

Černobyl po 20 letech

Jak zmínily snad všechny sdělovací prostředky, letos v dubnu uplynulo 20 let od černobylské katastrofy. Kromě nesmírně tragických zdravotních, ekologických i hmotných následků pro lidi, přírodu i majetky v blízkém i širokém okolí elektrárny má tato havárie také ohromný důsledek psychologický, a to celoplanetární, totiž ztrátu důvěry značné části lidstva k jaderné energetice. Na jedné straně to přineslo zásadní posílení technologických opatření v ostatních nukleárních zařízeních ve prospěch jejich bezpečnosti, ale na straně druhé to vyvolalo v mnoha státech změnu energetické politiky, odklon od jádra. Tato změna, o níž jsem přesvědčen, že je dočasná, přišla ve velmi nevhodné době, kdy lidstvo čím dál naléhavěji potřebuje omezovat spalování fosilních paliv a zastavit tak v atmosféře růst koncentrace oxidu uhličitého způsobujícího globální klimatické změny.

To, co mě nejvíc zajímá, je stupeň informovanosti v postojích laické veřejnosti vůči jaderné energetice a závislost tohoto stupně na vzdělání. Určitá iracionalita podle mého názoru spočívá v podvědomém spojování jaderných havárií typu té černobylské a jaderných zbrani hromadného ničení. Odhodlal jsem se proto k jakési soukromé amatérské anketě mezi svými přáteli a známými. Na několik desítek adres jsem rozeslal anketní otázku s nabídkou tří odpovědí a poprosil jsem adresáty, aby si jednu vybrali. Těmi adresáty byli většinou lidé, o nichž jsem věděl, že nejsou zaměřeni na přírodní vědy. Naprostá většina z nich však měla vysokoškolské vzdělání, byli mezi nimi právníci, filosofové, ekonomové, muzikologové apod. Dostal jsem 30 odpovědí.

Jsem si plně vědom toho, že moje otázka ani nabízené tři možnosti asi nebyly zcela objektivní a profesionální: nepodařilo se mi zkrátka vymyslet takový systém, který by nebyl „návodný“, který by respondenty nějak neovlivnil. Jistě zafungovala psychologie a oni se asi nedokázali zcela oprostít od úvahy, jakou chci slyšet odpověď. Nejsem odborník na ankety.

Otázka zněla: Domníváš se, že výbuch v Černobylu byl svou podstatou podobnější (a) jadernému výbuchu atomové bomby nebo (b) výbuchu, k jakému dochází např. při úniku plynu v domácnosti nebo (c) byla podstata ještě jiná?

Z oněch 30 respondentů se 19 (tedy plných 63 %) domnívalo, že v Černobylu došlo k jadernému výbuchu, dva odpověděli (c), dva poctivě přiznali, že neví a zbytek se klonil k (b).

O podstatě katastrofy se lze v přehledné formě dozvědět z mnoha zdrojů, doporučuji internet (např.¹). Je třeba zdůraznit, že možnost (a) v žádném případě neplatí, o žádný jaderný výbuch nešlo, ten by měl následky ještě mnohem horší. Správná odpověď je kombinace (b) a (c).

V Černobylu došlo ke dvěma výbuchům těsně po sobě. Ten první byl podobný explozi Papinova hrnce, kdy pře-

hřátá pára, vzniklá z chladicí vody, svým obrovským tlakem odmrštila těžký betonový kryt reaktoru; dalo by se říci, že šlo o proces mechanický, tedy (c). Už předtím ale v reaktoru probíhaly – kromě těch předpokládaných štěpných, jaderných – také dvě chemické reakce: jednak rozklad vody vlivem vysoké teploty na vodík a kyslík, jednak reakce vody s rozžhaveným grafitem (sloužícím v tomto zastaralém reaktoru jako zpomalovač neutronů) za vzniku směsi vodíku a oxidu uhelnatého. Jakmile po prvním výbuchu do reaktoru pronikl dostatek vzduchu, následovala druhá exploze, tentokrát čistě chemická, tedy (b) – explozivní sloučení zmíněných plynů. To, že tento klasický výbuch vynesl do atmosféry tuny radioaktivního materiálu, je jiná věc, ale opakují, že nešlo o bleskovou nukleární štěpnou reakci jako u atomové pumy. To je ostatně u jakéhokoliv jaderného reaktoru principiálně, fyzikálně vyloučeno.

To, co plyne z ankety (byť provedené na malinkém vzorku a s výhradou možná nevhodné formulace otázky), není povzbudivé. Je pravděpodobné, že pokud bychom se dotázali lidí s nižším vzděláním, dostali bychom ještě větší procento odpovědí (a). Jsem si jist, že totéž by platilo v případě respondentů rakouských. Zkrátka mám obavu, že velká část lidí u nás i v Rakousku (a asi na celém světě) se domnívá, že v případě Černobylu šlo o jakousi malou průmyslovou Hirošimu. Z ankety to neplyne, ale někteří lidé, hlavně Rakušané, si určitě myslí, že náš Temelín je tikající bomba. Právě příklad odklonu Rakouska a Německa od jaderné energetiky ukazuje, jak obrovskou politickou silou se iracionalita a nevědomost může stát.

Lze namítnout, že z hlediska těch postižených je jedno, jakým mechanismem byli ozáření. To jistě ano, ale není to jedno při hodnocení rizik moderních jaderných elektráren. Ty mají už zcela jinou konstrukci, která událost podobnou té černobylské naprosto vylučuje (např. už se v nich nepoužívá grafit). Jistě si lze představit lečjakou jadernou havárii, třeba únik radioaktivní vody, ale nikoliv výbuch zmíněného typu.

Kdyby se mě nějaký protijaderný aktivista zeptal, jestli se nebojím exploze Temelína, položil bych mu zdánlivě absurdní protiotázku, zda se nebojím, že se se svým autem zřítí při přistávání na ranvej. Auto nelétá, tudíž nemůže spadnout. Temelín nemá černobylský reaktor, tudíž neexploduje. Ano, Černobyl bylo to staré, špatně konstruované, nebezpečné letadlo s nezodpovědnou posádkou, ale Temelín je dopravní prostředek pozemní, mnohem kvalitnější.

Co s tím? Úvodník v Chemických listech tyto populární omyly jistě nevyvrátí. Ale kolegové jaderní chemici i fyzici by o tom měli mnohem víc psát, ne do odborných časopisů, nýbrž do novin, a znovu a znovu vysvětlovat.

Jiří Podešva

LITERATURA

1. <http://www.volny.cz/kostka2000/Cernobyl.htm>, staženo 26. dubna 2006.

VÝZNAM BÍLKOVIN Z HLEDISKA PĚNIVOSTI A STABILITY PĚNY PIVA

HANA ČÍŽKOVÁ, PAVEL DOSTÁLEK,
JAROMÍR FIALA a IRENA KOLOUCHOVÁ

*Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
hana.cizkova@vscht.cz*

Došlo 13.7.05, přijato 16.3.06.

Klíčová slova: pivo, pěna, stabilita pěny, bílkoviny, hydrofobní polypeptidy

Obsah

1. Úvod
2. Pěna piva – spotřebitelské vnímání, tvorba a stabilita pěny
3. Faktory ovlivňující pěnivost
4. Přehled pěnivostních bílkovin a polypeptidů
5. Látky nebílkovinného charakteru pozitivně ovlivňující pěnivost
6. Látky negativně ovlivňující tvorbu pěny
7. Závěr

1. Úvod

Mezi kvalitativní a kvantitativní znaky charakterizující pivo patří bohatá, hustá a dlouhotrvající pěna, která je i jedním z prvních vjemů vnímaných spotřebitelem. Z fyzikálního hlediska se jedná o disperzi plynu v kapalině. K faktorům pozitivně ovlivňujícím tvorbu a stabilitu pивní pěny patří především bílkoviny, resp. bílkoviny s hydrofobním charakterem. Problematika dostatečné hladiny hydrofobních polypeptidů nabývá významu v souvislosti s postupem výroby piva založeném na přípravě vysokokonzentrovaných mladín a označovaném jako „High Gravity Brewing“ (HGB) technologie, který je doprovázen nižší extrakcí pivovarsky cenných látek z hlediska pěnivosti. Ve sdělení jsou uvedeny významné pěnivostní bílkoviny, jejich obsah v pivovarských surovinách a změny v průběhu výroby piva. Se zřetelem k jednotlivým technologickým krokům je zmíněn obsah látek jak pozitivně, tak negativně ovlivňujících pěnu piva a její trvanlivost. Do první skupiny se řadí látky tvorbu pěny pozitivně ovlivňující – určité bílkoviny, hořké chmelové látky, některé kovové ionty (Mn^{2+} , Al^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} a Cu^{2+}), látky polysacharidové povahy a oxid uhličitý. Do druhé skupiny patří látky působící negativně – lipidy,

bazické aminokyseliny, polyfenoly, proteolytické enzymy, některé kovy (měď v nadměrném obsahu, cín, bismut, molybden, nikl a železo vyvolávající „gushing“ – samovolné přepěňování piva) a do určité míry i ethanol.

Tato práce se zaměřila na roli bílkovin pozitivně ovlivňující pěnivost. Za nejvýznamnější jsou považovány bílkoviny označované jako přenašeče lipidů (Lipid Transfer Proteins – LTP, především LTP1), bílkovina Z (Protein Z), dále bílkoviny vázající lipidy (Lipid Binding Proteins) a další zejména hordeinové frakce. Souhrnně se jedná o bílkoviny vykazující hydrofobní charakter. Problematika pěnivosti a obsahu hydrofobních polypeptidů a bílkovin se dostala do popředí zájmu se zaváděním moderní technologie výroby piva vycházející z výroby koncentrovaných mladín o vysoké hustotě – označované jako „High Gravity Brewing“ (HGB) technologie. Při použití této technologie se ze surovin extrahuje do sladiny méně látek důležitých pro pивní pěnu než při klasickém postupu a během jednotlivých fází výrobního procesu dochází následně k jejich dalším ztrátám. Pro dobrou tvorbu a stabilitu pěny nestačí pouze dostatečná hladina těchto látek bílkovinného charakteru, ale i vyvážený obsah dalších složek piva. Zároveň je třeba brát v úvahu charakteristické vlastnosti výrobku a jednotlivé technologické kroky příslušného výrobního postupu, protože změny zlepšující pěnivost určitým způsobem mohou negativně ovlivnit další kvalitativní parametry produktu. Nezanedbatelným problémem je rovněž fakt, že jednotlivé skupiny konzumentů mají specifické požadavky a pod termínem dobrá pěna si představují do jisté míry odlišnou skutečnost.

