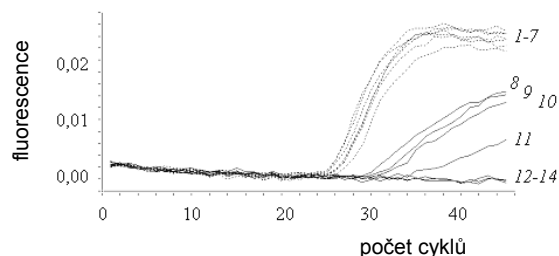
tvorila reakční směs bez přítomnosti DNA templátu. K vyloučení možnosti inhibice rt-PCR byl každý vzorek DNA amplifikován paralelně s a bez přítomnosti LNA molekul v reakční směsi. Pro ověření výsledku a pro bližší specifikaci zjištěného typu bodové mutace byla stanovena nukleotidová sekvence PCR produktů s použitím soupravy GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit a kapilárního sekvenátoru CEQ 8000 (Beckman Coulter, USA).

Ředící řada vzorků pro zjištění citlivosti metody byla připravena sériovým ředěním DNA pocházející z linie SW480 extrakty DNA kontrolní skupiny s normální sekvencí genu *K-ras* (sekvence byly předem ověřeny stanovením nukleotidové sekvence v exonu 1). Vytvořená ředící řada obsahovala tento podíl mutantních alel v 60 ng DNA templátu: 33 %; 6,7 %; 1,3 %; 0,27 %; 0,05 %; 0,01 %.

Výsledky a diskuse

Amplifikace produktů z oblasti 1. exonu genu *K-ras* pomocí rt-PCR proběhla ve všech DNA vzorcích extrahovaných z nádorové i nenádorové (kontrolní) tkáně. Selektivní amplifikace mutantních alel při LNA-clamped rt-PCR prokázala přítomnost bodové mutace v genu *K-ras* u 45 vyšetřených karcinomů (34 %). Frekvence výskytu mutací ve sledovaném souboru vzorků je v souladu s výsledky našich předchozích experimentů¹⁵. Amplifikační křivky typické pro mutantní alely genu *K-ras* ukazuje obr. 3.

Následná konfirmace provedená stanovením nukleotidové sekvence PCR produktů umožnila blíže specifikovat všechny detegované mutace. Přestože jsme pro LNA-

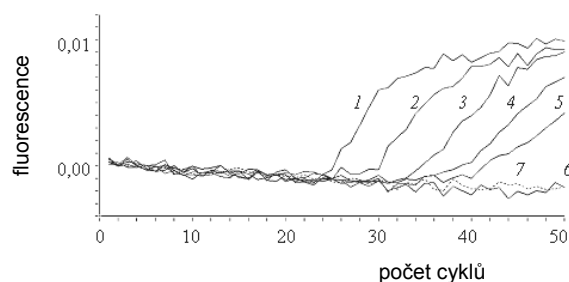


Obr. 3. Amplifikační křivky real-time PCR; oblast 1. exonu genu *K-ras* byla amplifikována v přítomnosti fluorescenčních hybridizačních sond umožňujících vizualizaci vznikajících PCR produktů. Přerušovanými čarami 1–7 jsou znázorněny amplifikace bez přítomnosti LNA oligomeru v reakční směsi, plnými čarami 8–14 jsou vyznačeny amplifikace totožných vzorků DNA při LNA-clamped rt-PCR. Ve čtyřech případech zde byly detegovány bodové mutace v genu *K-ras*. Stanovením nukleotidové sekvence byly následně zjištěny mutace G12D (tomuto vzorku odpovídá amplifikační křivka 8), G12S (křivka 9), G12V (křivka 10) a G13D (křivka 11). Ve třech případech byly mutace vyloučeny (nedošlo k amplifikaci, křivky 12–14). Vzhledem k přítomnosti jak mutantní, tak normální sekvence v DNA extraktech získaných z kolorektálních karcinomů jsou amplifikace prováděné bez přítomnosti oxy-LNA oligomeru silnější a počty cyklů rt-PCR nutných pro detekci fluorescenčního signálu nižší

clamped rt-PCR použili fluorescenční sondu navrženou primárně pro mutantní typ GGT→TGT (G12C), který byl zachycen ve dvou vzorcích, použitá metoda byla schopna spolehlivě detegovat taktéž substituce GGT→GAT (G12D, 17 případů), GGT→GTT (G12V, 16 případů), GGT→AGT (G12S, 4 případy) a GGT→GCT (G12A, 2 případy), a to ve frekvencích blízkých závěrům větších populačních studií¹⁶. Bodové mutace v genu *K-ras* analyzované metodou rt-PCR clamping ve vzorcích karcinomu pankreatu a cholangiokarcinomu jsou prokazovány výhradně v 12. kodonu genu¹¹. Konstrukce použitých sond nám však v případě kolorektálního karcinomu umožnila zachytit rovněž genetické změny v kodonu 13. Záměna GGC→GAC (G13D) byla v našem souboru vzorků detegována celkem ve čtyřech případech.

Mutace v kodonech 12 a 13 představují u kolorektálních karcinomů 90 % všech genetických změn prokazatelných v genu *K-ras*. Dosud provedené studie ukázaly, že transverze GGT→GTT jsou významným prognostickým faktorem pro vyšší výskyt pooperačního relapsu této choroby. Naopak, nejčastější záměna GGT→GAT bývá detegována spíše v méně rozvinutém stádiu tumoru a pravděpodobně nijak neovlivňuje délku přežití¹⁶.

Jedním ze stěžejních cílů naší práce bylo optimalizovat amplifikaci mutantních alel genu *K-ras* ve vzorcích kolorektálních karcinomů. Klíčovým předpokladem pro cílenou amplifikaci mutantních sekvencí bez rizika falešně negativních či falešně pozitivních výsledků je množství LNA molekul přidávané do reakční směsi. Optimální koncentrace LNA pro rt-PCR clamping (0,1 μmol l⁻¹) byla při stejném množství DNA templátu v reakční směsi dvacetkrát nižší oproti používaným koncentracím PNA oligomerů¹¹. Tento fakt svědčí o řádově vyšší účinnosti námi pou-



Obr. 4. Určení citlivosti metody LNA-clamped rt-PCR; amplifikační křivka 1: v 60 ng DNA templátu bylo zastoupeno 20 ng mutantních alel genu *K-ras* z linie SW480 (33 %); křivka 2: 4 ng (6,7 %); křivka 3: 0,8 ng (1,3 %); křivka 4: 0,16 ng (0,27 %); křivka 5: 0,03 ng (0,05 %); křivka 6: 0,006 ng (0,01 %, bez amplifikace). Díky LNA clamping nebyly amplifikovány normální alely genu *K-ras*. Proto i přes stejné výchozí množství DNA templátu stoupá počet cyklů potřebný k detekci fluorescenčního signálu podle snižujícího se množství mutantních alel ve vzorcích ředící řady. Citlivost metody je přibližně 0,03 ng. Vzorek bez DNA templátu (negativní kontrola) je znázorněn přerušovanou čarou (křivka 7)

žité modifikace PCR clamping.

Vyšetřením vzorků morfologicky normální střevní sliznice jsme nezaznamenali žádné amplifikační křivky při rt-PCR ani jiné nespecifické produkty na elektroforetickém gelu. Negativní výsledek potvrdilo též sekvenování PCR produktů amplifikovaných v reakčních směsích bez přítomnosti LNA oligonukleotidů.

Na základě ředící řady popsané v Experimentální části byla určena citlivost naší vyšetřovací metody. Nejnižší amplifikovatelné množství mutantních alel obsažené v 60 ng DNA matrice bylo 30 pikogramů (0,05 %). Určení detekčního limitu znázorňuje obr. 4. Citlivost této jednostupňové metody je v souladu s pracemi využívajícími pro rt-PCR PNA oligomery^{11,17}.

Závěr

Několik autorů popsalo možnost detekce velmi malých množství cirkulujících nádorových buněk v krevní plasmě, žluči, pankreatické šťávě, sputu nebo v sentinelových uzlinách na základě přítomnosti mutací v genu *K-ras* metodou PNA-clamped rt-PCR (cit.^{11,13,18}). Podobně i naše modifikace využívající LNA oligonukleotidy k cílenému zablokování amplifikace normálních alel genu *K-ras* umožňuje specifickou detekci malých množství mutantních alel v kodonech 12 a 13. Představuje rychlou a spolehlivou alternativu pro vyšetření mutací ve vzorcích DNA pocházejících přímo z nádorové tkáně nebo jiného biologického materiálu. Pro bližší identifikaci nalezených mutací je vždy nezbytné stanovit nukleotidovou sekvenci získaných PCR produktů.

Seznam zkratk

bp	počet párů bází
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FRET	fluorescence resonance energy transfer
LNA	locked nucleic acids
PNA	peptide nucleic acids
rt-PCR	polymerasová řetězová reakce v reálném čase
TNM	mezinárodní klasifikace maligních tumorů (z anglického Tumor, Node, Metastasis)

LITERATURA

1. Braasch D., Jensen S., Liu Y., Kaur K., Arar K., White M., Corey D.: *Biochemistry* 42, 7967 (2003).
2. Kurreck J., Wyszko E., Gillen C., Erdmann V. A.: *Nucleic Acids Res.* 30, 1911 (2002).
3. Grannemann S., Landt O., Breuer S., Blomeke B.: *Clin. Chem.* 51, 1523 (2005).
4. Chan J. H. P., Lim S., Wong W. S.: *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 533 (2006).
5. Ørum H., Jakobsen M. H., Koch T., Vuust J., Borre M.: *Clin. Chem.* 45, 1898 (1999).
6. Jacobsen N., Fenger M., Bentzen J., Rasmussen S. L., Jakobsen M. H., Fensholt J., Skouv J.: *Clin. Chem.*

- 48, 657 (2002).
7. Prix L., Uciechowski P., Bockmann B., Giesing M., Schuetz A. J.: *Clin. Chem.* 48, 428 (2002).
8. Moerkerk P., Arends J. W., van Driel M., de Bruine A., de Goeij A., ten Kate J.: *Cancer Res.* 54, 3376 (1994).
9. Ryan B. M., Lefort F., McManus R., Daly J., Keeling P. W., Weir D. G., Kelleher D.: *Gut* 52, 101 (2003).
10. Andreyev J., Cunningham D.: *Clin. Oncol.* 19, 286 (2001).
11. Chen C. Y., Shiesh S. C., Wu S. J.: *Clin. Chem.* 50, 481 (2004).
12. Wallen M., Tomas E., Visakorpi T., Holli K., Maenpaa J.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 55, 343 (2005).
13. Behn M., Thiede C., Neubauer A., Pankow W., Schuermann M.: *J. Pathol.* 190, 69 (2000).
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
15. Beránek M., Bureš J., Palička V., Jandík P., Langr F., Nejedlá E.: *Clin. Chem. Lab. Med.* 37, 723 (1999).
16. Andreyev J., Norman A. R., Cunningham D., Oates J. R., Clarke P. A.: *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 675 (1998).
17. Luo J. D., Chan E. C., Shih C. L., Chen T. L., Liang Y., Hwang T. L., Chiou C. C.: *Nucleic Acid Res.* 34, e12 (2006).
18. Taback B., Bilchik A. J., Saha S., Nakayama T., Wiese D. A., Turner R. R., Kuo C. T., Hoon D. S. B.: *Int. J. Cancer* 111, 409 (2004).

M. Beránek^a, J. Bureš^b, M. Šácha^c, L. Sákra^c, M. Rajman^c, P. Jandík^d, E. Rudolf^e, and O. Landt^f
^aDepartment of clinical biochemistry and diagnostics, Faculty of Medicine and Faculty Hospital Hradec Králové, ^bDepartment of internal medicine, Faculty of Medicine and Faculty Hospital Hradec Králové, ^cDepartment of surgery, Regional Hospital Pardubice, ^dDepartment of surgery, Faculty of Medicine and Faculty Hospital Hradec Králové, ^eDepartment of medical biology and genetics, Faculty of Medicine and Faculty Hospital Hradec Králové, ^fTIB MOLBIOL, Berlin, Germany):
Detection of Point Mutations in Kirsten ras 2 Gene Using Locked Nucleic Acids Clamped PCR

The aim of the study was to examine diagnostic possibilities of LNA (locked nucleic acids) -clamped PCR for detection of somatic mutations in the *K-ras* gene in 133 samples of human malignant colorectal tumors. Selective real-time PCR amplification of mutant alleles of the *K-ras* gene (codon 12 and 13) revealed the presence of mutations in 45 samples of the tumors. The detection limit of the used method for *K-ras* mutant alleles was 0.03 ng. LNA-clamped PCR suppressing amplification of the wild-type alleles of the *K-ras* gene provides a very sensitive and specific detection of mutations present in DNA samples of colorectal carcinomas.

RECENZE

J. P. Novák, A. Malijevský,
J. Matouš, K. Růžička, P. Voňka:
Termodynamické vlastnosti plynů

Vydavatelství VŠCHT Praha, 2007.

222 stran, 17 obrázků, CD nosič s elektronickou interaktivní verzí publikace, cena 240 Kč (bez 5 % DPH).
ISBN 978-80-7080-003-4

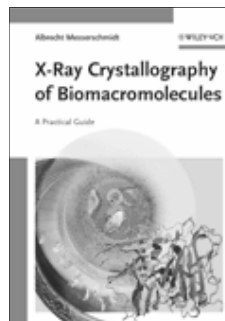
Tato monografie vznikla, jak uvádějí autoři v Předmluvě, na základě přednášek a seminářů na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze a také s přihlédnutím k požadavkům z průmyslové praxe. Kniha volně navazuje na obdobně zaměřenou předchozí publikaci „Plyny a plynné směsi“ (vydala Academia, Praha 1972), ale spíše než o doplnění, jde zde o zcela přepracované vydání.

Samotný název práce by mohl být rozšířen zdůrazněním, že nejde jen o čisté plyny, ale i o jejich směsi. Navíc se autoři nevyhnuli alespoň stručnému pojednání o stavových a termodynamických vlastnostech kapalin ve dvou podkapitolách, i když publikace rozhodně není ucelenou monografií o vlastnostech kapalin, resp. tekutin. Na druhé straně, specializace na plynný stav umožnila autorům probrat problematiku plynů a jejich směsí do větší hloubky a s důrazem na metodiku řešení. Publikace tak velmi dobře zobrazuje současný stav oboru a samotná forma textu je dobře uspořádaná a čitelná. Navíc je většina metod doplněna vhodně volenými a na sebe navazujícími příklady, které čtenáři dokonale osvětlují postup výpočtu.

Kniha je rozdělena do sedmi kapitol (Stavové chování plynů a kapalin, Základní termodynamické vztahy, Výpočet termodynamických veličin ideálního plynu, Termodynamické veličiny reálných čistých plynů, Termodynamické veličiny reálné plynné směsi, Výpočet tepla a práce při různých dějích a Parciální molární veličiny a chemický potenciál). Za zvlášť cennou považují kapitolu o stanovení parciálních molárních veličin, která skýtá důležitý návod, jak vypočítat pomocí teorému korespondujících stavů termodynamické veličiny směsí, nutné pro výpočet fázových a chemických rovnováh.

Knihu mohou doporučit všem těm, kteří mají základní znalosti z chemické termodynamiky, to je posluchačům a absolventům magisterského a doktorského studia, ale i pracovníkům ve výzkumných a projekčních ústavech a v chemickém průmyslu, kteří se zajímají o danou problematiku.

J. Linek



Albrecht Messerschmidt:
X-Ray Crystallography of Biomacromolecules: A Practical Guide

Vydal Wiley-VCH, Weinheim
2006, 1. vydání, 304 stran, cena knihy v pevné vazbě \$155
ISBN 978-3-527-31396-9

Je velice příjemné konstatovat, že po reedicích několika klasických učebnic bio-makromolekulární krystalografie vychází učebnice nová od fundovaného autora. Jedná se již o jeho třetí knihu (především se zabývaly především strukturou a funkcí metaloenzymů). Tato publikace je zaměřena obecně na metodu studia struktury bio-makromolekul RTG strukturní analýzou.