2. Pěna piva – spotřebitelské vnímání, tvorba a stabilita pěny

Pro piva českého typu – spodně kvašená – je charakteristické, že po nalití do sklenice vytváří bohatou, stálou pěnu, která ulpívá na skle a zaujímá velký objem¹. Snaha o její dosažení a zlepšení, často spojované s magií a mýty, se datují již od středověku. S rozvojem poznání, vědy a s racionálním přístupem tyto tendence ustávají, ale kompaktní a stabilní pěna je spotřebiteli žádaná stále. Zesílením konkurenčních vztahů zejména v souvislosti s rozšiřujícími se možnostmi exportu roste tlak na výrobce, aby dodávali pivo s dostatečnou chuťovou, koloidní a senzoricou stabilitou. Jedním z prvních faktorů působících na spotřebitele je pěna, zejména u piv točených. Stejně významným pro celkový dojem „po napití“ je pro spotřebitele i prostředí konzumace. S tím souvisí prokázaná skutečnost, že „nespokojenost se šíří mnohem rychleji a snáze než spokojenost“, což je i jedním z důvodů zavádění akreditovaných kontrolních mechanismů, jako jsou HACCP a ISO (cit.²⁻⁴).

Definice pěny a pěnových vlastností

Z fyzikálně chemického hlediska lze pěnu definovat jako disperzi plynu v kapalině, přičemž dispergovanou fází je vždy plyn⁵. Při popisu pěny piva bývají nejčastěji užívány pojmy pěnivost, přilnavost, stabilita, kvantita, hustota pěny a případně charakteristika pěny^{6–9}. Pěnivostí se rozumí schopnost piva vytvářet pěnu při nalití, což je výrazně ovlivněno obsahem oxidu uhličitého v pivu. Schopnost pěny ulpívat po rozpadu nebo poklesu hladiny na stěně sklenice je přilnavost. Tento jev je založen na adhezi a určité „lepivosti“ k materiálu a někdy bývá označován jako kroužkování. Stabilita pěny je dána časem mezi vytvořením pěny a její samovolnou destrukcí, kvantita je množství pěny vytvořené za daných podmínek. Hustota pěny nebo obdobně definovaná charakteristika pěny je objem piva (kapaliny) zadržovaný v pění a její hodnota s rostoucí dobou od nalití klesá. Vzhled pěny a její struktura, tj. krémovitost a jednotnost bublin⁸ jsou dalšími významnými parametry z hlediska spotřebitele, které jsou dány jak fyzikálními faktory, tak chemickým složením piva i tlačného plynu. Bekkers¹⁰ po řadě studií vlastností systému pivo/plyn a na základě moderních měřicích technik uvádí, že jak dynamické povrchové napětí, tak mezipláštní viskozita a elasticita koreluje se stabilitou pěny.

Tvorba a rozpad pěny

Vznikem a rozpadem pěny se zabývala řada autorů. Ronteltap a spol.¹¹ podrobně zkoumali pěnu z fyzikálního hlediska. Tvorbu a rozpad pěny rozdělili na čtyři klíčové kroky – tvorbu bublin, odvodňování pěny, její koalescenci a disproporcionaci. Za nejvýznamnější mechanismus tvorby pěny lze považovat heterogenní nukleaci – formování bublin nápoje přesyceného oxidem uhličitým v tzv. nukleačních (katalytických) polohách – to znamená, že bublinky nevznikají samovolně, ale tvoří se již na existující bublince. Nukleační polohou může být např. i plynem vyplněná prasklina či štěrbinová ve stěně nádoby. Pokud je povrch bubliny v této „kapse“ úplně smáčen okolní kapalinou, bude povrch bubliny konkávní jako výsledek její snahy o co nejmenší povrch. Tlak plynu uvnitř bubliny je větší než v dotýkající se kapalině, bublina praskne a plyn se v kapalině postupně rozpouští. Výsledkem je inaktivace nukleační polohy. Pokud však povrch bubliny v nukleační poloze není kapalinou smáčen, její povrch je konvexní a bude docházet k transportu plynu z přesycené kapaliny do plynové „kapsy“ a růstu bubliny^{12,13}. Transport plynu z piva do bubliny probíhá pouze difúzí, protože Laplaceův tlak uvnitř bubliny (800 Pa při poloměru 0,1 mm) je zanedbatelný oproti přesycení piva (0,3–0,4 MPa). Nízká povrchová tenze piva vede k menším a jednotným bublinám, z čehož vyplývá žádoucí krémovitý charakter pěny. Odvodňování pěny je jev, při kterém dochází ke ztrátě kapaliny z piva vlivem gravitace a podtlaku, kdy v hraniční vrstvě vzniká nižší tlak než uvnitř bublin a v kapalinovém filmu a dochází ke ztenčování kapalinových filmů mezi bublinami. Proti tomuto jevu působí složky s hydrofobním

charakterem a složky zvyšující viskozitu. V průběhu ztenčování kapalinových filmů mezi bublinami může dojít až k prasknutí filmu mezi bublinami a ke spojení dvou menších bublin v jednu větší, jevu, který je popisován jako koalescence. Větší bubliny jsou vizuálně méně žádané a navíc způsobují další destrukci pěny. Koalescenci zvyšují látky lipidické povahy, původem především z varního procesu¹⁴. Disproporcionace je jev, při kterém dochází k difuzi plynu z menších bublin do větších^{9,13}. Hnací silou tohoto jevu je menší (Laplaceův) tlak ve větších bublinách (tlak uvnitř bublin je nepřímo úměrný jejich průměru) a z Henryho zákona vyplývající zvyšování rozpustnosti plynu s tlakem. Ve svrchní vrstvě pěny dochází k difuzi oxidu uhličitého do okolní atmosféry a k difuzi kyslíku a dusíku dovnitř bublin. Oba tyto plyny jsou v pivu mnohem méně rozpustné, dochází ke zmenšování bublin ve svrchní části a vzniká prostor pro přítomnost bublin ve spodních vrstvách pěny. To by bylo předpokladem možnosti používání dusíku jako inertního plynu při skladování piva a jako tlačného plynu pro čepování, nedostatečný říz piva^{11,12} je však důvodem pro používání směsi oxidu uhličitého a dusíku.

Modely struktury pивní pěny

Mezi základní modely popisující strukturu pивní pěny patří model Asana a Hashimota¹⁵, model dle Simpsona a jeho rozšíření o vliv hydrofobních interakcí^{16,17}. Model Asana a Hashimota je založen na faktu, že stabilita pěny je výsledkem přitažlivého působení mezi záporně nabitými chmelovými iso- α -kyselinami (podle těchto autorů i α -kyselin) a kladně nabitými aminoskupinami v polypeptidech pěny. S tím a s jejich začleněním do uvedeného modelu nesouhlasí Simpson a spol.¹⁶, kteří uvádí, že při pH 4,2 je ionizováno přibližně 90 % molekul iso- α -kyselin, ale jen pouze 13 % α -kyselin, z čehož vyplývá jejich omezení v účasti na zmíněném modelu struktury pивní pěny. Model těchto autorů vychází z představy o vazbě dvou molekul iso- α -kyselin přes stejný dvojmocný kation kovu, čímž se zvyšuje afinita hořkých kyselin k aminoskupinám peptidů. Vazebné síly, které reverzibilně spojují pěnové polypeptidy k sobě přes chmelové hořké látky a kationty kovu, nejsou iontové povahy, přesto jsou kladné náboje na aminoskupinách polypeptidů nutné. Bez nich dojde k eliminaci iontových dipolových vazeb mezi aminoskupinami peptidů a karbonylovými skupinami hořkých kyselin. S názorem o pozitivním vlivu kovových iontů polemizuje Evans⁹, který uvádí pozitivní korelaci mezi koncentrací dvoumocných kovů ve sladu a pěnivostí, ale už ne mezi koncentrací těchto kovů v pivu a pěnivostí. Pro hořčnaté ionty ji studoval Bamforth a spol.¹⁷ a zjistili, že schopnost isomerovaného chmelového extraktu (od určitých koncentrací) zvyšovat pěnivost je hořčnatými ionty potlačována. Roberts¹⁸ a Simpson spolu s Hughesem¹⁶ uvádí existenci dalších interakcí mezi chmelovými hořkými kyselinami a pěnovými polypeptidy – hydrofobních vazeb mezi postranními řetězci chmelových kyselin a hydrofobními aminokyselinovými zbytky v polypep-

tidech, což bylo dokumentováno na přidavku upravených iso- α -kyseliny, jako jsou dihydro-, tetrahydro- a hexahydro iso- α -kyselin na principu zvýšení hydrofobicity těchto řetězců.

3. Faktory ovlivňující pěnovost

Pivo je nápoj obsahující široké spektrum látek pocházejících z použitých surovin, prostředí, technologického zařízení, či které jsou součástí některých přídatných látek. Řada z nich má pozitivní nebo negativní vliv na pěnu piva. Existují látky pro pěnu nezbytné i takové, které nejsou bezpodmínečně nutné, nebo stačí jen v určitých koncentracích. Obdobně je to s látkami s negativním vlivem – zatímco řada z nich škodí vždy, jiné lze v určitém množství tolerovat⁶.

Pozitivně působící látky se při tvorbě pěny kumulují v mezifázovém prostředí a zpevňují povrchovou blanku bubliny mezi kapalinou a pěnou. Jde o látky amfifilní podstaty, jejichž hydrofobní část směřuje do plynu a hydrofilní do kapaliny, které interagují s dalšími a společně tvoří vnitřní kostru pěny, látky snižující povrchové napětí a zvyšující viskozitu piva^{6,9}. Podle Ronteltapa¹¹ nižší teploty působí zvýšení viskozity piva a zpomalování odvodňování pěny. Nejčastěji sem jsou řazeny určité bílkoviny a polypeptidy, hořké chmelové látky, uvedené kovové ionty (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} a Al^{3+}), polysacharidy, produkty reakcí sacharidů a bílkovin a oxid uhličitý. Mezi látky negativně ovlivňující pěnovost patří především ty, které zabraňují pozitivně působícím látkám jejich přechodu do pěny a svou povrchovou aktivitou vytěšňují pěnотvorné látky z povrchového filmu bubliny. Výsledkem je jeho zeslabení, zrychlení odvodňování pěny a spojování bublin. Jedná se zejména o lipidy, bazické aminokyseliny, proteolytické enzymy, uvedené kovové ionty (měď v nadměrném obsahu, cín, bismut, molybden, nikl a železo), ethanol a polyfenoly^{6,9}.

Látky bílkovinného charakteru v pivu

Bílkoviny, které jsou hlavní komponentou stabilizující pěnu (pěnovostně pozitivní bílkoviny), mají hydrofobní strukturu, která usnadňuje přechod bílkovin do pěny a umožňuje v mezifázovém rozhraní orientaci bílkoviny do bubliny plynu^{19–21}. Obsah dusíkatých látek je důležitou technologickou hodnotou ječmene určeného ke sladování – slad obsahuje 7 až 16 % bílkovin, přičemž 80 % proměnlivosti znaku je dáno agroekologickými podmínkami daného ročníku²². Některé nově zaváděné (s odlišnými genetickými znaky) zahraniční odrůdy se nehodí pro výrobu českého piva. Pivo z nich má vyšší stupeň prokvašení a horší pěnovost²³. Vývoj a použití nových odrůd ječmene, které pozitivně ovlivňují stabilitu pěny piva a jeho vůni, uvádí Hirota a spol.²⁴, a to na základě sníženého obsahu enzymu lipoxygenasy (lipoxygenase-1-less variants – označované LOX-less odrůdy) a inkorporaci LOX-less znaku do vybraných odrůd. Chmelové bílkoviny tvoří 15

až 20 % sušiny²². Obsah dusíkatých látek ve sladince a mladině vyrobené v procesu rmutování a chmelovaru má rozhodující vliv na růst a aktivitu kvasinek, pěnovost, chuť a stabilitu piva. Stejně významný je obsah dusíkatých látek u surogátů přidávajících se místo části sladu do rmutu^{9,25}.

Bílkoviny jsou v průběhu výrobního procesu štěpeny různou měrou podle struktury, konfigurace a obsahu nebílkovinných částí. Některé typy bílkovin, obsažených v pivovarských surovinách, do piva vůbec nepřechází. Je to způsobeno jejich vlastní nerozpustností ve vodě a rovněž odolností k štěpné aktivitě enzymů. Mezi tyto látky patří např. gluteliny, které odcházejí z výroby s mlátem²³. Během sladování jsou bílkoviny využívány k výstavbě základů rostlinných těl – ke tvorbě kořínků a stříčky zrna. Proto je obsah ve sladu nižší přibližně o 0,3 % oproti obsahu bílkovin v ječmeni. Do rozpustné formy je převedeno během klíčení asi 35 až 40 % bílkovin. Působením hydrolytických enzymů (peptidas) vznikají látky s nižší až velmi nízkou molekulovou hmotností ve srovnání s původními bílkoviny. Obsah pěnотvorných bílkovin během sladování roste a jejich štěpné produkty jsou esenciálními faktory pro kvasničné buňky, nízký obsah štěpných produktů v mladině negativně ovlivňuje průběh kvašení. Vysoká aktivita těchto enzymů představuje opačný extrém, kdy výsledný nízký obsah bílkovin, jako přirozených stabilizátorů piva, způsobuje zhoršení kvality pěny²⁶. Během rmutování pokračuje enzymové štěpení bílkovin na jednodušší frakce, často lépe rozpustné v mladině než původní bílkoviny a dochází k vysrážení většiny vysokomolekulárních bílkovin. Během dalšího technologického procesu dochází k jejich adsorpci na povrchu kvasinek, či k vynášení bublinkami oxidu uhličitého do kvasných dek.

Vliv technologického postupu na obsah bílkovin v pivu

Znakem doprovázejícím technologii výroby piva z vysoko koncentrovaných (High Gravity – HG) mladin (původní koncentrace mladin 15–25 % hm.) je ve srovnání s pivem vyrobeným standardním způsobem z mladin s původní koncentrací 10–15 % hm. (Low Gravity – LG) mladin nižší obsah bílkovin a jejich fragmentů účastnicích se tvorby pěny v pivu²⁷. Faktorem, způsobujícím u piv vyrobených z vysoko koncentrovaných mladin problémy s pěnovostí, je nízký obsah hydrofobních bílkovin. Ten je ovlivněn především nižší extrakcí těchto sloučenin do vysoce koncentrovaných sladů a mladin již ve fázi rmutování a chmelovaru, kde je pak obsah pěnотvorných bílkovin jen nepatrně vyšší než u sladů a mladin níže koncentrovaných, a dále naředěním hotového piva vodou, ke kterému dochází při úpravě na požadovanou původní koncentraci mladiny²⁸. Jedním z důvodů zhoršení extrakce během rmutování je zvýšení teploty procesu, které katalyzuje jejich srážení a vylučování ve formě polyfenol-polypeptidových komplexů, dalším je vysoký obsah polyfenolů – při HGB technologii pro dostatečný obsah hořkých látek je nutná zvýšená dávka chmele²⁹. K podstatné ztrátě hydrofobních polypeptidů dochází při HGB techno-

logii během kvašení. Snižování koncentrace pěnovostních bílkovin bylo podrobně zkoumáno Breyem a spol.³⁰, kteří se zaměřili kromě procesu kvašení i na dokvašování a studovali faktory způsobující snížení koncentrace pěnovostních bílkovinných frakcí v této fázi výroby piva. Jako první popsali ztráty adheze na stěny kvasných nádob a adsorpci na kvasinky. Při této adsorpci ale nedochází k zásadnímu poklesu a lze předpokládat, že adsorpce má malý význam ve srovnání se ztrátou způsobenou chladovým srážením a aktivitou proteinasy A. Při kvašení dochází obecně ke vzniku koncentračního gradientu hydrofobních polypeptidů v kvasné nádobě, protože na povrchu je výsledná koncentrace několikanásobně vyšší než na dně. Příčinou nejsou fluidně-mechanické vlastnosti kvasných nádob, protože stejný gradient nebyl zjištěn u dalších látek, jako jsou volný aminodisík a polyfenoly. Jev lze podle autorů vysvětlit interakcí hydrofobní části polypeptidu s plynnou fází bubliny oxidu uhličitého a jejich následnému vynášení k povrchu. K poklesu dochází během transportu piva z kvasných do ležáckých nádob, kdy se obvykle čerpá ode dna, a tak složky obsažené na povrchu se postupně dostanou ke kontaktu s celými stěnami nádob a mohou na nich ulpívat. Dominantním faktorem způsobujícím ztrátu polypeptidů je chladové srážení a vznik chladového zákalu při chlazení mladiny na požadovanou zákvasnou teplotu po chmelovaru. Zákál je tvořen malými částicemi o průměru 0,5 μm , pomalu sedimentujícími, které obsahují přibližně 50 % bílkovin, 15 až 25 % polyfenolů a 20 až 30 % sacharidů. Výsledkem je snížení dostupnosti substrátu pro proteinasu A a vzhledem k tomu, že jde o endoproteasu, tak i v nízké koncentraci může způsobit snížení stability pěny^{27,30}. Její množství a především aktivita závisí na použitém kmenu kvasinek a jeho citlivosti na stresové podmínky (vyšší osmotický tlak, vyšší obsah ethanolu). Proteinasa A je vylučována kvasinkami ve větší míře při kvašení vysoce koncentrovaných (High Gravity – HG) mladin než nízk koncentrovaných (Low Gravity – LG) mladin – zákvasná dávka je zde vyšší, aby došlo k přiměřenému prokvašení za optimálně dlouhou dobu. Část hydrofobních polypeptidů je vůči proteinase A rezistentní, zejména pěnovostní bílkovina LTP. Působení proteinasy A v dalších fázích skladování lze eliminovat pasterací produktu.

4. Přehled pěnovostních bílkovin a polypeptidů

Jak již bylo uvedeno, významné bílkoviny z hlediska pěnovosti piva mají hydrofobní strukturu. Podle rostoucí hydrofobicity byly rozděleny pomocí hydrofobní interakční chromatografie na řadu frakcí na základě jejich přesné specifické hmotnosti. V devadesátých letech sem autoři přiřadili látky s molekulovou hmotností v rozsahu přibližně 9 až 18 kDa, 40 kDa a hmotností vyšší než 90 kDa (cit.^{27,28}). Evans a spol.⁹ vytvořili nový přehled bílkovin pozitivně působících na pěnu. Dělí je na dvě významné skupiny podle molekulové hmotnosti – na HMW (High Molecular Weight) a LMW (Low Molecular Weight)

bílkoviny. Do HMW frakce zařadili převážně bílkoviny v rozsahu molekulových hmotností 35 až 50 kDa a do frakce LMW řadí bílkoviny s molekulovou hmotností 5 až 15 kDa. Pouze malá skupina bílkovin má vyšší molekulovou hmotnost než 50 kDa. LMW a HMW bílkoviny pochází především ze sladu. Studie Hughese a Wildeho¹⁹ připisují části bílkovin s velmi vysokou molekulovou hmotností (cca 200 kDa) původ v kvasnicích. Další autoři pomocí imunochemických metod používajících monoklonální protilátky prokázali, že většina hydrofobních bílkovin má původ ve sladu. HMW frakce obsahuje převážně protein Z a LMW frakci tvoří LTP1 (Lipid Transfer Protein 1) a směs hordeinových a glutelinových fragmentů^{31–33}. Společnou vlastností uvedených složek je jejich stabilita v průběhu sladařského a pivovarského procesu a odolnost především k vyšším teplotám, extrémním hodnotám pH a proteolýze. Leisegang a Stahl³⁴ izolovali pěnu stabilizující bílkoviny (LTP1, protein Z) z různých surovin, meziproductů a produktů výroby (ječmen, slad, mladina a pivo) a potvrdili negativní korelaci mezi aktivitou proteinasy A a stabilitou pěny piva. Stabilitu pěny mohou negativním způsobem ovlivnit karboxyl proteinasy (proteinasa A a pepsin) i serin proteinasa (karboxypeptidasa Y). Podle těchto autorů protein LTP1 v pivu je substrátem pro proteinasu A, zatímco protein Z degradaci nepodléhá, i když k proteinasové inhibici jsou LTP1 a protein Z částečně homologní. Citlivost LTP1 k proteinase A během sladování a varního procesu vzrůstá. Za významný faktor označili typ proteinové modifikace indukované změnou sekundární struktury proteinu vlivem teploty (denaturace, glykosylace, Maillardovy reakce). Zlepšení pěnovosti může být zvýšeno glykosylací bílkovin za vzniku glykoproteinů. Tyto glykoproteiny lze zařadit mezi produkty Maillardových reakcí, ke kterým dochází při vysokých teplotách v průběhu sladování a varního procesu^{3,4}.