A. Messerschmidt je vedoucím výzkumné skupiny na Institutu Max-Planck pro biochemii v Martinsried v Německu, titul PhD. získal na Huboldtově univerzitě v Berlíně u profesora Williama Klebera a RTG strukturní analýzou bio-makromolekul se začal zabývat v laboratoři vedené Robertem Huberem, nositelem Nobelovy ceny.

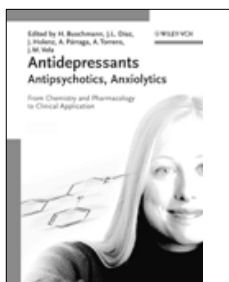
Messerschmidtova učebnice je velice příjemná z hlediska členění kapitol, jelikož sleduje časovou osu jednotlivých etap řešení struktury makromolekul. V úvodních kapitolách popisuje základy metody, dobře popsané již v předešlých učebnicích, ale v závěru kapitol vždy najdeme aktuální informace o studiu problematiky i s odkazy na nejnovější trendy v oboru jako například: zavádění automatizovaných procedur např. při krystalizaci, měření difrakcí a zpracování souborů naměřených dat. Zřejmě nejcennější a poprvé knižně publikované skutečnosti nalézáme v posledních dvou kapitolách teoretické části, z nichž jedna je věnována studiu reakčního mechanismu metodami umožňujícími strukturní analýzu reakčních intermediátů a druhá je samostatně věnována strukturní genomice.

V druhé části knihy jsou na vybraných praktických příkladech názorně popsány zásadní etapy řešení struktury bio-makromolekul:

- určení krystalové symetrie a prostorové grupy a následně zpracování difrakčních dat,
- zpracování anomálního signálu a určení substruktury anomálně rozptýlujících atomů,
- řešení fázového problému experimentálními metodami i numericky metodou molekulového nahrazení,
- metody založené na průměrování struktury jednotlivých molekul multimeru pomocí prvků nekrystalografické symetrie,
- „*in silico*“ budování modelů bio-makromolekul.

Zásadním přínosem knihy jsou velice dobře zpracované části o pokročilých metodách v RTG strukturní analýze a o studiu reakčních mechanismů využívající přímé experimentálně zjištěné strukturní informace. Tato kniha bude jistě vysoce hodnocena všemi badateli, kteří se zabývají RTG strukturní analýzou makromolekul: Ti jistě ocení praktickou část s konkrétními příklady. Kniha může být cenná i pro širší obec biochemiků a biologů, kteří dnes často využívají strukturních modelů určených výše popsanými metodami. Úvodní jasně členěné pasáže lze doporučit pokročilým studentům biochemie, biofyziky a příbuzných disciplín.

Jiří Brynda



Buschmann Helmut, Holenz Jörg, Párraga Antonio, Torrens Antoni, Vela José Miguel, Díaz José Luis (ed.): Antidepressants, Antipsychotics, Anxiolytics; From Chemistry and Pharmacology to Clinical Application

1. vydání březen 2007, Wiley-VCH, Weinheim,
2. díly, 1215 stran, pevná vazba, cena 299.- Euro.
ISBN-10: 3-527-31058-4

Kniha, která je obsáhlým souborem příspěvků 43 autorů přináší kompletní a detailní pohled na všechny v současnosti dostupné psychiatrické lékové substance, pokrývá vlastnosti přes 250 různých sloučenin s jejich podrobnou farmakologickou charakteristikou.

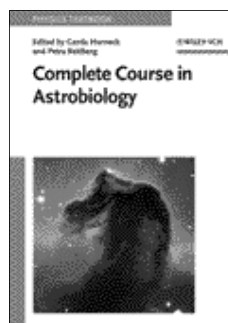
Úvod knihy patří kvalitnímu glosáři, malé encyklopedii termínů v knize použitých. První díl se zabývá depresemi, schizofrenií, psychózami, druhý díl pak úzkostmi, nedostatkem pozornosti a hyperaktivitou. Každá z kapitol je členěna systematicky na popis a definici, klinický obraz, farmakoterapii/farmakologii, experimentální výzkum a modelování a nakonec chemické aspekty s popisem substancí na trhu a ve vývoji.

Kniha je velmi dobře technicky provedena, jak je to obvyklé u nakladatelství Wiley-VCH, chemické vzorce jsou konzistentní a jejich provedení velmi kvalitní. Není však již věcí technické redakce, ale autorů, že u látek, které obsahují stereogenní centrum, není uvedena v řeči strukturních vzorců konfigurace lékové substance, která je používána, i když je v textu třeba diskutována. Domnívám se, že je to na závadu exaktnosti, i když pokrokem je, že se tento aspekt v textu diskutuje. Látky uvedené v přehledu jsou zřetelně označovány a rozděleny podle stavu, ve kterém se ve vztahu k medicíně legislativně nacházejí, zda jsou ve fázi klinických testů, či je uveden stav jejich registrace. Kvalitní literární odkazy jsou uvedeny na konci ka-

pitol. Kniha je vybavena dobrým rejstříkem.

Kvalitní příručku lze doporučit všem, kterých se dotýká, počínaje medicínou chemikům, farmakologům i lékařům.

Pavel Drašar



Gerda Horneck and Petra Rettberg (ed.): Complete Course in Astrobiology

Vydal Wiley-VCH, Weinheim
2007.
ISBN 978-3-527-40660-9

Kniha je prezentována jako učebnice úvodního kurzu astrobiologie, určeného pro studenty magisterského a doktorandského studia i jejich učitele. Jedná se o relativně novou oblast výzkumu zasahující do několika klasických vědních odvětví a editorky tudíž předpokládají, že se kniha jako pomůcka může uplatnit při studiu oborů jako např. fyzika, astronomie či biologie. Stručně lze konstatovat, že vědním cílem astrobiologie je hledání odpovědi na otázky o původu života, o možnostech jiných forem života ve vesmíru či o budoucím vývoji života na Zemi. Astrobiologie je vědním oborem hraničním, protože odpověď na tyto otázky musí hledat společně badatelé z oblasti astrofyziky, molekulární biologie, chemie, planetologie, ekologie a řady dalších odvětví. Tento multidisciplinární charakter dané vědní oblasti, který není schopna absorbovat jednotlivá univerzita, se nutně odráží i v pojetí učebnice. Experti sedmi různých evropských univerzit a výzkumných center se zde spojili za účelem přiblížit čtenáři astrobiologii v celé její šíři.

Učebnice je rozvržena do třinácti kapitol o celkem 412 stranách, přičemž jednotlivé kapitoly mají různé autory. Jednotlivým prvkem je fenomén života v kontextu kosmického vývoje. Kniha je z větší části založena na sérii přednášek z disciplín tvořících součást astrobiologie. Tento charakter knihy je podtržen přiloženým CD, které obsahuje powerpointové prezentace pokrývající obsahy jednotlivých kapitol učebnice. Prezentace původně vznikly pro účely internetového kurzu astrobiologie publikovaného na platformě a za podpory Evropské vesmírné agentury (ESA – European Space Agency). Věcný obsah knihy snad nejlépe charakterizují názvy či klíčová slova některých vybraných kapitol:

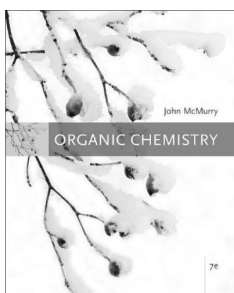
- Od velkého třesku k molekulám živých organismů
- Chemické sloučeniny klíčové pro vznik života
- Od molekul k buněčnému životu
- Fyzikálně-chemické mantinely pro život
- Vesmírné mise pro vzorky
- Planety našeho slárního systému
- Geologie a podmínky pro život na Jupiterově měsíci

Evropa

- Astrobiologické experimenty na vesmírných stanicích atd.

Kniha je bohatě vybavena doprovodnou grafikou. V úvodu každé kapitoly je stručně nastíněn její obsah a vztah k základním otázkám astrobiologie. Charakter učebnice podtrhuje skutečnost, že každá kapitola je kromě odkazu na související knihy, články v časopisech či webovské stránky ukončena též kontrolními otázkami. Učebnice je „čtivá“. S ohledem na záměr vytvořit úvodní kurz k dané problematice pro studenty nejrozličnějších specializací i stupně studia, nejsou jednotlivé partie zatěžovány složitějšími matematickými vztahy ani komplikovanějšími chemickými rovnicemi a nové poznatky jsou vykládány spíše na kvalitativní úrovni a zasazovány do historického rámce vývoje disciplíny. Knihu lze doporučit každému, kdo se zajímá o fascinující problematiku vývoje života.

Pavel Chuchvalec



John E. McMurry:
Organic Chemistry

Thomson Brooks/Cole, 2008, 2007, 7. vydání, 1376 stran. Amazon \$135.

ISBN: non-US 0-495-11628-9, US 0-495-11258-5.

John McMurry z Cornellovy univerzity opět předvedl brilantní variaci na dané téma. Považuji za užitečnější knížku vždy dopracovat, než ji tisknout kolem a kolem se všemi chybami. Klasická organika McMurry přináší dobrou úroveň požadovaných vědomostí z organické chemie spojených s reálným světem, jak je již u McMurryho tradiční. Knižka je čtivá, dobře upravená a graficky na vysoké úrovni vyvedená, její podstatnou součástí jsou problémové úlohy k řešení a celkem představuje cosi, co považuji ve výuce organické chemie za žádoucí. Mohu doporučit knížku každému studentovi, který se chce propracovat k dobré úrovni znalostí a porozumění v organické chemii.

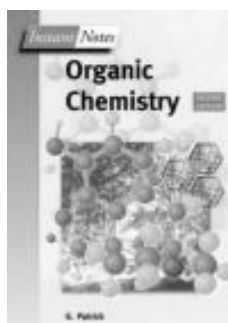
Velmi dobré 3D modely, často se znázorněním rozložení elektronů či nábojů (vypadá to na kuchyň Wavefunction) jsou výtečným nástrojem pro porozumění prostoroového uspořádání reálných molekul, jejich konformaci a konfiguraci. Kniha má velmi potřebné konotace k reálnému životu (zneužitá drogy) a životnímu prostředí (energie a paliva). Též shrnutí za každou kapitolou následované cvičeními a opakovací kapitoly jsou perfektní ukázkou dobrého učitelského přístupu. Naprosto legendárně užitečná je pak část nazvaná Glossary, která představuje malou encyklopedii organické chemie.

Knižka má i stinné aspekty, jak už je v Americe zvykem, ohledy na grafickou reprezentaci stereochemie podle IUPAC nejsou brány vždy v potaz. A to je závažná chyba. V knize se vyskytuje několik způsobů vyjádření configura-

ce, což padá na hlavu zejména technické redakci.

Jinak jde však o vysoce kvalitní učebnici, kterou mohu každému chemikovi doporučit.

Pavel Drasar



Graham Patrick
Instant Notes in Organic Chemistry, Series: Instant Notes

Taylor and Francis, 2. vydání, brožovaná vazba, 357 stran, cena: £19.99.

ISBN-10: 1859962645

Druhé vydání učebnice Instant Notes in Organic Chemistry přináší v kondenzované podobě základy organické chemie v podobě velmi stravitelné knížečky, srovnatelné například s Pacákovými učebnicemi. Koncentruje se výhradně na základy bez jejich rozvíjení do vyčerpávajících detailů či opakujících se příkladů. Na začátku každé kapitoly jsou uvedeny klíčové informace a termíny pro její snazší pochopení. Prvých šest kapitol se soustřeďuje na strukturu sloučenin, vazby, funkční skupiny, stereochemii a základní reakce a teorii jejich mechanismů. Zbytek knížky (10 kapitol) probírá reakce a jejich mechanismy pro sloučeniny s běžnými funkčními skupinami, které jsou důležité pro chemii a biochemii, zabývá se též v jedné sekci spektroskopii a analýzou. Na závěr knížky autor uvádí učebnice pro další studium.

Pro pochopení základů organické chemie v jazyce anglickém je tato knížka milým doplněním knihovny mladého chemika, či odborníka, pro něhož organická chemie není hlavním oborem zájmu.

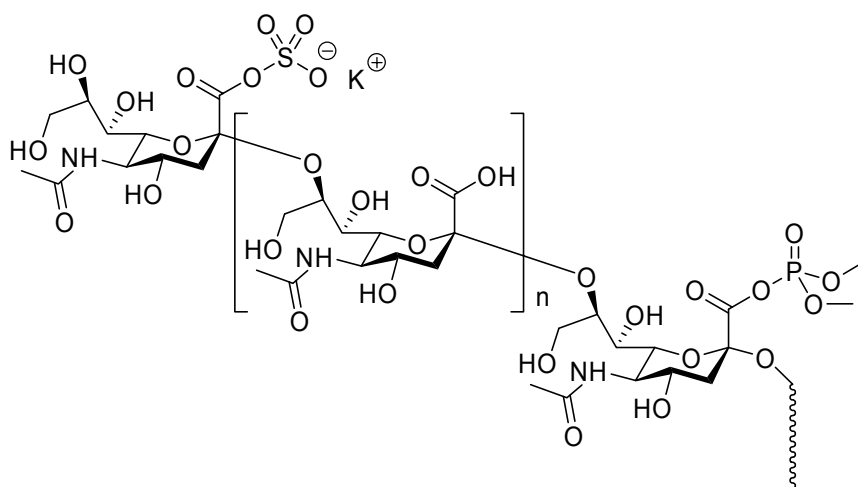
Pavel Drašar

Ústav chemie a technologie
sacharidů VŠCHT Praha



Ústav živočišné fyziologie
a genetiky AV ČR

Česká společnost chemická



POLYSACHARIDY III:
„ANALÝZA, REAKCE A BIOLOGICKÉ ÚČINKY
POLYSACHARIDŮ A JEJICH DERIVÁTŮ,
INŽENÝRSKÉ ASPEKTY PRODUKCE NA BÁZI POLYSACHARIDŮ“

16. listopadu 2007
Novotného lávka 5, Praha 1

Vážení kolegové,

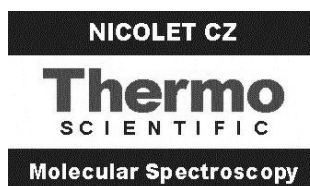
dne 16.11.2007 se koná pod patronátem České společnosti chemické v pořadí již třetí konference Polysacharidy, tentokrát s podtitulem „Analýzy, reakce a biologické účinky polysacharidů a jejich derivátů/ Inženýrské aspekty produkce na bázi polysacharidů“. Tato konference, která se v předchozích letech téměř výhradně zaměřovala na oblast strukturální chemie a analytiky polysacharidů včetně jejich biologických účinků, se tak nově otvírá oblasti cílených chemických reakcí polysacharidů i problematice, která souvisí se zemědělskou a průmyslovou výrobou na bázi polysacharidů. Několik příspěvků v této oblasti je věnováno dnes aktuální výrobě bioethanolu. Nadále je i letos hlavní pozornost v příspěvcích věnována analytice polysacharidů, především analytice škrobu a β -glukanů.

Doufám, že obsah konference zaujme jak vědecké a výzkumné pracovníky, tak i producenty polysacharidů a společnosti, které aplikují polysacharidy v potravinářských, papírenských, farmaceutických nebo kosmetických výrobcích.

Letošní konference se stala konferencí mezinárodní. Autory příspěvků jsou jak odborníci z České republiky, tak i ze Slovenska, Polska a Francie. Nezbyvá než popřát konferenci úspěch a (nejen) zahraničním hostům příjemné zážitky v malebné historické části hlavního města.

Evžen Šárka
člen vědeckého výboru konference

Organizátoři konference si dovoluují uvést na tomto čestném místě firmy a instituce, které pomohly tuto akci uskutečnit.



METHYLAČNÍ ANALÝZA β -GLUKANŮ**JANA ČOPIKOVÁ, BARBORA KASÍKOVÁ,
RADKA HAASOVÁ a ANDRIY SYNYTSYA***Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 PRAHA 6 copikovej@vscht.cz*

Pomocí methylační analýzy^{1,2} byly prokázány vazby charakterizující β -glukany v ječmeni, sladu, houbách a kvasinkách. Poměr vazeb (1→3) (1→4) (1→6) je rozhodující charakteristika gluknanů z různých zdrojů. V β -glukanech izolovaných z ječmene odrůdy *Jersey*, v souladu s literaturou^{3,4}, byly prokázány kombinované vazby (1→3) a (1→4). Zároveň se z poměrů vazeb potvrdilo větší zastoupení vazeb (1→4) ku vazbám (1→3), a to v poměru 4 : 1. V β -glukanech izolovaných z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* nebo hub druhu *Pleurotus ostreatus* bylo ve většině případů prokazatelné větší zastoupení hlavního řetězce, tedy vazeb (1→3), a vazby (1→6) byly potvrzeny v menším zastoupení. Na rozdíl od smíšených a lineárních β -glukanů z ječmene dochází u β -glukanů z hub v místě vazby (1→6) k větvení. Poměr vazeb (1→3) a (1→6) u hub druhu *Pleurotus ostreatus* byl stanoven 1,5, naopak u kvasinek se pohyboval od 8 do 10.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (projekt 525/05/0273).

LITERATURA

1. Ciucanu I.: Anal. Chim. Acta 576, 147 (2006).
2. Ciucanu I., Caprita R.: Anal. Chim. Acta 585, 81 (2007).
3. Buligad G., Brant A.: Carbohydr. Res. 157, 139 (1986).
4. Johansson L.: LWT – Food Sci. Technol., v tisku.
5. Rout D.: Carbohydr. Res. 340, 2533 (2005).

**EXTRAKCIA A ČISTENIE EXTRAKTOV STÉVIE
CUKROVEJ****ALEXANDER DANDÁR a LUCIA MINAROVIČOVÁ**

*Oddelenie potravinárskej technológie Fakulty chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
lucia.minarovicova@stuba.sk*

Steviozidy boli z listov stévie cukrovej extrahované vodnou extrakciou pri troch teplotách 25 °C, 50 °C a 75 °C a extrakciou s 2% CaCO₃. So zvyšujúcou sa teplotou pri extrakcii s vodou dochádzalo k postupnému miernemu zvyšovaniu výťažnosti extrakcie. Najviac steviozidov sa vyextrahovalo v I. stupni extrakcie pri všetkých teplotách pri extrakcii s vodou a rovnako aj pri extrakcii s 2% CaCO₃, pričom v ďalších stupňoch extrakcie sa množstvo

vyextrahovaných steviozidov znižovalo. Podľa výsledkov extrakcií je možné konštatovať, že stačí vykonať trojstupňovú extrakciu, pričom tretí extrakt je možné použiť do prvého stupňa nasledujúcej extrakcie namiesto prídavku vody. Pri stanovení obsahu steviozidov Schoorlovou metódou bolo potrebné brať do úvahy Rf hodnotu extraktov, pričom najlepšie podmienky pre stanovenie boli pri Rf hodnote 1,0. Všetky extrakty s vyššou Rf hodnotou pri titračnom stanovení boli riedené vodou na objem 20 ml a výslednú hodnotu Rf nižšiu ako 2,0. Vyčistené extrakty s nižšou hodnotou absorbancie nebolo potrebné riediť.

Na čistenie extraktov stévie cukrovej bola vybraná kombinácia roztoku FeCl₃ a roztoku Ca(OH)₂ pri troch rôznych hodnotách pH (9,0; 10,0 a 11,0) a rôznych Rf hodnotách (1–6 %). Najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri pH 9,0, pretože pri vyšších hodnotách pH boli vyššie straty steviozidov, čo je nežiaduce. So zvyšujúcim sa prídavkom FeCl₃ a Ca(OH)₂ a zároveň aj so zvyšujúcou sa Rf hodnotou dochádzalo k zvyšovaniu strát steviozidov. Najoptimálnejšie podmienky pre čistenie extraktov stévie cukrovej boli dosiahnuté pri nižších prídavkoch FeCl₃ a Ca(OH)₂, pretože nedochádzalo k príliš vysokým stratám steviozidov, aj keď hodnota absorbancie bola vyššia. Pri vyšších prídavkoch FeCl₃ a Ca(OH)₂ bola hodnota absorbancie nízka, ale straty steviozidov boli vyššie. Vzniknuté straty steviozidov sa však dali znížiť následným premývaním filtrov, pričom sa však do systému vnášala voda. Prípadne by bolo možné II. filtráty z premývania filtrov použiť do niektorého stupňa extrakcie namiesto prídavku vody. Čo sa týka Rf hodnoty, výhodnejšie bolo pracovať pri vyšších resp. stredných Rf hodnotách, pretože pri nižších Rf hodnotách je v systéme viac vody, čím by sa zvýšili náklady na odparovanie. Príliš vysoké Rf hodnoty taktiež neboli príliš vhodné, pretože sa musel zvýšiť prídavok FeCl₃ a Ca(OH)₂, čím zároveň dochádzalo aj ku zvýšeniu strát steviozidov.

**REZISTENTNÍ ŠKROB VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA
A JEHO OBSAH V TĚSTOVINÁCH****JANA DOSTÁLOVÁ^a, PAVEL KADLEC^b
a EVA PLUHÁČKOVÁ^a**

*^a Ústav chemie a analýzy potravin, ^b Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
jana.dostalova@vscht.cz ; www.vscht.cz*

Za rezistentní škroby jsou považovány frakce, štěpné produkty a modifikace přirozených škrobů, které nejsou tráveny v tenkém střevě člověka. Mohou však být částečně fermentovány mikroflórou tlustého střeva. Epidemiologické studie prokázaly, že zvýšená konzumace rezistentních škrobů je spojena se snížením výskytu neinfekčních střevních onemocnění, včetně rakoviny tlustého střeva. Rezistentní škrob také snižuje postprandiální hladinu glukosy v krevní plasmě. Zvýšená konzumace rezistentního škrobu

je proto žádoucí. Na druhé straně při fermentaci vznikající plyny způsobují trávicí potíže.

Byl stanoven obsah rezistentního škrobu a sledovány jeho změny v 10 vzorcích různých druhů těstovin (špagety bezvaječné, vaječné a semolinové od tří českých výrobců a z dovozu) během vaření a skladování za různých teplot. Rezistentní škrob byl stanoven enzymovou metodou za použití enzymového setu firmy Megazyme International Ireland, Ltd. Co. Mezi jednotlivými druhy těstovin nebyly zjištěny rozdíly v obsahu rezistentního škrobu. Po uvaření těstovin vzrostl obsah rezistentního škrobu přibližně desetkrát. Během skladování těstovin po dobu 4 h při teplotě 65 °C došlo u většiny vzorků ke zvýšení jeho obsahu, při skladování po dobu 28 h při teplotě 4 °C se obsah rezistentního škrobu většinou snížil na hodnotu nižší než po uvaření.

VLIV ODRŮDY, TECHNOLOGIE PĚSTOVÁNÍ A LOKALITY NA PRODUKCI ŠKROBU A BIOETHANOLU U VYBRANÝCH ODRŮD PŠENICE SETÉ

VÁCLAV DVOŘÁČEK^a, TIBOR SEDLÁČEK^b
a PAVEL RŮŽEK^a

^a Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i, oddělení Genové banky, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, ^b Šlechtitelská stanice Stupice, Selgen a.s. Stupice 24, 250 84 Sibřina
dvoracek@vurv.cz

Tato studie je zaměřena na nepotravinářské využití pšenice s důrazem pro produkci škrobu a bioethanolu. Po prvním roce řešení, do kterého bylo zařazeno sedm odrůd pšenice seté (Baroko, Biscay, Cubus, Floret, Ilias, Merri-to, Rhea) pěstovaných při dvou různých technologiích (minimální resp. konvenční zpracování půdy), dvou intenzitách výživy a ošetření a dvou lokalitách (Ruzyně a Chrástany), byla zjištěna významná závislost produkce bioethanolu na lokalitě, odrůdě i technologii pěstování.

Nižší vstupy (hnojení, ošetřování) s konvenčním zpracováním půdy vedly na obou lokalitách k vyššímu podílu obsahu škrobu v zrně a tím vyšší výtěžnosti bioethanolu na hmotnostní jednotku zrna. Navzdory nižší efektivitě výtěžnosti škrobu a bioethanolu při zvýšené úrovni hnojení i ošetření porostů došlo při tomto způsobu pěstování k průkaznému zvýšení výnosu zrna, což se v souhrnu projevilo ve vyšším zisku škrobu (o cca 0,4 t ha⁻¹) resp. bioethanolu (o cca 150 l ha⁻¹) z hektaru pěstitelské plochy. Rovněž byla prokázána středně silná pozitivní korelace (0,51) mezi nárůstem obsahu škrobu a celkovou výtěžností bioethanolu. Z testovaných odrůd vykázaly především na lokalitě Ruzyně vysoký výnos škrobu (cca 6,5 t ha⁻¹) resp. bioethanolu (přes 4000 l ha⁻¹) odrůdy Biscay, Cubus a Floret.

Práce vznikla za podpory projektu NAZV č. 1G58076.

MOŽNOSTI A KVALITA DETEKCE OBSAHU CELKOVÉHO ŠKROBU V ZRNU OZIMÉ PŠENICE

VÁCLAV DVOŘÁČEK^a, LUDMILA PAPOUŠKOVÁ^a
a OLDŘICH FAMĚRA^b

^a Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i, oddělení Genové banky, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, ^b ČZU Praha, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchbátka
dvoracek@vurv.cz

V souvislosti s deklarovaným programem vlády na výrobu bioethanolu a jeho přidáváním do pohonných hmot na úroveň 5,75 % v roce 2010 dle závazné celoevropské směrnice 2003/30/EC, bude přesná a spolehlivá detekce škrobu klíčovým faktorem ocenění suroviny pro zemědělství a pro lihovary významným predikčním faktorem výtěžnosti bioethanolu. Oceňování resp. srážky a bonifikace při výkupu obilovin pro produkci biolihu jsou smluvně realizovány na základě obsahu škrobu resp. jeho změn v sušině zrna a to obecně na úrovni plus/mínus 1 % (v některých případech i níže) od požadovaného obsahu.

Z přímých referenčních stanovení obsahu celkového škrobu jsou v ČR normovány dvě metody: 1) Stanovení škrobu polarimetricky ČSN 467092/21 (1986) resp. ČSN 56 0512-16 (1995) a 2) Enzymatické stanovení škrobu ČSN EN ISO 15914 (2005). Nepřímé metody reprezentuje možnost predikce škrobů pomocí blízké infračervené spektroskopie.

Soubor 32 v ČR registrovaných odrůd pšenice ozimé byl standardně homogenizován a podroben třem odlišným analýzám detekce obsahu celkového škrobu v zrně zahrnující výše zmíněnou polarimetrickou, enzymatickou (dle AACC 76.13) i nepřímou spektroskopickou metodu měření. V případě Ewersovy metody byly vzorky hodnoceny nezávisle na dvou laboratorních pracovištích (privátní akreditované pracoviště a ČZU Praha), v případě spektroskopické metody byly využity ve VÚRV v.v.i. dva typy přístrojů: monochromátorový NIRS 6500 a přístroj s Fourierovou transformací Antaris II se vzájemně obdobným rozsahem kalibračních dat (300 vzorků) i deklarované kvality predikce (korelační koeficient = 0,84–0,92, chyba predikce (SEC) = 0,7–0,8 %).

Obsah škrobů detegovaných v zrně testovaných pšenic kolísal dle metody v rozsazích 63–66 % resp. 59–68 %. Při srovnání průměrných hodnot a rozptylu obsahu škrobu celého souboru byly zjištěny statisticky významné rozdíly v detekci mezi oběma typy spektroskopů i oběma pracovišti hodnotící vzorky standardně používanou polarimetrickou metodou. Nejnižší průměr obsahu škrobu celého souboru byl zaznamenán v akreditované privátní laboratoři (63,9 %), naopak nejvyšší průměr obsahu škrobu testovaného souboru byl zjištěn na spektroskopu NIRS 6500 (65,2 %). Problematičnost přesného stanovení celkového škrobu polarimetrickou metodou naznačují i pouze středně silné korelační koeficienty mezi oběma pracovišti (ČZU-Praha a privátním subjektem).

Neutrálne lze v tomto kontextu hodnotit enzymatickou metodu, jejíž celkový průměr ležel mezi zjištěnými hodnotami obou polarimetrických měření, s nimiž byl i středně silně korelován. Nejvyšší hodnota rozptylu obsahu škrobu v rámci souboru u enzymatického stanovení lze vysvětlit extrémně nízkou potřebou navážky (0,1 g) a homogenizace vzorku tak bude jedním ze zásadních pilířů precizního stanovení. Spektroskopická měření měla tendenci vzorky tzv. zprůměrovávat a hodnoty celkového rozptylu (variability) obsahu škrobu v souboru byly významně nižší ve srovnání s přímým stanovením. Při využívání těchto rychlých screeningových metod tak bude důležitý velký počet kalibračních dat s vyváženou distribucí sledovaného znaku. V případě oceňování obilovin dle obsahu škrobu by bylo spíše vhodnější volit méně striktní stupnice s možností cenové regulace při min. 2% změně obsahu škrobu od smluvně vázané úrovně.

Práce vznikla za podpory projektu NAZV č. 1G58076.

OBSAH (1→3)(1→4)-β-D-GLUKÁNU V ZRNE REGISTROVANÝCH ODRŮD OVSA SIATEHO A JEHO KORELÁCIA S VYBRANÝMI KVALITATÍVNÝMI PARAMETRAMI

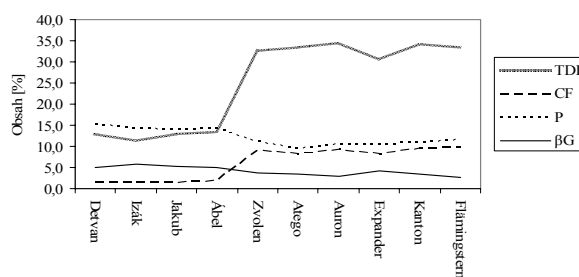
MICHAELA HAVRENTOVÁ^a, MAGDALÉNA BELIKOVÁ^a a JÁN KRAIC^{a,b}

^a Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, ^b Katedra biotechnológií, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Nám. J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovenská republika
havrentova@vurv.sk

Chemické zložky zrna (napr. bielkoviny, lipidy, vlákna) sú predmetom mnohých štúdií. (1→3)(1→4)-β-D-glukán (ďalej len β-D-glukán) predstavuje, spolu s arabinoxylánom, najvýznamnejší neškrobový polysacharid semien obilnín. Obsah β-D-glukánu, lokalizovaného predovšetkým v bunkových stenách endospermu, je ovplyvnený genotypom a prostredím. Štúdiu a fyziologickým účinkom ovseného β-D-glukánu sa v posledných rokoch venuje pozornosť, keďže redukuje napríklad hladinu cholesterolu a glukózy v krvnom sére a má antikarcinogénne vlastnosti.

S cieľom poznať variabilitu v obsahu β-D-glukánu a vzťahy medzi vybranými kvalitatívnymi parametrami v zrne ovsa siateho sa v 10 odrodách, registrovaných na Slovensku (Ábel, Atego, Auron, Detvan, Expander, Flamingstern, Izák, Jakub, Kanton, Zvolen), pestovaných počas 3 rokov v jednej lokalite, sledoval obsah β-D-glukánu (βG), celkovej potravinovej vlákniny (TDF), hrubej vlákniny (CF) a bielkovín (P).

Pozorovali sme vysokú variabilitu v priemernom obsahu jednotlivých zložiek medzi odrodami ovsa (obr. 1).



Obr. 1. Priemerný obsah sledovaných zložiek analyzovaných odrôd ovsa počas troch rokov

Tabuľka I
Vzájomné korelácie medzi jednotlivými zložkami zrna.