Protein Z

Protein Z představuje 10 až 25 % všech nedialyzovatelných bílkovin piva a je přibližně z jedné třetiny glykosylován. Je to ječná albuminová bílkovina o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa, která patří do HMW frakce, mezi ječné serpiny (Serine Proteinase Inhibitors) a je tvořena několika homologními proteiny. Kaersgaard a Hejgaard³⁵ ho jako první bílkovinu spojili se stabilitou pивní pěny, ve stabilitě pивní pěny mu přisuzuje určitou roli i Curioni³⁶. Maeda³⁷ potvrdil její význam (na základě isoelektrického bodu ($\text{pI} = 4,0\text{--}5,5$) blízkého hodnotám pH piva) při tvorbě pevné konformace v povrchovém filmu a minimální hodnoty povrchového napětí v isoelektrickém bodě, což vede ke stabilizaci pěny. Naopak Evans³⁸ při odstranění frakce o molekulové hmotnosti 40 kDa na imunoafinitní koloně zjistil, že důsledkem je jen minoritní ztráta pěnové stability (asi 10 %). Z toho vyplývá, že účast proteinu Z na stabilitě pěny je pravděpodobně závislá na charakteru sladu. Evans prokázal, že účast proteinu Z4 na stabilitě pěny je významná převážně u sladů s nižším Kolbachovým číslem (30 až 37 %). Vaag a spol.³² zjistili, že

imunoafinitní odstranění proteinu Z má malý vliv na pěnovost u sladů s nízkým proteolytickým rozluštěním (nedoluštěných) sladů a naopak velký vliv u hlouběji proteolyticky rozluštěných (přelouštěných) sladů. Protein Z4 (BSZ4) je kódován jedním z mnoha genů na chromosomu 4 a je částečně homologní (asi ze 70 %) k proteinu Z7 (BSZ7), který je kódován na posledních dvou genech chromosomu 7. BSZ4 je dominantní formou a tvoří cca 80 % proteinu. V zrně je přítomen ve třech formách – volné, vázané a skryté³³. Část vázané a skryté formy se transformuje během klíčení do formy volné, která snáze přechází do sladiny během rmutování. Interakcemi mezi serpiny a proteasami dochází k nedisociačnímu štěpení v reaktivní smyčce označované RSL, při kterém dojde k odštěpení přibližně 40 aminokyselin z karboxylového konce bílkoviny. Štěpení je doprovázeno konformačními změnami a formováním proteolyticky a tepelně stabilních forem proteinu Z. V ječmeni je BSZ7 v neštěpené formě, zatímco protein BSZ4 je už z významné části takto rozštěpen. V průběhu klíčení a hvozdní přechází do stabilní formy především vázaný BSZ7 a nerozštěpený BSZ4.

Lipid Transfer Protein 1

Lipid Transfer Protein (LTP1) – polypeptid – intracelulární přenašeč lipidů – je na základě své hmotnosti 9660 Da řazen do LMW frakce. Jedná se o albuminovou bílkovinu, u které byla prokázána schopnost inhibovat sladové cysteinové endoproteasy^{9,25}. Během procesu sladování je přeměňován v minimálním rozsahu. Mezi obsahem LTP1 v ječných zrnech a zeleném sladu nejsou významné rozdíly, vzhledem k tomu, že se tvoří během klíčení a až v průběhu hvozdní dochází k určité ztrátě (7 až 37 %). K výrazným změnám nedochází ani během rmutování. Této stabilitě pravděpodobně napomáhají čtyři disulfidické můstky, které spojují čtyři α -helikální části této bílkoviny. Charakteristická je u této bílkoviny její téměř okamžitá extrakce při rmutování, a proto nezávislost na použité technologii sladování a rmutování. Ke změnám ve struktuře LTP1, tj. k oxidaci methioninového zbytku na methioninsulfoxid, dochází během chmelovaru, kdy vzniká více forem modifikované LTP1. Tyto formy mají stejnou sekvenci aminokyselin, vykazují převážně lepší pěnovostní vlastnosti a liší se ve struktuře, isoelektrickém bodě a v molekulové hmotnosti (9600 až 9900 Da)^{39,40}. Během modifikací dochází k irreverzibilní denaturaci a ke změnám v imunoreaktivitě. Evans a spol.⁴¹ uvádí, že obsah LTP1 koreluje především s množstvím vytvořené pěny, méně s její stabilitou. Podle těchto autorů má LTP1 vynikající schopnost pěnu generovat, ale slabší ji stabilizovat. Spojením LTP1 s izolovanou LMW hordein-glutelinovou pěnovou frakcí nebo s HMW frakcí se ale dosáhne dobré kvantitativní i stability pěny. Lusk a spol.⁴², kteří použili k měření pěnovosti odlišnou metodu, naopak uvádí, že LTP1 pěnovou stabilitu významně podporuje. Transformací LTP1 z ječmene do pěnotvorných proteinů v průběhu rmutování a chmelovaru a vazbou mezi biochemickým a fyzikálně-chemickým schématem se zabývali Perrocheau

a spol.⁴³, kteří poukázali na vliv Maillardových reakcí na změnu povrchové aktivity proteinů a jako jeden z možných mechanismů zvýšení jejich stability označili acylaci, které se účastní lipidy a enzymy zárodku.

Bílkoviny vázající lipidy

V ječmeni a sladu jsou dále obsaženy bílkoviny vázající lipidy (Lipid Binding Proteins – LBP), bílkoviny o hmotnosti přibližně 13 kDa. Jsou vázané na buněčné membráně a extrahovatelné detergenty. Jejich společnou vlastností je inhibice destabilizačních vlivů lipidů^{44–46}. Hlavní skupinou těchto proteinů jsou hordeindoliny (HIN) v ječmeni a puroindoliny (PIN) v pšenici. Jsou silně hydrofobní a tudíž mají potenciálně pozitivní vliv na pěnu. Během rmutování jsou však hordeindoliny z podstatné části štěpeny proteolytickými enzymy na štěpy o nižší molekulové hmotnosti, (podobně jsou štěpeny i puroindoliny) a pěnovost piva významně neovlivňují. Bílkoviny vázající lipidy byly v imobilizované formě jako náplň kolon použity ke studiu látek s negativním vlivem na pěnovost piva a zlepšení pěnovosti piv s nadměrným obsahem lipidů⁴⁷.

Hordeiny

Hordeiny – hlavní zásobní bílkoviny ječmene – se skládají z polymorfní směsi několika složek oddělitelných např. elektroforézou na polyakrylovém gelu. Základní skupiny jsou značeny B, C, D a γ a představují vysokomolekulární (> 51 kDa), středněmolekulární (29 až 51 kDa) a nízkomolekulární (< 29 kDa) látky. Významná skupina hordeinových derivátů má hmotnost nižší než 5 kDa (cit.^{9,48}). Jsou relativně bohaté na prolin a glutamin. V negativním smyslu se podílí na vzniku koloidních zákalů piva. Z hlediska vlivu na pěnovost nejsou zatím zcela prozkoumány. Jedním z identifikovaných hordeinových štěpů je polypeptid o hmotnosti cca 23 kDa. Koncentrace tohoto peptidu v pění je 2,7× vyšší než v pivu, má lepší povrchově aktivní vlastnosti než celkové proteiny nebo jiné hordeinové fragmenty a pozitivně ovlivňuje pěnovostní vlastnosti piva. Vaag a spol.⁴⁹ identifikovali další LMW hordeinový fragment o molekulové hmotnosti 17 kDa. Tento polypeptid je extrémně bohatý na glutamin a obsahuje šest disulfidických můstků. Byl klasifikován jako nový typ hordeinu (ϵ -1-hordein). Jeho sekvence od konce s volnou aminoskupinou je podobná hordeinovému fragmentu o molekulové hmotnosti 23 kDa. Izolaci a existenci dalších hordeinů o hmotnosti 18 kDa až 33 kDa uvádí např. Bamforth a spol.⁵⁰.

5. Látky nebílkovinného charakteru pozitivně ovlivňující tvorbu pěny piva

Jak již bylo uvedeno, hořké chmelové látky patří spolu s bílkoviny k nejdůležitějším složkám podporujícím pěnovost piva. V pění se vyskytují převážně iso- α -hořké

kyseliny – především *cis*- a *trans*- formy isohumulonu, isokohumulonu a isoadhumulonu, vznikající isomerací α -kyselin při chmelovaru^{16,25}. Dalšími hořkými látkami jsou produkty přeměn iso- α -hořkých kyselin – oxidované formy označované abeo-iso- α -kyseliny, hydrogenované (redukované) dihydro-, tetrahydro- a hexahydro-iso- α -hořké kyseliny, či hydrolyzované formy (např. kyselina humulinová). Oxidované formy vznikají především při chlazení horké mladiny, mají slabší hořkost, ale příznivě ovlivňují zejména přilnavost pěny. Účinek hydrogenovaných forem je založen na zvýšení hydrofobicity, v případě jejich nadměrného výskytu však Bamforth⁵¹ uvádí tvorbu atypických a vizuálně nevzhledných pěn. Pozitivní vliv iso- α -hořkých kyselin na hydrofobní proteiny klesá podle něho s rostoucí hydrofobicitou a od určitých hodnot i s koncentracemi těchto kyselin. Účinek hořkých látek spočívá převážně v křížových interakcích s bílkovinami pěny, čímž je vytvářen základ kostry pěny, dále ve snižování povrchového napětí a zvyšování viskozity⁹. Rozsahem vlivu koncentrace hydrofobních polypeptidů v pění, složení iso- α -kyselin a obsahu maltosových oligosacharidů v pívu na stabilitu pěny se v současnosti zabývá řada pracovišť⁵².

Účinek kovových iontů byl zmíněn při popisu struktury pěny, jako významná součást modelu struktury pění podle Simpsona¹⁶, ve kterém jsou bílkoviny propojeny přes hořké chmelové látky a dvoumocné kationty, které mají vyšší afinitu k iso- α -hořkým kyselinám, než jednomocné. Uvedena byla polemika Bamforth a spol.¹⁷ o pozitivním účinku dvoumocných iontů na pěnívost a poznatky Evance a spol.⁹, kteří poukázali na pozitivní korelaci mezi obsahem iontů (Cu, Zn, Ca, Mg a Al) ve sladu a pěnívostí piva, ale ne mezi obsahem v pívu a pěnívostí. Účinek kovových iontů nemusí spočívat přímo v jejich účasti, ale v možnosti ovlivnit sekreci kvasinkových proteas. V souvislosti s některými ionty těžkých kovů je třeba uvést, že již v koncentraci několika $\mu\text{g l}^{-1}$ vyvolávají „gushing“ – samovolné přepěňování piva. Mezi tyto kovy jsou řazeny cín, bismut, molybden, nikl a železo^{53,54}.

K látkám polysacharidové povahy významným z hlediska pěnívosti patří β -glukany, pentosany, gumovité látky a melanoidiny. Zvyšují plnost chuti a viskozitu²², zpomalují odvodňování pěny a zlepšují její stabilitu^{22,33}. Evans a spol.⁹ uvádí pozitivní korelaci mezi viskozitou a stabilitou pěny, vyjádřenou jako RHRV (Rudin Head Retention Value), stejně jako mezi obsahem neštěpitelných polysacharidů (β -glukanů a pentosanů) a hodnotou pěnívosti. Zvyšování obsahu těchto látek není však vhodné z hlediska negativního vlivu na rychlost procesu scezování a filtrace piva. Melanoidiny a glykosylované bílkoviny vznikající při hvozdní sladu během Maillardových reakcí zvyšují viskozitu^{8,9} a podporují pěnívost na základě iontové vazby s bílkovinami při tvorbě kostry pěny⁵³. Obdobný vliv – zvyšování viskozity – má i polysacharid propylen-glykolalginát (PGA). Vazbou s bílkovinami ve stěnách bublin omezuje kontakt s nežádoucími lipidy, snižuje odvodňování a zvyšuje hydrofobicitu proteinů piva, jeho přídavek však není v souladu se zákonem o čistotě piva^{9,19}.