	TDF	CF	P	βG
TDF				
CF	0,994 ⁺⁺⁺			
P	-0,943 ⁺⁺⁺	-0,914 ⁺⁺⁺		
βG	-0,943 ⁺⁺⁺	-0,944 ⁺⁺⁺	0,814 ⁺⁺	

⁺⁺⁺P < 0,001; ⁺⁺P < 0,005

Plevnaté odrody ovsa sa od nahých (Ábel, Detvan, Izák, Jakub) výrazne odlišujú vyšším obsahom TDF a CF, naopak nahé vyšším obsahom β-D-glukánu a bielkovín. Najvyšší priemerný obsah (5,7 %) i najvyšší obsah β-D-glukánu v jednotlivých rokoch mal ovos Izák (v roku 2003 až 6 %). Najnižší priemerný obsah β-D-glukánu mala odroda Flamingstern (2,7 %). Pozorovali sme tiež štatisticky vysoko významné pozitívne, resp. negatívne korelácie medzi jednotlivými analyzovanými zložkami (tab. I). Obsah β-D-glukánu negatívne koreluje s obsahom vlákniny a pozitívne s obsahom bielkovín.

Práca bola vykonaná v rámci úlohy MP SR č. 2006 UO 27/091 05 01/091 05 11. Ďakujeme Ing. Petrovi Hozlárovi, Ph.D. a Ing. Daniele Dvončovej za poskytnutie vzoriek rastlinného materiálu.

PŠENICA AKO SUROVINA PRE PRODUKCIU PALIVOVÉHO ETANOLU

VIERA HORVÁTHOVÁ^a, DANIELA MIKULÍKOVÁ^b a JANA LENGHARTOVÁ^a

^a Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, ^b Výskumný ústav rastlinnej výroby SCPV, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika
viera.horvathova@ucm.sk

Pšenica (*Triticum aestivum* L.) je jednou z najvý-

znamnejších plodín s celkovou produkciou asi 600 miliónov ton ročne. Odhaduje sa, že požiadavky na jej produkciu sa do roku 2020 zvýšia o 40 % (cit.^{1,2}). Vďaka pomerne vysokému obsahu škrobu sa pšenici venuje vysoká pozornosť aj v súvislosti s možnosťou jej využitia na výrobu palivového etanolu. Na druhej strane obsah fruktánov v pšeničnom zrne (1–4 %) ju radí k zaujímavým prírodným zdrojom na prípravu funkčných potravín³. V tejto súvislosti sa ponúka logická úvaha izolácie týchto látok pred spracovaním zrna na palivový etanol, čím by došlo k jeho maximálnemu využitiu.

Cieľom práce bolo uskutočniť etanolovú fermentáciu vybratých pšeničných odrôd (Ilias a Petrana – potravinárske odrody, Malvína, Mladka, Pavla, Veldava, Venistar – nepotravinárske odrody) kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* CCY-11-3. Vzorky pšenice boli dopestované v marginálnej oblasti Slovenska (Vigľaš-Pstruša) a boli vo forme šrotu. V sušine zošrotovaného zrna obsahovali 64 až 70 % škrobu. Keďže testované vzorky pšeníc sú kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* neskvasiteľné, pred fermentáciou je potrebné ich upraviť enzýmovou hydrolyzou. Najvýhodnejšie je používať komerčne vyrábané enzýmové prípravky, pretože tieto sú pripravované s ohľadom na špecifikácie konkrétnej technológie⁴. Východiskové suspenzie testovaných pšeničných odrôd (obsah škrobu v suspenziách bol 20 % w/v) boli pripravené z neupraveného šrotu resp. zo šrotu s oddelenými otrubami, pričom sme predpokladali, že ich eliminácia by mohla mať kladný vplyv na priebeh procesov hydrolyzy resp. fermentácie. Pripravené enzýmové hydrolyzáty mali dextrózový ekvivalent v rozmedzí 87–92 %. Pre porovnanie sme vzorky spracovali aj procesom simultánnej sacharifikácie a fermentácie (SSF), v priebehu ktorého sme tiež sledovali vplyv oddelenia otrúb zo šrotu pred stekutím pšeničných supenzií ako aj vplyv oddelenia tuhého podielu pred SSF. Najvyššiu priemernú hodnotu koncentrácie etanolu (12,1±0,4 %) a najvyššie hodnoty stupňov konverzie glukózy na etanol sme zaznamenali u hydrolyzáto v s oddeleným tuhým podielom pred fermentáciou, kedy došlo k zvýšeniu koncentrácie etanolu v priemere o 1–2 % a zvýšeniu hodnoty stupňa konverzie glukózy na etanol o 7–12 %. Z testovaných odrôd pšenice sa ako perspektívne pre produkciu etanolu javia odrody Petrana, Pavlína a Veldava, pričom pre dosiahnutie vyššej koncentrácie etanolu je vhodné použiť simultánne scukrovanie s fermentáciou a po fáze predscukrenia oddeliť tuhý podiel.

LITERATÚRA

1. Bagge M., Xia X., Lubberstedt T.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 211 (2007).
2. Rajaram S.: *Turkish J. Agriculture Forestry* 29, 105 (2005).
3. Merendino N., Daquino M., Molinari R., Gara L. D., Degidio M. G., Paradiso A., Cecchini C., Corradini C., Tomassi G.: *J. Cereal Sci.* 43, 129 (2006).
4. Horváthová V., Šturdík E., Janeček Š.: *Bulletin potravinárskeho výskumu* 40, 1 (2001).

ANTIOXIDANT ACTIVE POLYSACCHARIDES FROM PLANTS

Z. HROMÁDKOVÁ, A. EBRINGEROVÁ,
Z. KOŠTÁLOVÁ, and J. HIRSCH

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia
chemhrom@savba.sk

Plant antioxidants include a variety of structural types with a wide range of antioxidant activity. Phenolic acids are common antioxidants, ubiquitous in fruits, vegetables, legumes and grains. They exist primarily as substituted benzoic and cinnamic acid compounds¹. Flavonoids are more concentrated in fruits and vegetables, but are also found in grains. They number in the thousands and have a basic three-ring structure in common, but activity varies greatly dependent primarily on number and location of hydroxyl groups². Typically, phenolic acids and flavonoids are water soluble compounds, but lipid soluble derivatives are common to grains such as the caffeic and ferulic acid esters of C_{20–28} chain mono and dialcohols^{3,4}, which could function to protect lipid membranes and spare vitamin E. These esters are equal to tocopherols as antioxidants that prevent lipid oxidation. In addition to soluble antioxidants, a significant amount of grain phenolics are covalently bound to cell wall polysaccharides^{3,5} and may be important to human health in this form via digestive processes. A recent study⁶ showed that both high molecular weight (> 3500) and low molecular weight (< 3000) aqueous extracts of grain had significant antioxidant activity. The antioxidant activity of cereals, on average, is 2 to 3 times higher than fruits, 2.5 to 6 times higher than vegetables and about 0.75 times that of berries⁷.

Herein, we review representative examples of our recent research on antioxidant active polysaccharides isolated from some cereals and other plants. Presented will be the xylan-phenolic complexes from wheat bran and the seed coat of buckwheat. Polysaccharides from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*)⁸, a pseudocereal for present-day healthy food products, and from wheat bran were isolated with and without application of ultrasound. The total content of phenolics was determined by the Folin–Ciocalteu method⁹. The antioxidant activity of the samples was determined by a simple method using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, a stable free radical, as detection agent¹⁰ and as the inhibitory effect of the tested samples on lipid peroxidation of egg lecithin *in vitro*.

This work was financially supported by the Slovak Grant Agency VEGA (2/6131/26) and the Agency for Support of Science and Research (COST-0036-06).

REFERENCES

1. Croft K. D. In Basu T. K., Temple N. J., Garg M. L. (ed.), in: *Antioxidants in Human Health and Disease*. p. 112–115. CABI, New York 1999.

- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G.: *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933 (1996).
- Collins F. W., Webster F. (ed.), in: *Oats: Chemistry and Technology*. pp 227–296. Am. Assoc. Cereal Chem., St Paul 1986.
- Daniels D. G. H., Martin H. F.: *J. Sci. Food Agric.* 18, 589 (1967).
- McKeehen J. D., Busch R. H., Fulcher R. G.: *J. Agric. Food Chem.* 47, 1476 (1999).
- Baublis A., Decker E. A., Clydesdale F. M.: *Food Chem.* 68, 1 (2000).
- Miller H. E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., Kanter M.: *J. Am. College Nutr.* 19, 3, 312S–319S (2000).
- Hromádková Z., Ebringerová A., Hirsch J.: *Chem. Pap.* 59, 223 (2005).
- Rao R. S. P., Muralikrishna G.: *Phytochemistry* 67, 91 (2006).
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D. H.: *J. Food Comp. Anal.* 19, 669 (2006).
- Klein R. A.: *Biochem. Biophys. Acta* 210, 486 (1970).

PELETIZOVANÉ ROSTLINNÉ ODPADY – PERSPEKTIVNÍ SUROVINA K PŘÍPRAVĚ SUBSTRÁTŮ PRO PĚSTOVÁNÍ LÉČIVÝCH DŘEVOKAZNÝCH HUB

IVAN JABLONSKÝ^a PRAHA, ZDENĚK BLAŽEK^b

^a VALMYC, s.r.o., Dolecká 160, 55101 Jaroměř
i.jablonsky@seznam.cz

Hledají se jednoduché metody přípravy substrátů nevyžadující nákladnou přípravu pro experimentální i produkční pěstování dřevokazných hub. Při pěstování plodnic pro účely analýz gluknanů v léčivých houbách byly v té souvislosti ověřeny energetické pelety z různých druhů slámy (pšenice, řepka, ščovík, kukuřice a sója).

V průběhu pokusů byl porovnáván vliv přísadků různého množství vody na růst mycelia a výnos plodnic. Ověřovala se teplota máčecí vody, která může ovlivnit výskyt kontaminace substrátu plísněmi. Ukázalo se, že většina ověřovaných surovin je pro pěstování dřevokazných hub vhodná za předpokladu, že surovina před peletováním byla skladována v suchu a nebyla napadena plísněmi. Různá vlhkost substrátu (67, 69, 70, 72 a 75 %) neovlivnila rychlost přírůstků mycelia *Pleurotus ostreatus*. Výnos plodnic se ale s vlhkostí substrátu zvyšoval. Biologická účinnost substrátu při obsahu vody 69 % byla 116,2 %, při vlhkosti 72 % se zvýšila na 139,7 % a při obsahu vody 75 % dosáhla 189,7 %. Přírůstky mycelia hlívy byly nejvyšší na peletách ščovíku. Následovaly přírůstky na peletách ze slámy sóje, řepky a pšenice.

Při ověřování teploty vody byly porovnávány varianty o teplotě máčecí vody 60, 70, 80 a 90 °C. Ukázalo se, že teplota vody neovlivnila přírůstky mycelia ani výnos plodnic pěstovaných na substrátech obohacených vodou o různé teplotě. Na peletách se vedle hlívy ústřední (*Pleurotus ostreatus*) daly pěstovat i houby hlíva máčková (*Pleurotus eryngii*), šupinovka nameko (*Pholiota nameko*) a šiitake (*Lentinula edodes*).

Výzkum probíhal za podpory Grantové agentury ČR (projekt 525/05/0273).

STANOVENÍ OBSAHU ŠKROBU V SEMENECH OBILOVIN A LUŠTĚNIN, OŠETŘENÝCH POSTŘÍKEM 24-EPIBRASSINOLIDU

PAVEL KADLEC^a, EVA GOTVALDOVÁ^a
a LADISLAV BLÁHA^b

^a Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^b Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně
pavel.kadlec@vscht.cz, www.vscht.cz, blaha@vurv.cz

Práce je součástí výzkumu, jehož cílem bylo sledovat vliv postřiku 24-epibrassinolidu na obsah celkového škrobu, poškozeného škrobu a rezistentního škrobu v semenech rostlin pěstovaných v polních podmínkách a ve fytozonu ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby Praha 6 – Ruzyně. Analyzována byla semena tří odrůd jarní pšenice (AC Helena, Mollera a Lucia), tří odrůd ozimé pšenice (Estica, Samanta, Ebi), fazolu, pohanky a slézu krmného.

Cílem této práce je porovnání a vyhodnocení jednotlivých metod stanovení škrobu.

Na základě jednovýběrového t-testu o střední hodnotě na hladině významnosti 10 % lze konstatovat, že enzymové metody na stanovení rezistentního a poškozeného škrobu a Ewersova metoda na stanovení škrobu jsou spolehlivé, zatímco enzymová metoda na stanovení celkového škrobu může výsledky zkreslovat. Obsah celkového škrobu se stanovoval třemi různými metodami. Naměřené hodnoty celkového škrobu byly statisticky vyhodnoceny pomocí párového t-testu rovnosti středních hodnot dvou náhodných veličin. Výsledkem testu (na hladině významnosti 5 %) bylo zjištění, že metody nedávají srovnatelné výsledky. Hodnoty škrobu stanoveného enzymovou metodou na celkový škrob byly ve většině případů nejnižší, naopak hodnoty škrobu získané Ewersovou metodou byly nejvyšší. Nejvíce podobné hodnoty dávala enzymová metoda na stanovení rezistentního škrobu a Ewersova metoda. Nejvíce se lišily výsledky získané enzymovou metodou na stanovení celkového škrobu a metodou podle Ewera.

IZOLACE VITAMINU C Z PEKTINOVÉ MATRICE JABLEK A JEHO STANOVENÍ METODOU HPLC**DANIELA KRAMÁŘOVÁ, OTAKAR ROP,
STANISLAV KRÁČMAR a IGNÁC HOZA***Ústav potravinářského inženýrství, Fakulta technologická,
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, náměstí T.G. Masaryka
275, 762 72 Zlín
kramarova@ft.utb.cz*

Jabloň (latinsky *Malus*) je opadavý strom, dvouděložná rostlina z čeledi růžovitých. Bez ohledu na symbolický význam jablka se staly plody jabloní důležitou součástí našeho jídelníčku. Zdaleka nejde jen o mošty a džusy, džemy, kompoty, čaje, aroma do jiných jídel. Jablka mají také zdravotní význam – obsahují celou řadu látek prospěšných organismu, zvyšují imunitu, mají vliv na odolnost vůči stresu – v populární literatuře a časopisech se opakuje často doporučení konzumovat nejméně jedno jablko denně. Toto ovoce obsahuje vlákninu, která pomáhá pohybu potravy trávicí soustavou a vstřebává vodu. V zásadě se doporučuje alespoň 20–35 g vlákniny denně pro dospělého člověka v závislosti na příjmu energie (např. 8400 kJ strava by měla zahrnout 25 g vlákniny). V matrici jablek převládá vláknina označovaná jako pektin. Ten je tvořen lineárním polymerem 25 až 100 jednotek D-galaktouronové kyseliny, který může tvořit v oxyseleném prostředí rosoly. Jednotky kyseliny D-galaktouronové jsou vázány $\alpha(1\rightarrow4)$ -glykosidovými vazbami a jsou do určitého stupně esterifikovány methanolem. Celý lineární polymerní řetězec bývá ukončen molekulou L-rhamnosy, v minoritních bočních větveních se váží např. L-arabiosa nebo D-glukosa. Tak jako mnoho ostatních druhů ovoce a zeleniny, obsahují jablka vitamin C. Tento redoxní systém kyseliny L-askorbové a L-dehydroaskorbové chrání do jisté míry náš organismus před rakovinou, volnými radikály a napomáhá snižovat hladinu cholesterolu v krvi.

Vzhledem k významu ovocnářství na území Valašska byly provedeny pilotní studie krajových odrůd jablek. Celkem bylo testováno 16 vzorků valašských odrůd jablek, u nichž byl zjišťován metodou HPLC-ECD. Standardní roztoky vitamínu C byly připraveny rozpuštěním v mobilní fázi a to v kalibrační řadě 1–4 $\mu\text{l ml}^{-1}$. Každý bod kalibrační křivky byl proměřen třikrát a kalibrační křivka byla sestavena jako závislost plochy píku na koncentraci kyseliny L-askorbové. Samozřejmě, všechny koncentrace standardních roztoků i vzorky byly uchovávány v temnu z důvodu nestability kyseliny L-askorbové při denním světle.

Z důvodu složitější matrice vzorku předcházelo vlastní izolaci vitamínu C vysrážení a odstranění pektinu. Vzorky jablek byly rozemlety a rozdrceny v mobilní fázi a předfiltrány přes filtrační papír. Poté byly vysráženy polysacharidy roztoky Carez I a Carez II. Po filtraci vorku byl tento naředěn a před nástřikem na kolonu předfiltrován přes PTFE filtr o velikosti 0,45 μm . Chromatografické podmínky byly následující: mobilní fáze $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{O}$ =

99:0,5:0,5, izokratická eluce, kolona Supelcosil LC-8, 5 μm , [4,6 \times 150 mm], průtok 1,1 ml min^{-1} , teplota 30 $^\circ\text{C}$.

Závěrem lze konstatovat, že ve všech odrůdách jablek pěstovaných na Valašsku bylo naměřeno vyšší množství vitamínu C než v odrůdách dovozových, zakoupených v supermarketech, a to o 2–3 mg na 100 g. Jako příklad lze uvést množství vitamínu C v těchto vybraných odrůdách: Hvězdnatá reneta 3,14; Malinové holovouské 3,57; Gaskoňské šarlatové 4,28 a Rubín 3,97 mg na 100 g.

LITERATURA

1. Hernández Y., Lobo M. G., González M.: *Food Chem.* 96, 654 (2006).
2. Arrigoni O., De Tullio M. C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1569, 1 (2002).
3. Furusawa N.: *Food Control* 12, 27, (2001).

PRODUKCIA ETANOLU Z PŠENIČNÉHO ŠROTU PROCESOM SIMULTÁNNEHO SCUKROVANIA A FERMENTÁCIE**KATARÍNA LACHKÁ^a, VIERA HORVÁTHOVÁ^b
a DANIELA MIKULÍKOVÁ^c**

^a *Polychem s.r.o., Poľnohospodárov 4, 971 01 Prievidza,*
^b *Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava,*
^c *Výskumný ústav rastlinnej výroby SCPV, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika
lachka@polychem.sk*

Palivový etanol je v súčasnosti významnou komoditou vzhľadom na celosvetový rozmach automobilizmu (a dopravy vo všeobecnosti) a zásoby resp. ceny ropy na svetových trhoch. Otvárajú sa nové možnosti nepotravinárskeho využitia tradičných obilnín a tiež pestovania nových odrôd pre produkciu špecifických rastlinných surovín. Vhodnou surovinou pre technické účely je aj pšenica, ktorú je možné pestovať v marginálnych oblastiach¹. Najdôležitejším kvalitatívnym ukazovateľom pšenice použiteľnej na produkciu etanolu je obsah škrobu, ktorý by mal byť minimálne 65 %.

Cieľom práce bolo uskutočniť simultánne scukrovanie a fermentáciu pšeničných substrátov použitím liehovarnického kmeňa kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* CCY-11-3 alebo pekárskoho droždia. Produkty scukrovania sú v procese simultánne utilizované kvasinkami a premieňané na etanol². Použitými substrátmi boli nepotravinárske (Malyska, Markola, Pavlína) a potravinárske (Cubus, Barroko, Petrana) odrody pšenice. V rámci experimentov sme sledovali vplyv obsahu a zloženia škrobu, autoamylolytickej aktivity a vplyv použitých kvasiniek na efektivitu procesu simultánneho scukrovania a fermentácie.

Zistili sme, že nepotravinárske odrody pšenice disponujú vyššou α -amylázovou aktivitou, odroda Pavlína obsahuje najviac škrobu v sušine zrna (70 %) a odroda Markola

má v škrobe najvyšší obsah amylopektínu. Od podielu amyloza/amylopektín závisia fyzikálno-chemické vlastnosti škrobu (najmä rozpustnosť a schopnosť retrogradácie, mazovatenia a hydrolýzy). Vyšší podiel amylopektínu uľahčuje proces hydrolýzy a vzniku monosacharidov pre fermentáciu³. Procesom simultánneho scukrovania a fermentácie stekutených pšeničných substrátov (počiatočný obsah škrobu 150 g l⁻¹) sme zaznamenali 75–89% konverzie glukózy na etanol a takmer úplné spotreby glukózy vo fermentačnom médiu. Vyššie hodnoty konverzie glukózy na etanol boli dosiahnuté použitím pekárskoho droždia. Z testovaných substrátov sú pre produkciu etanolu vhodnými odrodami Malyska, Markola a Baroko.

LITERATÚRA

1. Lachká K., Horváthová V., Šturdík, E.: *Nova Biotechnologica VI-I*, 79 (2006).
2. Kroumov A. D., Módenes A. N., Araujo Tait M. C.: *Biochem. Eng. J.* 28, 243 (2006).
3. Frigård T., Andersson R., Åman P.: *Carbohydr. Polym.* 47, 169 (2002).

EFFECTS OF GALACTOGLUCOMANNAN-DERIVED OLIGOSACCHARIDES ON THE PLANT DEVELOPMENT AND DEFENSE RESPONSE

Hlavní přednáška

D. LIŠKOVÁ, A. KÁKOŠOVÁ, K. KOLLÁROVÁ, E. SLOVÁKOVÁ^a, P. CAPEK, and D. KÁKONIOVÁ

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia, ^aDepartment of Plant Physiology, Comenius University in Bratislava, Bratislava, Slovakia chemlisk@savba.sk

Mannan-based polysaccharides in the plant cell wall may have a role analogous to that of xyloglucan, responsible for the flexibility and on the other hand forming growth-restraining networks with cellulose¹. Two of these polysaccharides, glucomannan and galactoglucomannan, are found throughout the plant kingdom as hemicellulose components of primary and secondary cell walls². They are characterized by a β -(1→4)-mannose backbone that may be interspersed with glucose residues. Included in this family are also galactomannan and mannan. Like xyloglucan, glucomannan and galactoglucomannan (GGM), drastically reduce the crystallinity of cellulose microfibrils in composite materials³ affecting their flexibility⁴. This possibly occurs also *in planta*, as at high water pressure glucomannan coats cellulose microfibrils in differentiating tracheids⁵. It was shown that glucomannan is able to form cross-links with cellulose, therefore the xyloglucan may not be the only polysaccharide that cross-links cellulose³. Also GGM is likely to contribute to the network with cellulose despite its lower molecular weight⁶ compared to glucomannan. However, this functional characteristic of GGM may not be the only one. GGM derived oligosaccha-

rides (GGMOs) were revealed to possess biological activity in various life processes in plants. Besides non-specific resistance to local viral infection in plants, where GGMOs act as inhibitors of the virus infection⁷ these oligosaccharides are involved in growth^{8–10} and developmental processes of plant cells^{11,12}. The action of GGMOs is connected with the activity of plant growth hormones – auxins, gibberellins, etc. However, their highest efficiency is at concentrations 10 to 100 times lower than that of growth hormones, and it is not correlated with their increasing concentration. The results from the elongation growth of adventitious roots as of dissected stem segments show this phenomenon, where lower concentrations of GGMOs than 10⁻¹⁰ M (possibly also 10⁻⁸ M), lost their inhibition effect (unpublished results) and higher concentrations than the supraoptimal one were less effective^{8–10}. However, the difference between the inhibition of growth induced by GGMOs in stem segments and in adventitious roots is remarkable mainly thereby that in stem segments GGMOs inhibit their growth in a small range of concentrations, or only in one supraoptimal concentration^{8–10}. In roots is the inhibiting effect visible in a larger concentration span. This could indicate other mechanism(s) of GGMOs action in roots compared with aboveground plant parts. The inhibition of growth accompanied by changes in glycosidase¹³, glycanase, and XET activities¹⁴ report on the active role of GGMOs in the cessation of growth which connects with modification of physical and chemical properties of the plant cell wall. Their inhibition effect is probably also the result of cell wall thickening catalyzed by peroxidase¹⁴. Previous results give evidence of GGMOs as potential signals active at the cell transition from elongation to differentiation stage. The unique cell system of zinnia allowed to show that poly- and oligosaccharides of mannan type could act as signaling molecules naturally present in cells in the cell transdifferentiation to tracheary elements – TEs (xylem). Several genes were identified with rapidly modified transcript levels during the development of TEs in the presence of GGMOs. Their interaction with auxin-signaling pathway, active involvement in cell wall restructuring, or lignin formation during the transdifferentiation of cells to TEs is assumed¹².

The research is supported by VEGA 2/7048/27 and APVT 51-013304.

REFERENCES

1. Schröder R., Wegrzyn T. F., Bolitho K. M., Redgwell R. J.: *Planta* 219, 590 (2004).
2. Matheson N. K.: *Methods Plant Biochem.* 2, 371 (1990).
3. Whitney S. E. C., Brigham J. E., Darke A. H., Reid J. S. G., Gidley M. J.: *Carbohydr. Res.* 307, 299 (1998).
4. Newman R. H., Ha M.-A., Melton L. D.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 1402 (1994).
5. Hosoo Y., Yoshida M., Imai T., Okuyama T.: *Plant* 215, 1006 (2002).
6. Schröder R., Nicolas P., Vincent S. J. F., Fischer M.,

- Reymond S., Redgwell R. J.: *Carbohydr. Res.* 331, 291 (2001).
7. Slovakova E., Liškova D., Capek P., Kubačkova M., Kakoniova D., Karacsanyi Š.: *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 543 (2000).
 8. Auxtova O., Liškova D., Kakoniova D., Kubačkova M., Karacsanyi Š., Bilisics L.: *Planta* 196, 420 (1995).
 9. Kollarova K., Henselova M., Liškova D.: *Plant Growth Regul.* 46, 1 (2005).
 10. Kollarova K., Liškova D., Capek P.: *Biol. Plantarum* 50, 232 (2006).
 11. Liškova D., Auxtova O., Kakoniova D., Kubačkova M., Karacsanyi Š., Bilisics L.: *Planta* 196, 425 (1995).
 12. Beňova-Kakošova A., Digonnet C., Goubet F., Ranocha P., Jauneau A., Pesquet E., Barbier O., Zhang Z., Capek P., Dupree P., Liškova D., Goffner D.: *Plant Physiol.* 142, 696 (2006).
 13. Bilisics L., Vojtaššak J., Capek P., Kollarova K., Liškova D.: *Phytochemistry* 65, 1903 (2004).
 14. Liškova D., Capek P., Kollarova K., Slovakova E., Kakošova A., in: *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, Vol. I, (J. A. Teixeira da Silva, ed.), p. 373–378. Global Science Books, Japan 2006.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF OXIDIZED POTATO STARCH – SOY PROTEIN COMPLEXES

IRENEUSZ MACIEJASZEK, KRZYSZTOF SUROWKA, and RYSZARD MACURA

Department of Refrigeration & Food Concentrates, University of Agriculture, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland
 rtsurowk@cyf-kr.edu.pl

The functional properties of biopolymers result from their interactions with water, air, fat and other constituents, and play a crucial role in the way of their application. In this paper modified potato starch – soy protein complexes were evaluated for their functionality. Complexes were obtained by the method of electrosynthesis from soy protein isolate and oxidized potato starch. Solubility, water holding capacity (WHC), sorption properties, emulsifying properties, rheological characteristics and biodegradability were evaluated. The products, immediately after getting, were freeze-dried. X-ray diffraction study revealed that the process of complex formation was not accompanied by crystals formation, however SEM microphotograph shows the partially ordered pattern. Moreover, partial protein denaturation, resulting in onset temperature shift and decrease in enthalpy (DH), was observed that was proved by DSC method. Also, as a result of electrosynthesis, nitrogen solubility index significantly dropped whereas high WHC values, characteristic for soy protein isolates, were maintained. It has also been found that the sorption isotherms of electrocomplexes can be accounted to the 2nd type according to Brunauer, and placed beneath substrate isotherms.

This proves both strong soy protein – oxidized starch interactions and visible structural changes which leads to lower BET monolayer values comparing to substrates. Rheologically, 20% water suspensions behaved as weak gels. Their G'' and G' modules showed a weak dependence on the frequency of oscillation and their ratio was higher than 0,1. Emulsifying properties of electrocomplexes were weak which resulted from their low solubility. Examined products were decomposed by soil bacteria of genus *Bacillus Pseudomonas*, and *Actinomyces* and also were partially sensitive to hydrolysis by enzymes.

Functional properties, especially low solubility, are these factors, which limits the usage of electrocomplexes in food industry. However, their application as carriers for flavourings or colorants as well as components of edible protective films and dietary products should be considered. On the other hand their applicability as components of biodegradable packaging materials indicate even wider range of their future usage in non-nutritive areas.

REFERENCE

1. Dejewska A., Mazurkiewicz J., Tomasik P., Zaleska H. (1995) *Starch/Stärke* 6, 219–223.

POTATO STARCH – 7S SOY PROTEIN COMPLEXES OBTAINED BY ELECTROSYNTHESIS

IRENEUSZ MACIEJASZEK, KRZYSZTOF SUROWKA, and RYSZARD MACURA

Department of Refrigeration and Food Concentrates, University of Agriculture, Balicka Street 122, 30-149 Krakow, Poland
 rtsurowk@cyf-kr.edu.pl

Among soybean constituents protein attracts particular attention. Its functional properties in soy products depend significantly on the denaturation degree and on the presence of non-protein constituents. Some of the latter accompany the protein in natural conditions, the others can be added. Under favourable conditions components can interact and as result new products can be obtained. Such interactions are common between protein and anionic polysaccharides. We paid our attention to the possibilities offered in this respect by electrosynthesis as a preparation method. The aim of the present work is to adapt the method of electrosynthesis¹ for the production of complexes of potato starch with a 7S soy globulin (conglycinin) consisting of approximately 37 % total water-soluble proteins in soy.

A 200 ml beaker was equipped with two chromnickel stainless steel electrodes, and filled with aqueous solutions of conglycinin and potato starch at the 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, and 1:3 ratios, to achieve the total polymer concentration of 3 %. Subsequently, the reaction mixture was brought to pH 8, and the electrosynthesis was conducted at 12 V.

White, insoluble complexes were collected from anode after 90 min, rinsed with deionised water, and freeze-dried.

The product formation was accompanied with a decrease in the current from original 35–75 mA to the final approx. 17–20 mA. Simultaneously, pH of the bath increased to 11.2–11.8 depending on the 7S globulin to polysaccharide ratio. As a result of diffusion of the components to electrodes and a local pH decrease at the anode, the complex formation takes place. Prepared complexes were richer in protein than the initial blends. For example, the product collected from the bath of the initial 1:1 composition contained nearly 70 % protein. Higher content of conglycinin in the bath provided higher yield of complexes. In the case of 1:1 composition it reached 15.2 %. The relatively low yield of the complexes resulted, probably, from obstruction in the transport of substrates to anode resulting from the insoluble product deposited on this electrode surface, and steric effects during formation of the complexes. The phosphate moieties of polysaccharide and peptide bonds of the protein can be involved in complex formation, as is suggested by FTIR analyses. Also hydrophobic interactions seem to be involved. The TG and DTG analysis revealed that thermal stability of complexes was generally slightly higher than that of free protein substrate and lower than that of free potato starch.

Insoluble electrocomplexes of soybean 7S protein fraction with potato starch as obtained in this study can potentially be used as components of edible films, texturizing additives, microcapsules and biodegradable materials.

REFERENCE

1. Dejewski A., Mazurkiewicz J., Tomasik P. and Zaleska H. (1995) *Starch/Stärke* 6, 219–223.

VPLYV ENVIRONMENTÁLNYCH FAKTOROV NA OBSAH A ZLOŽENIE ŠKROBU ZRNA PŠENICE LETNEJ

**DANIELA MIKULÍKOVÁ^a,
VIERA HORVÁTHOVÁ^b a JÁN KRAIC^{a,b}**

^a Výskumný ústav rastlinnej výroby SCPV, Bratislavská 122, 921 68 Piešťany, ^b Univerzita sv. Cyrila a Metoda, Námestie J. Herdu 2, 917 01 Trnava, Slovenská republika mikulikova@vurv.sk

V súčasnosti je veľmi aktuálna otázka hľadania energetických surovín na nepotravinové využitie ako náhradu za vyčerpané zásoby fosílnych palív. Suroviny vhodné na produkciu bioetanolu musia mať vysoký obsah škrobu, ktorý možno efektívne hydrolyzovať. Za limitnú hranicu rentability sa považuje 65 % škrobu v sušine zrna. Z hľadiska efektívnej rastlinnej produkcie v Slovenskej republike sa ako perspektívny zdroj pre využitie na energetické účely javí škrob zo semien pšenice a tritikale. Možno ich pestovať najmä v marginálnych oblastiach.