6. Látky negativně ovlivňující tvorbu pěny piva

Přítomnost látek negativně ovlivňujících tvorbu pěny piva má za důsledek vznik nestabilní, nevzhledné, nerovnoměrné, či nedostatečné pěny. Tyto látky interagují se stavebními složkami kostry pěny a tak jim zabraňují v její tvorbě, nebo tuto strukturu destrukují, snižují viskozitu a zvyšují povrchové napětí. Patří sem lipidy, bazické aminokyseliny, proteasy, polyfenoly, ethanol a některé kovové ionty, které zároveň působí toxicky na kvasinky (Cu, Ni, Cd, Pb). Lipidy představují nesourodou skupinu látek, které jsou charakteristické špatnou rozpustností ve vodě, ale naopak dobrou rozpustností v nepolárních rozpouštědlech. Za hlavní zdroje lipidů jsou považovány suroviny (chmel, slad a kvasnice), ze kterých přecházejí během varného procesu do mladiny⁴⁷. Možným zdrojem lipidů je i nápojové sklo (kontaminace skla látkami lipidové povahy) a zbytky mycích prostředků, které negativně ovlivňují stabilitu pěny obsaženými detergenty. Během výrobního procesu dochází k podstatnému snížení hladiny lipidů – kromě účasti při výživě kvasnic jsou vázány na sladové a chmelové mláto, hrubý a jemný kal, povrch kvasnic a mohou být zachyceny při filtraci. Účinek lipidů spočívá v interferenci s hydrofobními regiony bílkovin obklopujících bubliny pěny, čímž se stávají bubliny nestabilní a dochází k urychlení rozpadu pěny^{4,9}. Wilde a spol.⁵⁵ uvádí, že lipidy destabilizují pěnu nepřímo úměrně stupni hydrofobicity, přičemž pěnívost směsi nejhydrofobnějších skupin proteinů snižují minimálně. Negativní účinek na přilnavost pěny je přisuzován rovněž částí nízkomolekulárních dusíkatých látek, především bazickým aminokyselinám⁵⁶. Tento účinek roste od histidinu přes lysin k argininu, což pravděpodobně souvisí se zvyšujícím se isoelektrickým bodem těchto aminokyselin a jejich interakcí s iso- α -hořkými kyselinami. Ethanol nemá jednoznačný vliv na pěnívost piva, zároveň je to ale jedna ze základních složek z hlediska charakteru výrobku a požadavků konzumenta, jejíž obsah je dán typem piva a není vhodné ji výrazným způsobem měnit. V nižších koncentracích (1 až 3 % hm.) příznivě ovlivňuje stabilitu a přilnavost pěny tím, že zvyšuje viskozitu piva a snižuje povrchové napětí. V koncentracích do 10 % hm. se jeho negativní vliv neprojevuje^{3,8}. Podle Bamforth a spol.⁵¹ a Brierleyho a spol.⁵⁷ ethanol není schopen spojit přiléhající hydrofobní polypeptidy v pěnovém filmu a podporovat souvislou kostru pěny. Z proteolytických enzymů negativně ovlivňujících pěnívost je nejvýznamnější proteinasa A, která především štěpí pěnívostní bílkoviny při hodnotě pH 4–5. Zdrojem proteas jsou jak autolyzované kvasinky, tak jsou proteasy zároveň vylučovány živými buňkami do mladiny během kvašení. Intenzita se zvyšuje při stresových podmínkách kvašení, s rostoucí teplotou a zákvasnou dávkou^{58,59}. Nedostatek kyslíku v mladině vyvolává rovněž zvýšené vylučování proteinasy A do mladiny. Důležitým faktorem je proto použitý kmen kvasinek a zvolená technologie výroby⁶⁰. Polyfenoly jsou látky rovněž ovlivňující pěnu piva a její stabilitu²². Evans⁹ uvádí negativní korelaci mezi obsahem polyfenolů a pěnívostí piv, Bam-

forth⁶¹ ale předpokládá tvorbu křížové vazby polymerizovaných polyfenolů s pěnovostními proteiny, což by umožnilo stabilizaci pěny.

7. Závěr

Pěna piva představuje významnou složku podílející se na výsledném vizuálním dojmu, přitažlivosti a jedinečnosti tohoto nápoje. Přes rozsáhlé studie není dosud problematika stability pивní pěny zcela objasněna. Existuje řada fyzikálních a chemických faktorů, vzájemně interagujících, které ovlivňují pěnové vlastnosti piva – schopnost tvorby pěny a její výslednou stabilitu. Dosažení stabilní pěny závisí na přítomnosti komponent stabilizujících pěnu, zejména amfifilních polypeptidů, ale zároveň je podmíněno fyzikálním stavem bublin pěny, především fenoménem jejich disproporcionace. Suroviny představují rizikový faktor z hlediska zachování kvality piva, který však lze minimalizovat zvýšenou pozorností při jejich výběru a volbou technologických parametrů procesu⁶².

Mezi poznané a experimentálně prokázané látky, které pozitivně působí na tvorbu pěny, patří především bílkoviny s určitou molekulovou hmotností a hydrofobním charakterem – bílkovina Z (Protein Z), bílkoviny umožňující intracelulární přenos lipidů (Lipid Transfer Protein 1), bílkoviny vázající lipidy (Lipid Binding Proteins) a zásobní bílkoviny ječmene hordeiny. Významným faktorem negativně ovlivňujícím stabilitu pěny jsou látky lipidového charakteru a intracelulární proteinasa A vylučovaná kvasinkami, která štěpí pěnotvorné bílkoviny v rozsahu daném jejich sensitivitou.

LITERATURA

1. Basařová G.: *České pivo*, NUGA. Praha 1998.
2. Bamforth C. W.: J. Inst. Brew. 110, 259 (2004).
3. Baxter E., D., Hughes P., S.: *Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects*. Pub. Royal Soc. Chem., Cambridge 2001.
4. Cooper D. J., Stewart G., G., Bryce J. H.: J. Inst. Brew. 104, 283 (1998).
5. Bureš M., Černý Č., Chuchvalec P.: *Fyzikální chemie II*. VŠCHT, Praha 1994.
6. Bamforth C.W.: J. Inst. Brew. 91, 370 (1985).
7. Lusk L. T., Goldstein H., Ryder D.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 53, 93 (1995).
8. Ťopka P., Čejka P.: Kvasný Prům. 33, 3 (1987).
9. Evans D. E., Sheehan M. C., Stewart, D. C.J.: J. Inst. Brew. 105, 171 (1999).
10. Bekkers A, Cornelissen W.: *EBC Proceedings of the 30th Congress, Prague, 14–19 May 2005, 74/1-74/4*, Praha 2005.
11. Ronteltap A. D., Damste B. R., De Gee M., Prins, A.: *Colloids Surf.* 47, 269 (1990).
12. Princ J., Marle J. T.: *EBC Proceedings of the 26th Congress, Maastricht, 24–29 May 1997*, str. 26, Maastricht 1997.
13. Lynch D. M.; Bamforth C. W.: J. Food Sci. 67, 2696 (2002).
14. Hollemans M., Tonies T., R., J., M., Bisperink Ch., G. J., Ronteltap, A.D.: *Tech. Q. – Master Brew. Assoc. Am.* 28, 168 (1991).
15. Asano K., Hashimoto N.: *Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Comp.* 23, 1 (1980).
16. Simpson W. J., Hughes P. S.: *Cerevisia Biotechnol.* 19, 39 (1994).
17. Bamforth C. W., Canteranne E., Chandley P., Onishi A.: *EBC Proceedings of the 24th Congress, Oslo, 1993*, str. 331, Oslo 1993.
18. Roberts R. T.: J. Inst. Brew. 82, 38 (1976).
19. Hughes P., Wilde P. J.: *EBC Proceedings of the 26th Congress, Maastricht, 24–29 May 1997*, str. 525, Maastricht 1997.
20. Lusk L. T., Cronan Ch. L., Ting P. L., Seabrooks J., Ryder D.: *EBC Proceedings of the 29th Congress, Dublin, 17–22 May 2003, 79/1-79/10*, Dublin 2003.
21. Lewis M. J., Lewis A. S.: *Tech. Q. MBAA Commun.* 40, 114 (2003).
22. Basařová G., Čepička, J.: *Sladařství a pivovarství*. SNTL, Praha 1985.
23. Prokeš J.: *Kvasný Prům.* 46, 277 (2000).
24. Hirota N., Kuroda H., Takoi K., Kaneko T., Kaneda H., Yoshida I., Takashio M., Ito K., Takeda K.: *EBC Proceedings of the 30th Congress, Prague, 14–19 May 2005, 3/1-3/7*, Praha 2005.
25. Takahashi S., Yoshioka K., Hashimoto N., Kimura Y.: *Techn. Q. – Master Brew. Assoc. Am.* 34, 156 (1997).
26. Haukeli A. D., Wulff T. O., Lie S.: *EBC Proceedings of the 25th Congress, Oslo, 1993*, str. 365, Oslo 1993.
27. Bryce J. H., Cooper D.M, Stewart G.G.: *EBC Proceedings of the 26th Congress, Maastricht, 24–29 May 1997*, str. 357, Maastricht 1997.
28. Kano Y., Kamimura M.: J. Am. Soc. Brew. Chem. 51, 21 (1993).
29. Mohan S. B., Smith L., Kemp W., Lyddiat A.: J. Inst. Brew. 98, 187 (1992).
30. Brey S. E., Bryce J. H., Stewart G. G.: J. Inst. Brew. 108, 424 (2002).
31. Sørensen S. B., Bech L. M.: Muldbjerg M., Beenfeldt T., Breddam K.: *Tech. Q. – Master Brew. Assoc. Am.* 30, 136 (1993).
32. Vaag P., Bech L. M., Cameron-Mills V., Svendsen I.: *EBC Proceedings of the 27th Congress, Cannes, 1999*, str. 157, Cannes 1999.
33. Evans D. E., Hejgaard J.: J. Inst. Brew. 105, 159 (1999).
34. Leisegang R., Stahl U.: *EBC Proceedings of the 30th Congress, Prague, 14–19 May 2005, 7/1-7/4*, Praha 2005.
35. Kaersgaard P., Hejgaard J.: J. Inst. Brew. 85, 103 (1979).
36. Curioni A., Pressi G., Furegon L., Peruffo A. D. B.: J. Agric. Food Chem. 43, 2620 (1995).

37. Maeda K., Yokoi S., Kamada K., Kamimura M.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 49, 14 (1991).
38. Evans D. E.: *EBC Proceedings of the 25th Congress Brussels, 14–18 May 1995*, str. 225, Brussels 1995.
39. Bech L. M., Vaag P., Heinemann B., Breddam K.: *EBC Proceedings of the 25th Congress Brussels, 14–18 May 1995*, str. 561, Brussels 1995.
40. Jones B. L., Marinac L. A., Fontanini D.: *J. Agric. Food. Chem. Soc.* 48, 3898 (2000).
41. Evans D. E., Sheenan M. C., Stewart D. C.: *J. Inst. Brew.* 105, 171 (1999).
42. Lusk L. T., Ting Pat., Goldstein H., Ryder D., Navarro A. L.: *Eur. Brew. Conv. 1998, 27 (EBC-Symposium Beer Foam Quality, 1998)*, Monograph, 166, (1998).
43. Perrocheau L., Bakan B., Boivin P., Marion D.: *EBC Proceedings of the 30th Congress, Prague, 14–19 May 2005*, 72/1-72/7, Praha 2005.
44. Lusk L. T., Navarro A. L., Goldstein H., Wagner R. J., Randall J., Ryder D. S.: *PCT Int. Appl.* 3 pp (2002).
45. Cooper D. J., Husband F. A., Mills, E. N. C., Wilde, P. J.: *J. Agric. Food Chem.* 5/26, 7645 (2002).
46. Onishi A., Canterranne E., Clarke D. J., Proudlove M. O.: *EBC Proceedings of the 25th Congress, Brussels, 14–18 May 1995*, str. 553, Brussels 1995.
47. Dickie K.H., Cann C., Norman E. C., Bamforth C. W., Muller R. E.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59, 17 (2001).
48. Kauffman J. A., Mills E. N. C., Brett G. M., Fido R. J., Tatam A. S., Shewry P. R., Onishi A., Proudlove M. O., Morgan M. R. A.: *J. Sci. Food Agric.* 66, 345 (1994).
49. Vaag P., Bech L. M., Cameron-Mills V., Sorensen M. B.: *PCT Int. Appl.* 82 pp. (2000).
50. Bamforth, C. W., Milani C.: *J. Sci. Food Agric.* 84, 1001(2004).
51. Bamforth C. W., Kanauchi M.: *J. Sci. Food Agric.* 8, 1045 (2003).
52. Ferreira I. M. P. L. V. O., Jorge K., Nogueira L. C., Silva F., Trugo L. C.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 4976 (2005).
53. Gray P., Stone I.: *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.* 1956, 83.
54. Anon. *Brauwelt* 141, 2037 (2001).
55. Wilde P. J., Husband F. A., Cooper D., Ridout M. J.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61, 196 (2003).
56. Furukubo S., Shobayashi M., Fukui N., Isoe A., Nakatani K.: *Tech. Q. – Master Brew. Assoc. Am.* 30, 155 (1993).
57. Brierley Ewen R., Wilde Peter J., Onishi Akiko, Hughes Paul S., Simpson William J., Clark David C.: *J. Sci. Food Agric.* 70, 531 (1996).
58. Perpete P., Maudoux M., Devreux A., Collin S.: *Cerevisia* 22, 36 (1997).
59. Brey S. E., de Costa S., Rogers P. J., Bryce J. H., Morris P.C., Mitchell W. J., Stewart G. G.: *J. Inst. Brew.* 109, 194 (2003).
60. Kogin A., Fukui N., Furukubo S.: *Tech. Q. – Master Brew. Assoc. Am.* 36, 67 (1999).
61. Bamforth C. W.: *Cerevisia Biotechnol.* 18, 49 (1993).
62. Bamforth C. W.: *J. Sci. Food Agric.* 80, 1371 (2000).

H. Čížková, P. Dostálek, J. Fiala, and I. Kolouchová (*Department of Fermentation Chemistry and Bioengineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Importance of Proteins from the Viewpoint of Stability of the Beer Foam**

A rich, dense and long-tasting head is one of the first perceptions of beer consumers. The most significant factors influencing the stability of the beer foam are generally considered to be hop substances, carbohydrates, carbon dioxide and proteins, in particular hydrophobic proteins.

ROLE L-FENYLALANINAMONIUMLYASY PŘI OBRANNÉ REAKCI ROSTLIN

ŠÁRKA ADÁMKOVÁ, LENKA LUHOVÁ,
MAREK PETŘIVALSKÝ a PAVEL PEČ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity
Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
adamkova@upol.cz.

Došlo 4.11.05, přijato 14.3.06.

Klíčová slova: stres, fenylpropanoidy, L-fenylalanin, fenylalaninamoniumlyasa, skořicová kyselina, tyrosin, flavonoidy, kumarová kyselina, salicylová kyselina, systémová rezistence, chalkon

Obsah

1. Úvod
2. Obranná reakce rostlin
3. Charakteristika L-fenylalaninamoniumlyasy
 - 3.1. Aktivita L-fenylalaninamoniumlyasy při poranění rostlin
 - 3.1.1. Prevence hnědnutí tkáně
 - 3.1.2. Obranné signály rostlin
 - 3.1.3. Vznik systémové rezistence po napadení rostlin patogenem
 - 3.2. Aktivita L-fenylalaninamoniumlyasy vyvolaná ozářením
 - 3.2.1 Úloha flavonoidů při obranné reakci rostlin
 - 3.3. Aktivita L-fenylalaninamoniumlyasy při nízkých teplotách
4. Závěr

1. Úvod

Rostliny jsou během růstu vystaveny různým druhům poškození vyvolaného stresem. Biotický stres způsobený infekcemi přenášenými viry, bakteriemi, houbami a abiotický stres způsobený změnami teplot, UV zářením a poraněním jsou nepříznivé vlivy, které působí na rostlinu během života a způsobují poškození rostlinné tkáně nebo morfologické změny ve stavbě rostlin¹. Rostliny se snaží tyto nepříznivé vlivy eliminovat. Vytvořily si proto komplexní mechanismus obrany, chránící je proti infekci nebo mechanickému poškození. Odolnost rostliny vůči stresu je spojena s rozmanitými druhy obranného mechanismu.

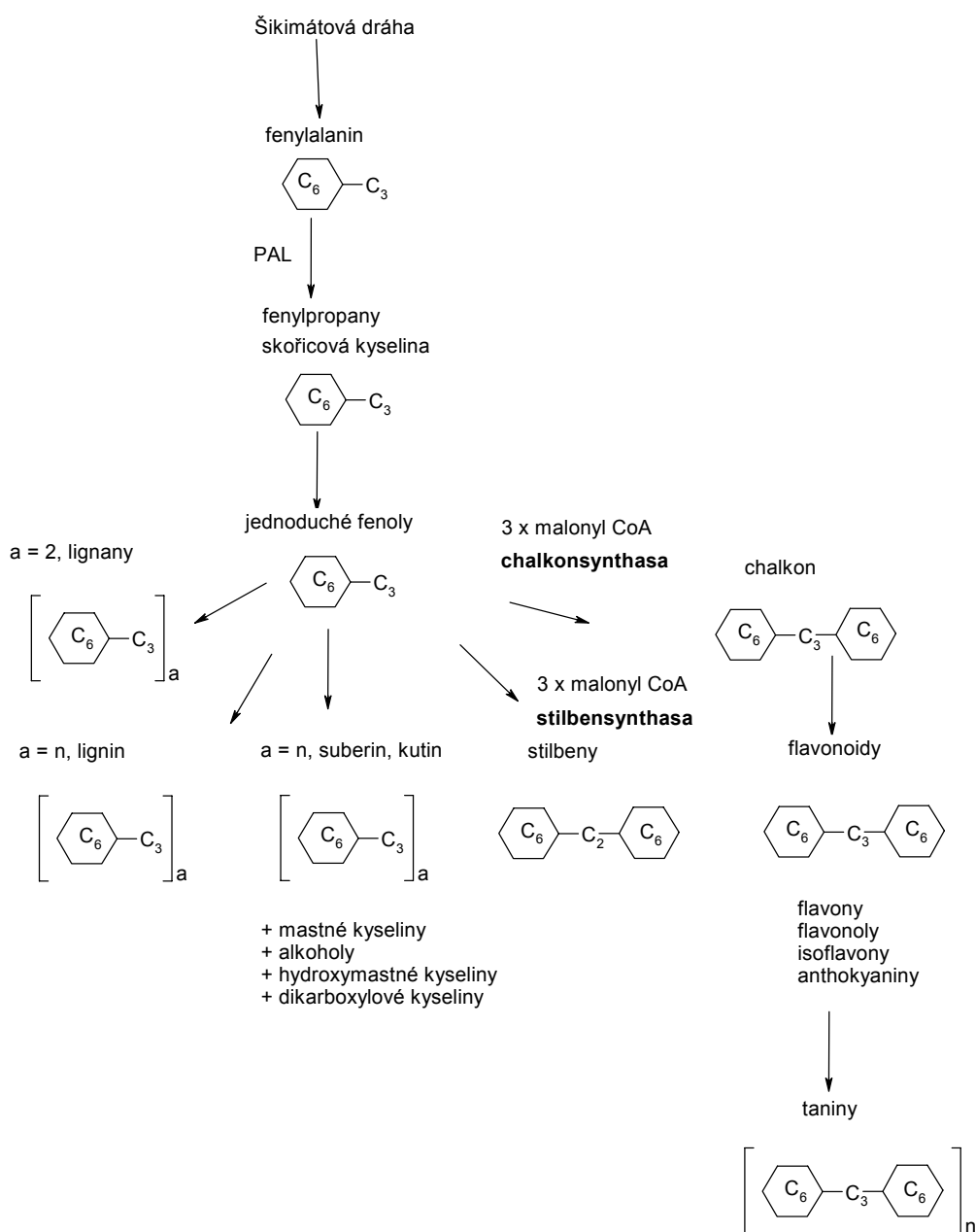
Jedním z nich je produkce fenylpropanoidních látek. Na začátku jejich syntézy se nachází enzym fenylalaninamoniumlyasa, jehož aktivita je ukazatelem obranyschopnosti rostliny vůči stresu¹.