Fyzikálno-chemické vlastnosti škrobu (najmä rozpustnosť, napučovanie a schopnosť želatinizácie, hydrolyzy alebo retrogradácie) závisia od podielu amyulózy a amylopektínu v ňom. Vyšší podiel amylopektínu znižuje teplotu želatinizácie a uľahčuje proces hydrolyzy a vzniku monosacharidov pre etanolovú fermentáciu.

Cieľom práce bolo hodnotenie základných parametrov zrna oz. formy pšenice letnej (*Triticum aestivum* L.), ktoré úzko súvisia s produkciou etanolu: obsah celkového škrobu, podiel amyulózy a amylopektínu v ňom a aktivita internej α -amylázy (α -AMS), ktorá je kľúčovým enzýmom v degradácii škrobu. Sledoval sa vplyv odrody, lokality a ročníka na tieto parametre. Obsah škrobu sa stanovil polarimetricky. Na stanovenie aktivity α -AMS sa použil syntetický substrát *p*-nitrofenyl-maltoheptaozid. Enzymová aktivita je priamo úmerná množstvu uvoľneného *p*-nitrofenolu. Obsah amyulózy v škrube sa zisťoval kitom fy Megazyme (Írsko).

Zistila sa významná odrodová závislosť v obsahu škrobu, v jeho zložení aj v enzymovej aktivite α -AMS. Na základe dosiahnutých výsledkov je podiel amyulózy a amylopektínu v škrube pšenice geneticky podmienený a neovplyvňuje ich lokalita pestovania ani klimatické podmienky počas vegetačného obdobia. Obsah škrobu však významne ovplyvnila lokalita pestovania aj klimatické podmienky. Najvyšší obsah škrobu mali odrody pšenice pestované v stredoslovenskej marginálnej oblasti Vígľaš-Pstruša. Obsah škrobu aj aktivitu α -AMS výrazne zvýšili nižšie teploty a vyššie zrážky počas klásenia a dozrievania zrna.

Podľa hodnotených parametrov škrobu v pšenici sú pre produkciu bioetanolu veľmi perspektívne novovyšľachtené slovenské odrody Pavlína a Veldava. Obe majú vysoký obsah škrobu aj aktivitu α -AMS a v škrube majú vyšší podiel amylopektínu.

Táto práca vznikla za podpory Ministerstva pôdohospodárstva SR (projekt 2006 ÚO27/091 05 01/091 05 11 Biologické faktory podmieňujúce efektívnu a konkurencioschopnú rastlinnú výrobu).

LITERATÚRA

1. Rosenberger A., Kaul H. P., Senn T., Aufhammer W.: *Ind. Crop Prod.* 15, 91 (2002).
2. Sasaki T.: *Jpn. Agric. Res. Quart.* 39, 253 (2005).
3. Słomińska L., Klisowska M., Grzeškowiak A.: *Electron. J. Pol. Agric. Univ.* 6, 1 (2003).
4. Tester R. F., Karkalas J., Qi X.: *World's Poult. Sci. J.* 60, 186 (2004).
5. Wu X., Zhao R., Wang D., Bean S. R., Seib P. A., Tuinstra M. R., Campbell M., O'Brien A.: *Cereal Chem.* 83, 569 (2006).

ACID HYDROLYSES DURING SELECTIVE NITROXIDE-MEDIATED OXIDATION OF NATIVE CELLULOSE

MILOSLAV MILICHOVSKÝ^a, TOMÁŠ SOPUCH^b,
JAROSLAV RICHTER^c, PAVEL HAVELKA^c,
and SVATAVA MILICHOVSKÁ^d

^a Department of Wood, Pulp and Paper, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentska 95, 530 09 Pardubice, ^b AliaChem a.s., division Synthesia, Pardubice-Semtín, Czech Republic, ^c VUOS a.s., Pardubice-Rybitví, ^d Brožkova 430, 530 09 Pardubice
miloslav.milichovsky@upce.cz

The detailed knowledge of nitroxide-mediated oxidation of cellulose including its degradation and destruction is important not only for OC preparation but it help better to understand and to control of OC and cellulose material aging. Logically, it seems reasonable to suppose that these types of reactions are also evoked during the aging of cellulose in natural atmosphere as NO_x are polluting the air.

The kinetic and mechanism of depolymerization during nitroxide-mediated oxidation of native cellulose was studied under various conditions. Physical heterogeneity of the native cellulose and its complicated hypermolecular and supramolecular structure exerts a marked influence upon the kinetic of oxidation and depolymerization of cellulose. The correctness of Staudinger-Mark-Houwink equation used for viscosity degree of polymerization (DP) calculations of both the cellulose and cellouronic acids was proved.

It was shown strong influence of the external tension application on cellulose gauze reactivity during its oxidation because its complicated hypermolecular structure. By application of external tension during selective oxidation of native cellulose were obtained cellouronic acids with higher carboxyl groups content but also lower of its intrinsic viscosity – average viscosity DP. The mathematical model – so-called *DP-peeling off model* – was derived to describe the kinetic of cellulose depolymerization in full extent of experimental data.

HODNOCENÍ OBSAHU ŠKROBU A JEHO FRAKČÍ V ZRNU VYBRANÝCH ODRŮD OZIMÉ PŠENICE

LUDMILA PAPOUŠKOVÁ^a, VÁCLAV DVOŘÁČEK^a
a TIBOR SEDLÁČEK^b

^a Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i., oddělení Genové banky, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, ^b Šlechtitelská stanice Stupice, Selgen a.s. Stupice 24, 250 84 Sibřina
papouskova@vurv.cz

Celkový obsah škrobu a jeho frakcí amylosy a amylopektinu byl ve dvou sklizňových letech (2005–2006) stanovován u 23 v ČR registrovaných odrůd ozimé pšenice

pocházejících z lokality Věrovany. Tři odrůdy byly zahrnuty do elitní pekařské jakosti E. Osm odrůd vykazovalo třídu pekařské jakosti A. Sedm odrůd bylo zařazeno do třídy B a pět odrůd bylo v kategorii C charakterizující odrůdy nevhodné pro výrobu kynutých těst.

Byla zjišťována závislost obsahu škrobu a jeho frakcí na odrůdě, pekařské jakosti a ročníku.

Obsah celkového škrobu byl stanoven polarimetrickou metodou podle Ewerse, obsah amylosy enzymatickou metodou pomocí Amylose/Amylopektin kitů firmy Megazyme. Obsah amylopektinu byl dopočítáván jako rozdíl obsahu celkového škrobu a obsahu amylosy.

Obsah škrobu se pohyboval v obou letech v rozmezí 63–69 %. V roce 2006 však byly hodnoty statisticky průkazně nižší. Nejmenší obsah amylosy – 21,6 %, byl nalezen u odrůdy Svitava (2005), naopak nejvyšší obsah – 28,9 %, měly odrůdy Clarus (2006) a Drifter (2006). Navzdory detegovaným dílčím diferencím v obsahu amylosy i amylopektinu nebyly získané dvouleté průměry testovaných odrůd statisticky průkazné. Statisticky průkazně však obě škrobové frakce ovlivnil ročník 2006, kdy byl detegován signifikantně vyšší obsah amylosy a nižší obsah amylopektinu.

Statisticky průkazné rozdíly v obsahu celkového škrobu byly zaznamenány pouze mezi dvojicí odrůd Rapsodia (63,3 %) a Apache (67,7 %). Signifikantní rozdíl v obsahu celkového škrobu byl rovněž potvrzen mezi zástupci pekařské třídy B (66,0 %) a C (65,2 %).

Z výše uvedených výsledků vyplynulo, že nejvýznamnějším faktorem ovlivňujícím obsahové změny škrobu a jeho frakcí byl průběh ročníku.

Práce vznikla za podpory projektu NAZV č. 1G58076.

VLIV PŮDNÍHO ZINKU A MĚDI NA SYNTÉZU ŠKROBU V BRAMBOROVÝCH HLÍZÁCH

OTAKAR ROP, MONIKA ČERNÁ, DANIELA
KRAMÁŘOVÁ a PAVEL VALÁŠEK

Ústav potravinářského inženýrství, Fakulta technologická,
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, náměstí T. G. Masaryka
275, 762 72 Zlín
rop@ft.utb.cz

Zinek (Zn) a měď (Cu) patří mezi základní mikroelementy ve výživě rostlin. Jejich přítomnost v prostředí je nutná pro růst a vývoj rostlinného organismu. Ve vyšších koncentracích však mohou působit toxicky¹. Zinek i měď mají v rostlině funkci katalytických prvků. Jsou součástí oxidačních enzymů (cytochromoxidas, askorbatoxidas, polyfenoloxidas). Spolu se železem se podílí na redukci nitrátů v rostlině². Vedle těchto reakcí mají oba prvky nezastupitelné místo v proteinovém a sacharidovém metabolismu rostlin³.

Cílem pokusu bylo sledovat vliv stupňovaných dávek zinku a mědi na obsah škrobu v bramborových hlízách.

Jako pokusná plodina byly zvoleny velmi rané brambory odrůdy KOMTESA. Pokus byl prováděn v plastových vegetačních nádobách, které byly umístěny v kryté vegetační hale. Do každé nádoby bylo navažováno 10 kg zeminy. Do pokusu byly zařazeny varianty se stupňovanými dávkami zinku a mědi v půdě. V případě zinku byly zvoleny 3 varianty s dávkováním 40, 100 a 200 mg Zn kg⁻¹ zeminy. U mědi byly použity také 3 varianty, a to s dávkováním 20, 50 a 100 mg Cu kg⁻¹ zeminy. Každá varianta byla 15× opakována. Zinek byl aplikován ve formě síranu zinečnatého a měď ve formě dusičnanu měďnatého. Bramborové hlízy byly sklizeny po 90 dnech vegetace, kdy jsou v konzumní zralosti⁴. Škrob byl stanoven metodou podle Ewerse⁵. Výsledky chemických analýz byly zpracovány metodou analýzy variance. Pro vyhodnocení průkaznosti rozdílů byl použit Scheffého test při 5 % hladině významnosti⁶.

U variant se stupňovanými dávkami zinku v půdě byla zaznamenána statisticky významná zvýšení obsahu škrobu v bramborových hlízách. U kontrolní varianty bylo v čerstvé hmotě dužniny hlíz naměřeno 14,34 hm.% škrobu, u varianty s přidávkou 40 mg Zn kg⁻¹ zeminy to bylo 14,72 hm.% a statisticky významný rozdíl se zde ještě neprokázal. Signifikantní však bylo zvýšení obsahu škrobu v hlízách u varianty se 100 mg Zn kg⁻¹, a to na 17,96 hm.%. U varianty s 200 mg Zn kg⁻¹ bylo naměřeno 18,69 hm.% škrobu v čerstvé hmotě. Zcela odlišná byla syntéza škrobu v hlízách, které byly pěstovány na půdě se zvýšenou hladinou mědi. Zde došlo ke statisticky vysoce významnému snížení množství škrobu v hlízách ve srovnání s kontrolní variantou. Stejně tak každý stupňovaný přírůstek mědi do půdy znamenal snížení obsahu škrobu v čerstvé hmotě bramborových hlíz. Konkrétně u varianty s 20 mg Cu kg⁻¹ bylo naměřeno 12,62 hm.%, u varianty s 50 mg Cu kg⁻¹ to bylo 11,69 hm.%, a u varianty s nejvyšším množstvím mědi v půdě bylo obsaženo 10,58 hm.% škrobu v čerstvé hmotě bramborových hlíz.

LITERATURA

1. Purves W.: *Life: The Science of Biology*. Sinauer Associates, Sunderland 2004.
2. Fernandez J. C., Henriquez F. C.: *Bot. Rev.* 57, 246 (1991).
3. Khurana N., Singh M. V., Chatterjee C.: *J. Plant Nutr.* 29, 93 (2006).
4. Rop O.: *Doktorská disertační práce*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno 1999.
5. Zbíral J.: *Analýza rostlinného materiálu (jednotné pracovní postupy)*. ÚKZÚZ, Brno 1994.
6. Unistat: *Statistical Package for Windows*. Unistat House, Londýn 2002.

STUDIUM BIODEGRADOVATELNÝCH SMĚSÍ ŠKROB/POLYKAPROLAKTON METODAMI NMR SPEKTROSKOPIE PEVNÉHO STAVU

JIŘÍ SPĚVÁČEK^a, JIŘÍ BRUS^a, THOMAS DIVERS^b
a YVES GROHENS^b

^a Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., Heyrovského nám. 2, 162 06 Praha 6; ^b Laboratoire polymères, propriétés aux interfaces et composites, Université de Bretagne-Sud, rue de Saint Maudé, BP 92 116, 56321 Lorient, France
spevacek@imc.cas.cz

V posledních letech je věnována značná pozornost výzkumu biodegradovatelných polymerů s cílem získat levné kompostovatelné materiály. Polykaprolakton a další alifatické polyestery patří k nejčastěji studovaným systémům. Příprava těchto polymerů je však nákladná a jejich vlastnosti nevyhovují všem technickým požadavkům pro možné aplikace. Intenzivně studovány jsou proto i směsi těchto polymerů se škrobem^{1,2}, což je lehce dostupný a tudíž levný polysacharid. Mísitelnost obou složek v těchto směsích je jedním z hlavních parametrů ovlivňujících vlastnosti směsi.

V naší studii jsme se zabývali charakterizací molekulární morfologie a dynamiky v biodegradovatelných směsích škrob/polykaprolakton (PKL) o různém složení metodami NMR spektroskopie pevného stavu. Jako PKL-složka byl užit jak polymer o vyšší molekulové váze ($M_w = 80\,000$), tak esterové oligomery 1,6-hexandiol-adipátu ($M_w = 2700$). Vedle směsi škrob/PKL byly studovány i směsi obsahující škrob modifikovaný formylací. Použitá metodika ke stanovení morfologie (velikosti domén) v těchto směsích byla založena na jevu spinové difuze³ a na měření selektivních protonových spin-mřížkových relaxačních dob T_1 (H) a spin-mřížkových relaxačních dob v rotující souřadné soustavě $T_{1\rho}$ (H). Hodnoty protonových relaxačních dob byly v obou případech stanoveny ze sérií ¹³C CP/MAS (cross polarization/magic angle spinning) NMR spekter. Zatímco hodnoty relaxačních dob $T_{1\rho}$ (H) dávají u námi studovaných systémů informaci o velikosti domén v řádu jednotek nm, hodnoty relaxačních dob T_1 (H) poskytují informaci o velikosti domén ve škále desítek nm.

Ze získaných relaxačních dob $T_{1\rho}$ (H) a T_1 (H) vyplynulo, že ve směsích škrob/PKL, škrob/esterové oligomery a formylovaný škrob/esterové oligomery jsou obě složky fázově separovány i ve škále 20–110 nm. Naproti tomu ve směsích formylovaný škrob/PKL jsou obě složky fázově separovány ve škále 2,5–12 nm, ale homogenně promíseny ve škále 20–90 nm. Získané výsledky ukazují, že formylace škrobu podstatně zlepšuje jeho mísitelnost s PKL.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 525/05/0273.

LITERATURA

1. Averous L., Moro L., Dole P., Fringant C.: *Polymer* 41, 4157 (2000).
2. Singh R. P., Pandey J. K., Rutor D., Degée P., Dubois P.: *Carbohydr. Res.* 338, 1759 (2003).
3. Asano A., Takegoshi K., v knize: *Solid State NMR of Polymers* (Ando I., Asakura T., ed.), Chap. 10, s. 361–414, Elsevier 1998.

ISOLATION AND SPECTROSCOPIC CHARACTERISATION OF GLUCANS ISOLATED FROM FRUIT BODIES OF *PLEUROTUS* SP.