2. Obranná reakce rostlin

Dojde-li k napadení rostliny patogenem nebo poranění rostlinné tkáně, dochází k indukci obranného mechanismu. Mechanismy odolnosti proti stresu lze rozdělit do dvou kategorií. Prvními jsou mechanismy zabráňující tomu, aby byla hostitelská rostlina vystavena stresu („avoidance mechanisms“). Tento způsob obrany zahrnuje mechanickou bariéru rostlin, která má převážně pasivní a dlouhodobý charakter (např. silná kutikula na listech, výrazná impregnace buněčných stěn, atd.). Druhou skupinou obranných mechanismů je aktivní obrana rostlin („tolerance mechanisms“), která omezuje negativní dopad stresorů až po jejich proniknutí k plasmatické membráně buněk a do symplastu. V takovém případě dochází ke spuštění řetězce změn, tzv. stresové reakce². K těmto reakcím patří aktivace antioxidantních obranných systémů lokalizovaných v různých buněčných strukturách. Antioxidantní obranné mechanismy zahrnují neenzymové a enzymové systémy. Mezi velmi účinné antioxidanty řadíme askorbát, β -karoten, redukovaný glutathion a α - tokoferol. Specializované enzymy jako superoxid dismutasa (EC 1.15.1.1), peroxidasa (EC 1.11.1.7), katalasa (EC 1.11.1.6) a enzymy askorbát-glutathionového cyklu zabezpečují univerzální obranu rostlin². K dalším reakcím na stres patří produkce fenylpropanoidních látek jako jsou flavonoidy, fytoalexiny, kumariny a strukturální komponenty typu ligninu a suberinu. Tyto látky komplexně posilují ochranu rostliny proti infekci. Mají v rostlinném organismu zejména antioxidantní a antimikrobiální funkce a dále se podílejí na posílení mechanické odolnosti³. Fenylpropanoidy jsou fenolové látky odvozené od fenylalaninu a tyrosinu obsahující C3 postranní řetězec. V rostlinném organismu jsou syntetizovány z *trans*-skořicové kyseliny, která vzniká z L-fenylalaninu reakcí katalyzovanou enzymem L-fenylalaninamoniumlyasou (PAL, EC 4.3.1.5) (obr. 1). Alternativní názvy enzymu jsou tyrasa, fenylalanindeaminasa nebo tyrosinamoniumlyasa (TAL).

3. Charakteristika L-fenylalaninamoniumlyasy

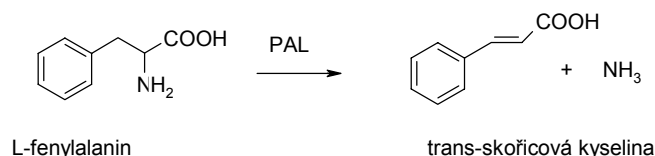
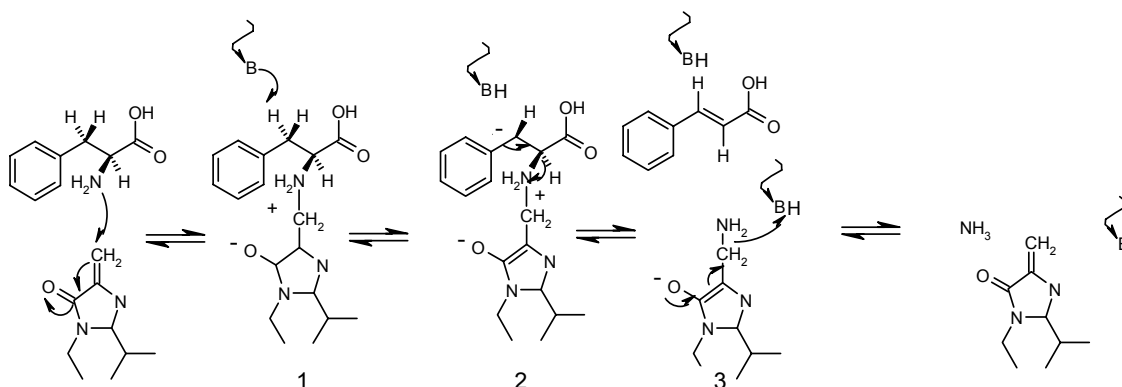
L-Fenylalaninamoniumlyasa (PAL) je enzym, který katalyzuje neoxidativní deaminaci L-fenylalaninu na *trans*-skořicovou kyselinu a amoniak⁴ (obr. 2). Tato reakce aktivuje první krok biosyntézy fenylpropanoidních látek. Mechanismus katalýzy je popsán na obr. 3 a 4. Sku-



Obr. 1. **Tvorba fenylpropanoidů**; skořicová kyselina tvořená z fenylalaninu fenylalaninamoniumlyasou (PAL) je prekurzorem řady fenylpropanoidů. U některých rostlin se tvoří 4-hydroxyskořicová kyselina obdobnou dráhou z tyrosinu. Další aromatický kruh se tvoří, buď chalkonsynthasou nebo stilbensynthasou ze tří molekul malonyl-CoA (cit.²⁹)

pina L-aminokyselinamoniumlyas katalyzuje odštěpení protonu z β uhlíku a následné odštěpení aminoskupiny z aminokyseliny. Enzymy obsahují jako kofaktor 3,5-dihydro-5-methyliden-4H-imidazol-4-on (MIO), který se tvoří cyklizací a dehydratací sekvence tří konzervovaných aminokyselin (Ala-Ser-Gly). MIO je silně elektrofilní. Mechanismus PAL je obdobou mechanismu histidinamoniumlyasy (HAL, EC 4.3.1.3) (cit.⁵). V prvním kroku rea-

guje methylidenová skupina MIO s aminoskupinou substrátu za tvorby aduktu 1. Pozitivní náboj na dusíku a schopnost aromatického vedlejšího řetězce substrátu přitahovat elektrony vede k aktivaci C3 L-Phe pro deprotonizaci bázi z aktivního místa PAL za tvorby karbanionu 2. Vazba mezi C2 substrátu a aminoskupinou se rozštěpí za tvorby látky 3 a jednoho z produktů, kterým je skořicová kyselina. Komplex MIO-NH₂ je protonizován kyselou

Obr. 2. Deaminace L-fenylalaninu na *trans*-skořicovou kyselinu fenylalaninamoniumlyasou

Obr. 3. Mechanismus katalýzy fenylalaninamoniumlyasou

skupinou v aktivním místě PAL za odštěpení NH_3 a regenerace MIO (cit.⁵).

Enzym je rozšířený u vyšších rostlin, některých hub a prokaryotních organismů (tab. I). Nevyskytuje se v živočišných tkáních⁴. V závislosti na biologickém zdroji enzymu, PAL může katalyzovat s větší či menší účinností také reakci s tyrosinem jako substrátem. U dvouděložných rostlin je PAL vysoce specifická pro fenylalanin. U některých druhů fotosyntetických bakterií upřednostňuje PAL tyrosin za vzniku *p*-hydroxyskořicové kyseliny. U jednoděložných rostlin katalyzuje PAL přeměnu tyrosinu i fenylalaninu se stejnou účinností. Studium PAL v souvislosti s obrannými reakcemi rostlin je v současné době středem výzkumného zájmu díky její významné roli při aktivaci prvního kroku v biosyntéze ligninu, druhého nejrozšířenějšího biopolymeru po celulóze, a dalších přírodních produktů⁵.

3.1. Aktivita L-fenylalaninamoniumlyasy při poranění rostlin

Poranění je jedním ze všudypřítomných stresů, kterému je rostlina v přírodě vystavena. Změny, které jsou poraněním tkáně vyvolány, indukují promotor PAL, spouští akumulaci PAL mRNA a následně dochází ke zvýšení aktivity PAL (cit.⁶). Zvýšení koncentrace PAL závisí na hloubce a velikosti poranění, šíření signálů a následně

akumulaci látek zahrnutých v sekundárních procesech. V místě poranění dochází ke zhnědnutí rostlinné tkáně, které je způsobené oxidací polyfenolových látek enzymem polyfenoloxidasou (PPO, EC 1.14.18.1) a peroxidasou (POD, EC 1.11.1.7) (cit.⁷). Hnědnutí tkáně bylo blíže zkoumáno na salátu (*Lactuca sativa L.*). U čerstvého salátu je právě hnědnutí jedním z faktorů, který snižuje jeho kvalitu. Aktivita PAL tak může být významným činitelem při určení kvality uskladnění. U ovocných plodů jako je jablko nebo banán začne místo, kde došlo k odkrojení části plodu, hnědnout během hodiny, zatímco u kapusty nebo salátu se jedná o několikadenní proces. Tento časový rozdíl souvisí s biosyntézou polyfenolů. Jablka jsou bohatá na polyfenolové látky v porovnání se salátem⁸. Z kofeyl-CoA, který vzniká při syntéze fenylpropanoidů, je následně tvořena dikofeylvinná kyselina a 5-kofeylchinová kyselina. Tyto kyseliny jsou oxidovány PPO na hnědé pigmenty, které jsou chinony těchto kyselin. Enzym PAL, který stojí na počátku syntézy fenolových látek, svou zvýšenou aktivitou vyvolanou poraněním nebo odkrojením tkáně výrazně ovlivňuje rychlost těchto přeměn⁷. Bylo zjištěno, že obsah polyfenolových látek se během skladování poškozených vzorků salátu mění pouze se zvýšením aktivity PAL a aktivity PPO zůstává stejná. Po použití inhibitoru PAL, 2-aminoindan-2-fosfonové kyseliny (AIP), bylo hnědnutí potlačeno, zatímco inhibitor 4-hexylresorcinol použitý jako inhibitor PPO zcela hnědnutí tkáně nepotlačil. Obsah fenolových látek a PPO tedy nemají na hnědnutí žádný