ANDRIY SYNYTSYA^a, KATEŘINA MÍČKOVÁ^a,
ALLA SYNYTSYA^b, JIŘÍ SPĚVÁČEK^c a JANA
ČOPÍKOVÁ^a

^a Department of Carbohydrate Chemistry and Technology,

^b Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology in Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic, ^c Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Science of the Czech Republic, Heyrovsky sq. 2, 162 06 Prague 6, Czech Republic
sinicaa@vscht.cz

Cultivated mushrooms have been used in pharmacy as a source of biologically active compounds including specific polysaccharides. Partially, commonly cultivated mushrooms of genus *Pleurotus* are interesting because of its glucans demonstrating great immunomodulation properties. Pleuran, specific glucan isolated from *Pleurotus* sp., has suppressive effect on tumour¹. Biologically active glucans itself or their complexes with proteins and other polysaccharides isolated from fruit bodies of these species are interesting for the preparation of novel food supplements.

Soluble and insoluble polysaccharide fractions were isolated from fruit bodies of various species and strains of *Pleurotus* sp. by subsequent hot water and alkali extractions, α -amylase treatment, deproteinisation, dialysis and lyophilisation. Obtained lyophilisates of water and alkali soluble fractions as well as alkali insoluble precipitates were characterised by FT-IR, Raman and ¹³C CP-MAS NMR spectroscopy. Carbohydrate composition of the fractions was analysed by total hydrolysis followed with GC; contents of glucans were determined with Megazyme enzymatic kits.

Spectroscopic methods detected glucans in all the fractions, while enzymatic analyses confirmed significant differences in contents of these polysaccharides among the species and strains. Other polysaccharides (chitin and galactomannans) are present in small amount; chitin only as a structural component of chitin-glucan complexes in alkali insoluble precipitates. Both water and alkali extracts were identified as mixtures of glucans and proteins. The protein content was small or negligible in alkali extracts but significant in water extracts. Effective deproteinisation of the extracts was achieved by the treatment with phenolic reagent.

This work was supported by Grant Agency of the Czech Republic (525/05/0273) and the Ministry of Education of the Czech Republic (project No. CEZ: MSM6046137305).

REFERENCE

1. Wasser S. P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 258 (2002).

MOŽNOSTI UŽITÍ MEMBRÁNOVÝCH PROCESŮ PRO PŘEDČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD Z VÝROBY SUŠENÉ BRAMBOROVÉ KAŠE

EVŽEN ŠÁRKA, VLADIMÍR POUR,
ANEŽKA VESELÁ, ZDENĚK BUBNÍK

Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Cílem práce bylo ověření možnosti aplikace membránové filtrace pro předčištění odpadní vody z výroby sušené bramborové kaše. Obsahovala škrob v podobě celých škrobových zrn, mazovatěly škrob a pevné částice (jemné zbytky slupek). Příspěvek zaznamenává naměřené výsledky jednotlivých filtračních pokusů a posuzuje výkon a separační schopnost jednotlivých zkoušených membrán. Bylo použito poloprovozní zařízení francouzské firmy T.I.A. Bollene osazené keramickými ultrafiltračními membránami MEMBRALOX o filtrační ploše 0,35 m², s porozitou 500 a 100 nm. Mimo to byla zkoušena filtrace i na organické membráně 7410 výrobce NITTO DENKO CORPORATION, OSAKA na aparatuře ARNO 600, výrobce Mikropur, s.r.o., Hradec Králové. Nejvyšší intenzity průtoku permeátu přes 100 l m⁻² h⁻¹ bylo krátkodobě dosaženo u membrány 100 nm. Nejvyššího součinitele rejekce bylo dosaženo rovněž u membrány 100 nm pro CHSK a BSK5 kolem 60 %.

VÝZNAM ODRŮDY A STANOVIŠTĚ PRO OBSAH ŠKROBU A AMYLOSU U BRAMBOR URČENÝCH NA VÝROBU ŠKROBU

DAGMAR ŠIMKOVÁ, JAROSLAVA DOMKÁŘOVÁ
a BOHUMIL VOKÁL

Výzkumný ústav bramborářský, Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod
simkova@vubhb.cz

Pro průmysl zabývající se zpracováním brambor patří obsah škrobu v surovině k nejvýznamnějším ukazatelům, rozhodujícím o ekonomické efektivnosti výrobního procesu. Cílem práce bylo ověřit schopnost odrůd (22) na vybraných stanovištích (5) v ČR zajistit relativně stabilní obsah škrobu v hlízách, a to i s ohledem na délku jejich vegetační doby a obsah amylosy v bramborovém škrobu.

Z dvouletých výsledků je zřejmé, že vliv všech sledovaných faktorů na obsah škrobu v hlízách přesáhl hranici významnosti. Nejvíce se uplatnily lokality ($F=42,75^{**}$) a odrůdy ($F=28,02^{**}$). Relativně méně ročník ($F=8,29^{**}$). Na lokalitách obsah škrobu kolísal v průměru od 19,18 % (Vysoké nad Jizerou) do 21,40 % (Valečov) v letech od 20,15 (2006) do 20,48 % (2005). U odrůd od 18,21 % (polopozdní Saturna, určená pro výrobu lupinků a škrobu) do 22,70 % (polopozdní Amylex určený pro výrobu škrobu). Obsah amylosy byl významně ovlivněn ročníkem ($F=16,50^{**}$), odrůdou ($F=10,14^{**}$) i zvolenou lokalitou ($F=9,97^{**}$). Ten se v průměru stanovišť pohyboval od 20,68 % (Horažďovice) do 22,07 % (Vysoké nad Jizerou), tj. nejvyšší byl na stanovišti, které vykazalo v průměru nejnížší obsah škrobu. Toto zjištění se však nepotvrdilo v průměru let (21,01 % v r. 2005 a 21,62 % v r. 2006), ale ani u jednotlivých odrůd. V jejich případě se obsah pohyboval poměrně v širokém rozmezí od 18,61 % (velmi pozdní Amado) do 22,84 % (raná Orbit) s určitou tendencí vyššího obsahu u odrůd s kratší vegetační dobou.

Výsledky byly získány při řešení projektu MZe ČR NAZV IG 57056.

WPLYW ZAWARTOŚCI POLISACHARYDÓW W BULWACH ZIEMNIAKA NA KSZTAŁTOWANIE KONSYSTENCJI I ZAWARTOŚĆ TŁUSZCZU W PRODUKTACH SMAŻONYCH Z ZIEMNIAKA

A. TAJNER-CZOPEK, A. KITA, G. LISIŃSKA

Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Polska

Polisacharydy to główny składnik suchej masy bulw ziemniaka, wpływający na ich jakość i kierunki wykorzystania. Prócz skrobi, której zawartość w odmianach przeznaczonych do produkcji frytek kształtuje się na poziomie 14–16 % a do produkcji czipsów – 15–19 %, w bulwach ziemniaka znajdują się również polisacharydy nieskrobiowe NSP (około 2 %) – celuloza, hemicelulozy, pektyny oraz lignina, pełniące rolę strukturotwórczą.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu obierania na zawartość poszczególnych frakcji polisacharydów w ziemniakach przeznaczonych do produkcji czipsów i frytek oraz określenie zależności pomiędzy zawartością tych związków a ilością tłuszczu wchłoniętego podczas smażenia oraz teksturą gotowych produktów.

Materiałem użytym do badań było 6 odmian ziemniaka typowych do produkcji czipsów i frytek ziemniaczanych. W bulwach ziemniaka przed i po obraniu oznaczano zawartość suchej substancji i skrobi oraz zawartość pektyn ogółem, celulozy, hemiceluloz i ligniny. W gotowych produktach oznaczono zawartość tłuszczu oraz twardość wyznaczoną przy użyciu aparatu pomiarowego Instron 5544. Mierzono maksymalną siłę

(N) potrzebną do przecięcia czipsów i frytek.

Stwierdzono, że obieranie wpłynęło na zawartość suchej masy i skrobi w analizowanych odmianach ziemniaka. Obieranie powodowało zmniejszenie ilości polisacharydów nieskrobiowych i ligniny nawet o połowę. Największemu obniżeniu uległa zawartość celulozy, której ilość zmniejszyła się o 70%, niezależnie od kierunku wykorzystania ziemniaków. Najmniejsze zmiany (obniżenie o 14%) stwierdzono we frakcji pektyn ogółem.

Czipsy sporządzone z odmian typowo czipsowych chłonęły mniejsze ilości tłuszczu w porównaniu z odmianami frytkowo-czipsowymi. Nie stwierdzono natomiast różnic w zawartości tłuszczu we frytkach ziemniaczanych sporządzonych z różnych odmian ziemniaka. Twardość otrzymanych produktów była zróżnicowana w zależności od odmiany ziemniaka. Większą twardością charakteryzowały się czipsy sporządzone z odmian ziemniaka typowo czipsowych w porównaniu z frytkowo-czipsowymi. Podobne zależności stwierdzono również we frytkach. Wyznaczono korelacje pomiędzy zawartością skrobi oraz poszczególnych frakcji NSP i ligniny a zawartością tłuszczu i konsystencją otrzymanych czipsów i frytek ziemniaczanych.

TERMICKÁ ANALÝZA β -GLUKANŮ

ANEŽKA VESELÁ, ANDRIY SYNYTSYA a JANA ČOPIKOVÁ

Ústav chemie a technologie sacharidů, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 1905, 166 28 Praha 6

anezka.vesela@vscht.cz

β -Glukany jsou jednou ze složek rozpustné vlákniny potravy člověka. Jedná se o lineární nebo větvené polysacharidy tvořené glukosovými jednotkami vázanými $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow4)$ a $\beta(1\rightarrow6)$ glykosidickými vazbami. Lineární β -glukany, ve kterých jsou přítomny vazby $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$, se vyskytují v obilovinách, zejména v ječmenu a ovsu. Větvené β -glukany navíc obsahují $\beta(1\rightarrow6)$ glykosidickou vazbu a jsou běžně přítomné v buněčných stěnách hub a kvasinek.

Polysacharidy a jejich deriváty mohou být rozlišeny termickou analýzou podle rozdílného mechanismu jejich rozkladu¹. Termická analýza je obecně označení pro skupinu experimentálních metod, při nichž se měří teplotní závislost nějaké fyzikální veličiny zkoumané látky. Za základní termoanalytické metody jsou obvykle považovány termogravimetrie (TG) a diferenční scanovací kalorimetrie (DSC). TG je metoda, při které se plynule zaznamenává hmotnost vzorku zkoumané látky jako funkce teploty nebo času během jeho ohřevu nebo ochlazování kontrolovanou rychlostí, někdy se sleduje změna hmotnosti jako funkce času za izotermních podmínek. Při DSC jsou měřeny tepel-

né projevy, způsobené chemickými nebo fyzikálními změnami, jako funkce teploty nebo času, zatímco je vzorek zahříván rovnoměrnou rychlostí.

Při DSC polysacharidů v inertní atmosféře můžeme sledovat jak endotermní projevy, tak exotermní projevy. Na křivce se obvykle vyskytuje několik píků, přičemž první bývá způsoben odpařením vody, další procesy jsou spojeny s degradací polysacharidů. Endotermní píky jsou spojené s depolymerizací a tvorbou těkavých nízkomolekulárních produktů a zuhelnatělého zbytku. Exotermní píky jsou způsobené tvorbou zesíťovaných struktur a jejich následného rozkladu během degradace polysacharidu². TG analýza prokázala významné rozdíly v termostabilitě vzorků β -glukanů.

Získané výsledky potvrdily, že DSC a TG mohou být užitečnými nástroji při analýze β -glukanů z různých zdrojů, protože mechanismus tepelného rozkladu závisí na zdroji, molekulární hmotnosti a struktuře těchto polysacharidů.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky (projekt 525/05/0273).

LITERATURA

1. Zohuriaan M. J., Shokrolahi F.: Polym. Test. 23, 575 (2004).
2. Wanjun T., Cunxin W., Donghua C.: Polym. Degrad. Stab. 87, 389 (2005).

INULIN A MANNANOOLIGOSACHARIDY V KRMNÉ SMĚSI ČASNĚ Odstavených KRÁLÍKŮ: VLIV NA METABOLISMUS SLEPÉHO STŘEVA A UŽITKOVOST

ZDENĚK VOLEK a MILAN MAROUNEK

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Přátelství 815, 104 01 Praha Uhřetěves volek.zdenek@vuzv.cz

Časný odstav králíků je dáván do souvislosti s možností snížení energetického deficitu samic králíků (současně březích a kojících) ve čtvrtém týdnu laktace, a zároveň s umožněním specifické výživy mláďat¹. Nicméně, aby mohla být tato technika bez problémů využita v praxi, je nutné nejprve poznat nutriční požadavky mláďat. Hlavní problémy spojené s časným odstavením králíčat jsou poruchy trávení^{2,3}. Obvyklou metodou prevence trávicích poruch bylo používání krmných antibiotik. Tyto látky jsou však v EU plošně zakázané. Je proto žádoucí hledat vhodné alternativy, které by mohly, ať už cestou vhodné úpravy mikrobiální aktivity ve slepém střevě či přímou interakcí s určitými patogenními mikroorganismy, tyto poruchy trávení efektivně redukovat. V úvahu přichází obohacení krmné směsi o inulin či mannanooligosacharidy

(MOS)³⁻⁵. Cílem práce proto bylo zjistit vliv přidavku uvedených aditiv do krmné směsi časně odstavených králíků na mikrobiální aktivitu ve slepém střevě a užitkovost.

Pro potřeby pokusu byly sestaveny tři krmné směsi: dieta C (kontrolní), M (0,3 % MOS; Bio-Mos, Alltech Inc) a I (4 % inulinu, Frutafit®IQ). Do pokusu bylo zařazeno 348 králíků (Hyplus), odstavených ve 25 dnech věku. 330 králíků (110 ve skupině) bylo použito pro hodnocení užitkovosti, 18 králíků (6 ve skupině) pro ohodnocení mikrobiální aktivity slepého střeva ve 42 dnech věku. První skupina králíků dostávala kontrolní směs od odstavu do 74. dne věku (konec pokusu). Zbylé dvě skupiny králíků přijímaly od odstavu do 46. dne věku směs M (MOS) nebo I (inulin) a po tomto období byli králíci obou skupin krmení do konce pokusu kontrolní směsí.

V rámci sledovaných skupin nebyl z pohledu celého výkrmové období pozorován signifikantní rozdíl v užitkovosti králíků. Během startérové periody (25.–46. den věku) byla nejnižší morbidita ($P=0,05$), stejně jako index zdravotního rizika ($P=0,03$) zaznamenan u králíků krmných dietou s inulinem. Mortalita, ačkoliv nesignifikantně, byla nejnižší u králíků s MOS. Po změně krmné směsi však došlo u králíků krmných během startérové periody dietou s MOS nebo inulinem ke zvýšení indexu zdravotního rizika, takže z pohledu celého období nebyl zaznamenan signifikantní rozdíl ve zdravotním stavu. Celková koncentrace těkavých mastných kyselin v slepém střevě byla signifikantně vyšší, zatímco pH a koncentrace amoniaku signifikantně nižší u králíků krmných dietou s inulinem než u králíků ostatních skupin. U králíků s inulinem byl dále zjištěn signifikantně vyšší molární podíl acetátu a naopak nižší propionátu, stejně jako nižší poměr propionátu k butyrátu. Molární podíl butyrátu byl signifikantně vyšší u králíků krmných dietou s MOS. U králíků s inulinem byla dále zjištěna signifikantně vyšší aktivita inulinasy. Výsledky této práce ukazují na význam fruktanů ve výživě králíků. Vyšší index zdravotního rizika králíků po změně krmné směsi naznačuje, že prebiotika by měla být podávána déle než tři týdny po odstavu.

Studie byla podporována GA ČR (projekt č. 523/03/D011).

LITERATURA

1. Gidenne T., Fortun-Lamothe L.: Anim. Sci. 75, 169 (2002).
2. Gidenne T., Fortun-Lamothe L.: 8th World Rabbit Congress, 846 (2004).
3. Volek Z., Marounek M., Skřivanová V.: J. Anim. Feed Sci. 14, 327 (2005).
4. Maertens L., Aerts J. M., De Boever J.: World Rabbit Sci. 12, 235 (2004).
5. Spring P., Wenk C., Dawson K. A., Newman K. E.: Poultry Sci. 79, 205 (2000).

BIODEGRADACJA TWORZYW WYTWORZONYCH Z POLIMERÓW SYNTETYCZNYCH I MIAZGI ZIEMNIACZANEJ

**ARTUR GRYSZKIN, TOMASZ ZIĘBA, WACŁAW
LESZCZYŃSKI, BEATA DŁUGOKĘCKA**

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra
Technologii Rolnej i Przechowalnictwa*

Zastąpienie powszechnie stosowanych polimerów syntetycznych, tworzywami degradowalnymi ma uzasadnienie w związku z ciągłym przyrostem masy i objętości odpadów na wysypiskach komunalnych i na nielegalnych wysypiskach zlokalizowanych w przypadkowych miejscach. Stanowi to poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego. Przewidywany w Polsce wzrost produkcji opakowań z tworzyw sztucznych na poziomie 10 % rocznie oraz fakt, że aż 98 % odpadów komunalnych trafia na wysypiska utrudniają spełnienie wymagań dotyczących ochrony środowiska obowiązujących w krajach Unii Europejskiej. Tworzywa w pełni biodegradowalne, posiadające dobre właściwości funkcjonalne nie znajdują szerszego zastosowania w produkcji głównie ze względu na wysoką cenę. Okazuje się, że zastosowana jako komponent naturalny skrobia ziemniaczana z powodzeniem może być zastąpiona masą ziemniaczaną. Jest to rozwiązanie sprzyjające obniżeniu kosztów wytwarzania tworzywa przy jednoczesnym zwiększeniu intensywności jego degradacji.

Celem pracy było wytworzenie tworzywa z miazgi ziemniaczanej i polimerów syntetycznych oraz określenie jego zdolności do biodegradacji.

Materiał do badań stanowiły: kompozyt ziemniaczany, wytworzony z miazgi ziemniaczanej - o zawartości 10% skrobi, kopolimeru etylenu z kwasem akrylowym i gliceryny, oraz polietylenu o małej gęstości. Kompozyt i polietylen mieszano w stosunkach 3:7, 5:5, 7:3 i ekstrudowano w temperaturze 140 °C. Proces prowadzono w jednoślismakowym ekstruderze laboratoryjnym DN 20 firmy Brabender za pomocą płaskiej dyszy tworzącej folię. Uzyskane w procesie ekstruzji tworzywo w postaci taśmy poddawano prasowaniu w prasie laboratoryjnej w temperaturze 130 °C. Tak przygotowane tworzywo poddano biodegradacji po przez kompostowanie w ciągu 31 dni w kompoście laboratoryjnym.

W tworzywie przed biodegradacją i po biodegradacji badano: właściwości mechaniczne, rozpuszczalność w wodzie, wodochłonność oraz określono ubytek masy po biodegradacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzić można, że sporządzone tworzywo opakowaniowe ulega biodegradacji, przy czym jej wielkość jest uzależniona od zawartości kompozytu ziemniaczanego w tworzywie. Próbkę tworzywa zmieniły zabarwienie z kremowej, kremowoszarej na szaro-brązową z wyraźnymi oznakami rozwoju mikroorganizmów. Tworzywo zawierające najwięcej

kompozytu z ziemniaka (70 %) po wyjęciu z kompostu i osuszeniu charakteryzowało się bardzo słabą strukturą, co uniemożliwiało dokonania pomiarów jego właściwości mechanicznych. Folia o najmniejszej zawartości kompozytu ziemniaczanego (30 %) po degradacji wykazała się blisko 50 % większą wytrzymałością na rozciąganie oraz blisko 50 % zmniejszeniem jej wydłużenia przy zerwaniu w porównaniu do tworzywa nie poddanego degradacji.

Wodochłonność i rozpuszczalność folii zmieniła się podczas biodegradacji tym bardziej im więcej zawierała ona kompozytu ziemniaczanego. Folia zawierająca 70 % kompozytu ziemniaczanego po 31 dniach biodegradacji osiągała blisko 1,5 raza większą wodochłonność od wodochłonności przed biodegradacją, natomiast rozpuszczalność tego tworzywa zwiększyła się o blisko 10 %.

Masa wszystkich folii zmniejszyła się w czasie biodegradacji, a jej ubytek wahał się od ok. 2,2 % do 15,4 % i był większy w tworzywach o większym udziale kompozytu ziemniaczanego.

BIODEGRADACJA W ŚRODOWISKU NATURALNYM TWORZYWA SPORZĄDZONEGO ZE SKROBI, POLIETYLENU ORAZ KOPOLIMERU ETYLENU Z KWASEM AKRYLOWYM

**TOMASZ ZIĘBA, WACŁAW LESZCZYŃSKI,
ARTUR GRYSZKIN**

*Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra
Technologii Rolnej i Przechowalnictwa*

Optymalnym rozwiązaniem z punktu widzenia ochrony środowiska jest stosowanie opakowań o dobrych właściwościach funkcjonalnych (mechanicznych, barierowych, odpornych na działanie wody itp.) w pełni biodegradowalnych. Stosowanie takich opakowań byłoby możliwe przy niskich kosztach ich otrzymywania. Jak dotąd nie udało się sporządzić tworzyw odpowiadających tym wymaganiom. Rozwiązaniem kompromisowym jest stosowanie do wyrobu materiałów opakowaniowych tworzyw składających się z polimerów syntetycznych i biodegradowalnego polimeru naturalnego.

Celem pracy było określenie zmian właściwości tworzywa z różną zawartością skrobi świadczących o jego biodegradacji w czasie rocznego kompostowania.

Sporządzono tzw. kompozyt skrobi ze skleikowanej skrobi ziemniaczanej kopolimeru etylenu z kwasem akrylowym i gliceryny. Składniki kompozytu mieszano w takich proporcjach, aby stosunek wagowy ilości skrobi do kopolimeru do gliceryny wynosił jak 8 : 2 : 2. Następnie kompozyt łączono z polietylenem. Folia z tworzywa o zawartości 30 %, 50 % i 70 % kompozytu skrobi pocięto na paski o rozmiarach 100 × 10 × 1 mm. Część pasków przetrzymano w wodzie przez 3 doby, a następnie prażono

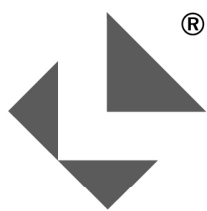
w temperaturze 200 °C. Folie z tworzywa poddane i niepodane obróbce wstępnej umieszczono na okres 1 roku w nowo założonym kompoście. Po 3, 6, 9 i 12 miesiącach przetrzymywania w środowisku degradacji (po obmyciu i obsuszeniu) określono: cechy morfologiczne folii, ubytek masy tworzywa (metodą grawimetryczną), wodochłonność w temperaturze 80 °C, wytrzymałość na rozciąganie i wydłużenie przy zerwaniu. Właściwości wytrzymałościowe tworzywa oznaczono w maszynie wytrzymałościowej Hackert 10/1. Wykonano również zdjęcia spod elektronowego mikroskopu skaningowego wybranych prób tworzyw przy pomocy mikroskopu elektronowego LEO-435VP.

Tworzywo opakowaniowe sporządzone ze skrobi i tworzyw syntetycznych ulegało biodegradacji, przy czym jej wielkość była uzależniona od zawartości skrobi w tworzywie i czasu przetrzymywania w środowisku

degradacji. Ubytki masy oraz wzrost wodochłonności tworzywa poddanego degradacji były większe w próbach o większej zawartości kompozytu skrobi i wzrastały wraz z przedłużaniem czasu jego przebywania w kompoście. Największe zmiany degradacyjne przejawiające się: ubytkiem masy (do ok. 50 %), zwiększeniem wodochłonności (o ok. 200–600 %), pogorszeniem właściwości wytrzymałościowych (o ok. 30–80 %) tworzywa oraz zmianą barwy nastąpiły w tworzywach zawierających 70 % kompozytu skrobi. Zmiany właściwości mechanicznych tworzywa (wydłużenie przy zerwaniu i wytrzymałość na rozciąganie) ulegały znacznym wahaniom w czasie przetrzymywania w środowisku degradacji, co deprecjonuje je jako wskaźniki biodegradacji tworzyw sporządzonych ze skrobi i tworzyw syntetycznych.

Autorský rejstřík

Bieliková M.	749	Kramářová D.	752, 756
Bláha L.	751	Lachká K.	752
Blažek Z.	751	Lenghartová J.	749
Brus J.	757	Leszczyński W.	761
Bubník Z.	758	Lisińska G.	759
Capek P.	753	Lišková D.	753
Černá M.	756	Maciejaszek I.	754
Čopíková J.	747, 758, 759	Macura R.	754
Dandár A.	747	Marounek M.	760
Divers T.	757	Míčková K.	758
Długocka B.	761	Mikulíková D.	749, 752, 755
Domkářová J.	758	Milichovská S.	756
Dostálová J.	747	Milichovsky M.	756
Dvořáček V.	748, 756	Minarovičová L.	747
Ebringerová A.	750	Papoušková L.	748, 756
Faměra O.	748	Pluháčková E.	747
Gotvaldová E.	751	Pour V.	758
Grohens Y.	757	Richter J.	756
Gryszkin A.	761	Rop O.	752, 756
Haasová R.	747	Růžek P.	748
Havelka P.	756	Sedláček T.	748, 756
Havrlentová M.	749	Slováková E.	753
Hirsch J.	750	Sopuch T.	756
Horváthová V.	749, 752, 755	Spěváček J.	757, 758
Hoza I.	752	Surówka K.	754
Hromádková Z.	750	Synytsya Al.	758
Jablonský I.	751	Synytsya An.	747, 758, 759
Kadlec P.	747, 751	Šárka E.	758
Kákoniová D.	753	Šimková D.	758
Kákošová A.	753	Tajner-Czopek A.	759
Kasíková B.	747	Valášek P.	756
Kita A.	759	Veselá A.	758, 759
Kollárová K.	753	Vokál B.	758
Košťálová Z.	750	Volek Z.	760
Kráčmar S.	752	Zięba T.	761
Kraic J.	749, 755		



LABOREXPO

PRAHA · 26.–27. 9. 2007

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE, VYBAVENÍ, POMŮCKY A SLUŽBY LABORATOŘÍ

↻ VÝSTAVA

Jejím cílem je prezentovat dodavatele nejmodernější přístrojové techniky, laboratorního vybavení a širokou nabídku laboratorních pomůcek a spotřebního materiálu, odběratelům z laboratoří v průmyslu, zdravotnictví, ochraně životního prostředí, výzkumu, školství a veřejných službách.

↻ DOPROVODNÝ PROGRAM

Nedílnou součástí výstavy bude doprovodný program zaměřený na moderní trendy v analytické chemii a analýze, vývoji „bioléciv“ a nanotechnologií ve farmacii. Na přípravě programu se podílí Česká společnost chemická a Česká spol. pro biochemii a molekulární biologii.

↻ WORKSHOPY A SEMINÁŘE

V dalších prostorách Kongresového centra probíhají samostatné prezentace vystavovatelů a různé další semináře zaměřené na témata blízká nomenklatuře výstavy.

↻ MÍSTO SETKÁNÍ

V rámci výstavní plochy je vymezen prostor s nabídkou odborných časopisů, postery a místo pro odpočinek a občerstvení návštěvníků.

Místo konání:

KONGRESOVÉ · CENTRUM
PRAHA

Mediální partneři:

Chemické listy • Bulletin ČSBMB • Mlékařské listy • Česká a Slovenská Farmacie • Plasty & Kaučuk • Kvalita potravin • Kvasný průmysl • Katalog Labo.cz • Chemweb.cz • Eurochem.cz • Chemportal.cz • Laboratorium - Przegląd Ogólnopolski • LAB magazine • Laboratoria.net

Organizátor a hlavní mediální partner:

CHEMmagazín
Casopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi

VÍCE INFORMACÍ
REGISTRACE
AKTUÁLNÍ ZPRÁVY

WWW.LABOREXPO.CZ





Česká společnost chemická · Univerzita Palackého
Statutární město Olomouc · SIGMA-ALDRICH – hlavní sponzor



SIGMA-ALDRICH

60. jubilejní sjezd Asociací českých a slovenských chemických společností

Olomouc 1.– 4. září 2008



Foto Blanka Martinovská, archiv města Olomouce



OBSAH		CONTENTS	
ÚVODNÍK	687	EDITORIAL	687
REFERÁTY		REVIEW ARTICLES	
Nové poznatky o výskytu a možném původu přírodních uhlovodíků v Českém masívu	689	Origin of Hydrocarbons in the Bohemian Massif Revisited: New Evidence from Field Observations and Geochemical Composition	689
V. Suchý, M. Stejskal, A. Zeman, I. Sýkorová, J. Kroufek, G. Šebor a J. Janků		V. Suchý, M. Stejskal, A. Zeman, I. Sýkorová, J. Kroufek, G. Šebor, and J. Janků	
Řešení krystalové struktury z RTG práškových difrakčních dat – nespílitelný sen nebo každodenní praxe ?	697	Structure Determination from Powder Diffraction Data – It Is Unrealizable Dream or Daily Use?	697
M. Hušák, J. Rohlíček, J. Čejka a B. Kratochvíl		M. Hušák, J. Rohlíček, J. Čejka, and B. Kratochvíl	
Látky s estrogením účinkem ve vodách	706	Estrogenic Substances in Water	706
H. Kujalová, V. Sýkora a P. Pitter		H. Kujalová, V. Sýkora, and P. Pitter	
Korozní vlastnosti fyzikálně nanášených tenkých vrstev	713	Corrosion Properties of Physically Deposited Thin Coatings (PVD coatings)	713
J. Macák, M. Pazderová, I. Jiríček, P. Malý, K. Olyšar, L. Cvrček a J. Vošta		J. Macák, M. Pazderová, I. Jiríček, P. Malý, K. Olyšar, L. Cvrček, and J. Vošta	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY		LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Fotokatalyticky aktivní membránová separace – Vývoj procesu a laboratorní techniky	722	Membrane Separation Coupled with Photocatalysis Process and Laboratory Instrumentation Development	722
Jar. Přidal, J. Přidal a A. Urban		Jar. Přidal, J. Přidal, and A. Urban	
Antifungální účinek laktobacilov na plesne rodu <i>Fusarium</i> a <i>Aspergillus</i>	730	Antifungal Effect of Lactobacilli on <i>Fusarium</i> and <i>Aspergillus</i> Molds	730
J. Hudáček, Z. Zalán, J. Chumchalová a A. Halász		J. Hudáček, Z. Zalán, J. Chumchalová, and A. Halász	
Detekce bodových mutací v <i>Kirsten ras 2</i> genu metodou locked nucleic acids clamped PCR	738	Detection of Point Mutations in <i>Kirsten ras 2</i> Gene Using Locked Nucleic Acids Clamped PCR	738
M. Beránek, J. Bureš, M. Šácha, L. Sákra, M. Rajman, P. Jandík, E. Rudolf a O. Landt		M. Beránek, J. Bureš, M. Šácha, L. Sákra, M. Rajman, P. Jandík, E. Rudolf, and O. Landt	
RECENZE	742	BOOK REVIEWS	742
POLYSACHARIDY 2007	745	POLYSACHARIDES 2007	745

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 101 (2007), čís./no. 9 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 131, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 117 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT v Praze, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: B. Kratochvíl • REDAKTORI/ EDITORS: J. Barek, Z. Bělohav, P. Drašar, J. Hettflejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové), P. Tarkowski (Olomouc) • KONZULTANT/CONSULTANT: J. Kahovec • VÝKONNÁ REDAKTORKA/ EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: E. Borsig, M. Černá, L. Červený, E. Dibuszová, J. Hanika, Z. Havlas, I. Kadlecová, J. Káš, J. Koubek, T. Míšek, J. Pacák, V. Pačes, O. Paleta, V. Růžička, I. Stibor, V. Šimánek, R. Zahradník • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, fax +420 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel/fax +420 222 220 184, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: České Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2007 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plně předplatné 2007 (12 čísel) 1512 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 756 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 80 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 60 EUR (doručování via SCHS), 225 EUR (individuální doručování) • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG; Annual subscription for 2007 (12 issues) 225 EUR • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete v čísle 1/2002 a na internetu, zkratky časopisů v čísle 10/97 na str. 911 • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Dáno do tisku 28.8.2007.