Tabulka I
Zdroje a molekulové vlastnosti PAL

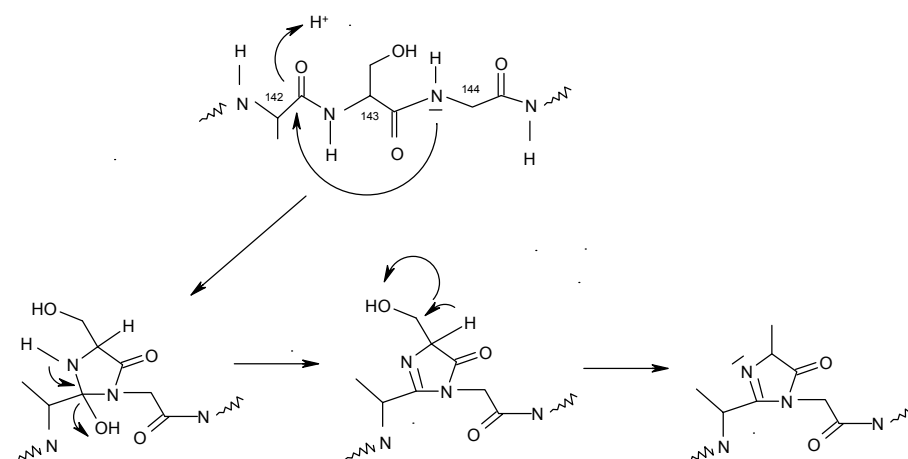
Organismus lokalizace	M _r podjednotky	Substrát K _m (mM)	Inhibitory	pH optimum
Okurka setá (<i>Cucumis sativus</i>) mikrosom ¹⁸ , hypokotyl ¹⁹	316 000	L-Phe 0,043–0,29	<i>trans</i> -skořicová kyselina, D-Phe, galová kyselina, <i>o</i> -kumarát kamferol, kvercetin	–
Ječmen obecný ^{8,18,20} (<i>Hordeum Vulgare</i>) etioplast, chloroplast		L-Phe 1,7	4-kumarát, <i>trans</i> -kumarát, 3,4-dihydroxyfenyl-DL-Ala, β-fenylethylamin, Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , CN ⁻	8,8–9,2
Locika setá ²¹ (<i>Lactuca sativa</i>)		L-Phe 0,29	2-aminoindan-2-fosforitá kyselina	–
Tolice vojtěška ^{8,22} (<i>Medicago sativa</i>)	316 000 311 000	L-Phe 0,04–0,11	4-kumarát, tyrosin, katechin, ferulát, kafeát, skořicová ky- selina, <i>p</i> -hydroxybenzoát	8,8–9,2
Tabák virginský ^{20,23} (<i>Nicotiana tabacum</i>)	280 000 tetramer	L-Phe: 0,011–0,22	<i>o</i> -kumarát, Tyr, CN ⁻ , NABH ₄	8,8–9
Rýže setá ^{4,8,15} (<i>Oryza sativa</i>)	320 000 tetrametr	L-Phe 0,5	3,4-dihydroxybenzoát, 4-kumarát, kafeát, ferulát, naringenin	8,9
Hrách setý ^{19,20} (<i>Pisum sativum</i>)		L-Phe 0,052–0,8		–
Brambor obecný ^{18,19,24,25} (<i>Solanum tuberosum</i>) mikrosom	330 000	L-Phe 0,038–0,26	1-amino-3-fenylethyl, fosfori- tá kyselina, 1-amino-3-fenyl- propylfosforitan, CN ⁻ , skořicová kyselina, D-Phe	8,7
Kukuřice setá ^{18,24,26} (<i>Zea mays</i>) chloroplast, thylakoid	306 000	L-Phe 0,029–0,27		7,7
<i>Rhodosporidium toruloides</i> ²⁷	165 000 dimer	L-Phe 0,29 L-Tyr 0,18	<i>p</i> -chloromerkuribenzoát	8,5
<i>Streptomyces Verticillatus</i> ^{18,23}	226 000	L-Phe 0,16	4-fluorofenylalanin, skořicová kyselina, His, NABH ₄ , CN ⁻	8,5
<i>Rhodotorula glutinis</i> ^{15,18,20,24,28,29}	270 000– 300 000	L-Phe 0,25: L-Tyr 0,15 NH ₃ 3170	glycin, <i>m</i> -kresol, <i>m</i> -kresol/ glycin, <i>o</i> -kresol, <i>o</i> -kresol/ glycin, fenol	9

vliv, zatímco PAL zvyšuje množství polyfenolů, které jsou dále oxidovány PPO a objeví se zhnědnutí tkáně. PAL je tedy důležitým regulátorem těchto procesů⁹.

3.1.1. Prevence zhnědnutí tkáně

Některé studie uvádí, že zvýšení teploty až na 47 °C před uskladněním může potlačit aktivitu PAL a tím také syntézu fenolových látek a následně zhnědnutí salátových listů. Efekt teplotního šoku ukázal, že dochází ke značné

redukci aktivity PAL, nebyla však zaznamenána změna obsahu fenolových látek. Zvýšený obsah fenolových látek po teplotním šoku byl nalezen ve fotosyntetických tkáních, ačkoliv zhnědnutí zde bylo méně intenzivní v porovnání s cévnatými tkáněmi⁹. Tento jev zřejmě souvisí s enzymem peroxidasou. POD se podílí na recyklaci askorbátu – antioxidantu snižujícího zhnědnutí odřezaných částí u ovoce a zeleniny. Navzdory velkému potenciálu fenolových látek pro zhnědnutí u fotosyntetických tkání, skutečný obsah



Obr. 4. Navrhovaný mechanismus biosyntézy 3,5-dihydro-5-methyliden-4H-imidazol-4-onu (MIO) posttranslační modifikací³⁰; MIO byl identifikován spektrofotometricky ve struktuře PAL, ačkoliv krystalografický model enzymu nebyl dosud vyřešen. Za použití krystalografické struktury HAL byl později navržen homologický model PAL³⁰

hnědých pigmentů je tedy menší právě díky antioxidačnímu obrannému systému. Existuje velké množství mechanismů, kterými může teplotní šok redukovat aktivitu PAL vyvolanou poraněním. Ve většině experimentů, u kterých došlo ke snížení aktivity PAL, byla teplotní změna aplikována před poraněním v době, kdy aktivita PAL byla nízká. Změna teploty tedy nemohla ovlivnit zvýšení akumulace PAL mRNA, která se objevila až několik hodin po teplotním šoku. Rozdíly v aktivitě PAL jsou zřejmě výsledkem rozdílů translace mRNA indukované poraněním⁶.

3.1.2. Obranné signály rostlin

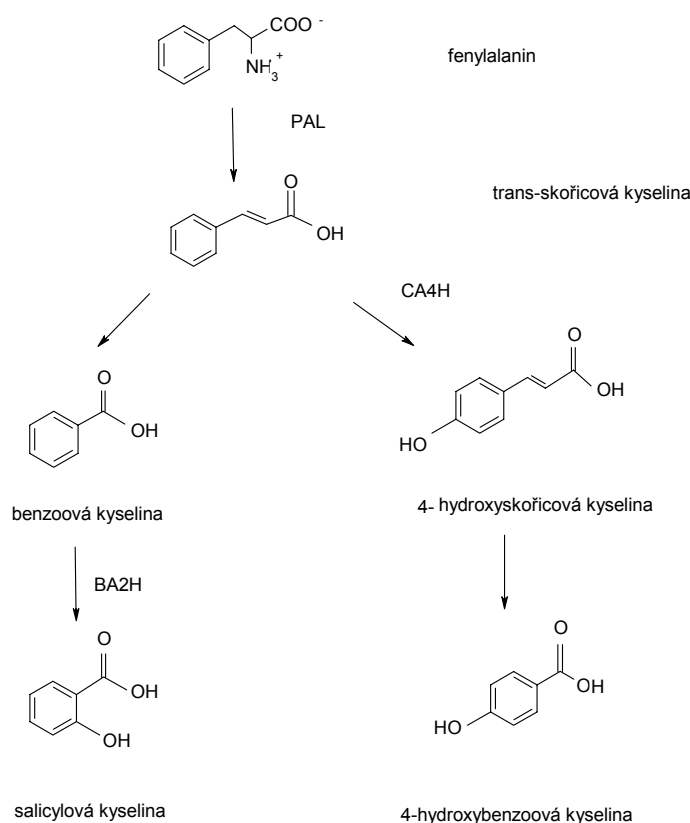
U některých rostlinných druhů byla popsána souvislost mezi aktivitou PAL a vzdáleností od místa poranění. V plátcích bramborové hlízy byla naměřena největší aktivita enzymu nejbližší poraněné části. Poraněné listy jahodníku vykazovaly zvýšenou aktivitu PAL do 0,8 cm od místa poranění a ledový salát 2,5 cm od místa poranění¹⁰. Lze předpokládat účast signálních molekul podílejících se na indukcii aktivity PAL v tkáních v okolí místa působení stresového faktoru. Poranění obvykle vyvolá zvýšení obsahu ethyleny v tkáních, takže se nabízí hypotéza vlivu ethyleny na indukcii aktivity PAL. Kinetická analýza ale prokázala, že ethylen není tímto primárním signálem¹⁰. Další látky, které mohou sloužit jako signální molekuly, jsou kyseliny salicylová, abscisová (ABA), jasmonová (3-oxo-2-/2'-cis-pentyl/-cyklopentan-1-acetát, JA) a její methyl-ester – methyljasmonát (MeJA). Jasmonová kyselina a MeJA zvyšují produkci PAL mRNA a aktivitu PAL u buněčných kultur sójových bobů a indukují akumulaci sekundárních metabolitů jako jsou *N*-substituované amidy hydroxyškořicové kyseliny (HCA), strukturně obsahující polyaminy (putrescín, spermidin a spermin), které jsou vázány kovalentní vazbou na hydroxyškořicové kyseliny, např. kyselinu kumarovou a kávovou¹¹. Zvýšená koncentrace HCA byla pozorována po infekci patogeny¹¹. ABA zvyšuje aktivitu PAL u buněčných kultur brambor. Někte-

ré zdroje také spojují ABA s indukcí PAL při vývoji plodu, v tomto případě dochází ke zvýšení aktivity PAL několik dnů po poškození. Tyto signální molekuly působí odlišně u mladé a u vzrostlé listové tkáně. Zatímco u mladých listů methyljasmonát, salicylová kyselina a jasmonát způsobily vzrůst aktivity PAL, akumulaci fenolových látek a zhnědnutí listu u dospělých listů tyto změny nevyvolaly⁶.

3.1.3. Vznik systémové rezistence po napadení rostliny patogenem

Systémová rezistence (systemic acquired resistance – SAR) je aktivována lokálními nekrosami způsobenými houbovou, bakteriální nebo virovou infekcí. V experimentech s transgenními rostlinami tabáku se ukázalo, že k tomu, aby se vytvořila systémová získaná odolnost, musí napřed dojít k nahromadění salicylové kyseliny. Expresí genu *nahG* v rostlinách vytváří naopak rostlinu se zvýšenou citlivostí k onemocnění. Přítomnost salicylové kyseliny nebo jejího funkčního analoga kyseliny 2,6-dichloroisoinikotinové může zvrátit citlivost v odolnost¹². Zajímavé je, že podobné efekty byly popsány i u poruch imunitního systému u savců. Biosyntéza salicylové kyseliny, která byla zkoumána na rostlině tabáku (*Nicotiana tabacum*), je popsána na obr. 5. PAL katalyzuje první krok této biosyntézy, kterým je konverze fenylalaninu na *trans*-skořicovou kyselinu, která se dále oxidativně převádí na benzoovou kyselinu. Konečným krokem je hydroxylace benzoové kyseliny za katalýzy benzoátu-2-hydroxylasy (BA2H).

U některých bakterií probíhá alternativní biosyntéza salicylové kyseliny šikimátovou dráhou přes isochorismát na SA. Tato přeměna je pravděpodobně katalyzována enzymem isochorismátpyruvátlyasou (IPL) (cit.¹³). Nedávno bylo také zjištěno, že rostlina tabáku, u které byla genetiky potlačena aktivita PAL, nebyla schopna vytvořit systémovou odolnost. Vzrůst aktivity PAL předchází akumulaci SA a 4HBA ve floému. Vodivé pletivo má pravděpodobně



Obr. 5. Schéma biosyntézy salicylové a 4-hydroxybenzoové kyseliny; enzymy: PAL, CA4H (cinnamát-4-hydroxylasa; EC 1.14.13.11), BA2H (benzoát-2-hydroxylasa; EC 1.14.13.12)

velký význam při přenosu mobilního signálu. Obě hydroxykyseliny jsou syntetizovány *de novo* pravděpodobně ve vodivém pletivu řapíku a listu jako mobilní signál z inokulovaného listu. Mechanismus působení, kterým SA indukuje rezistenci, však není zcela jasný.

3.2. Aktivita L-fenylylalaninamoniumpylysy vyvolaná ozářením

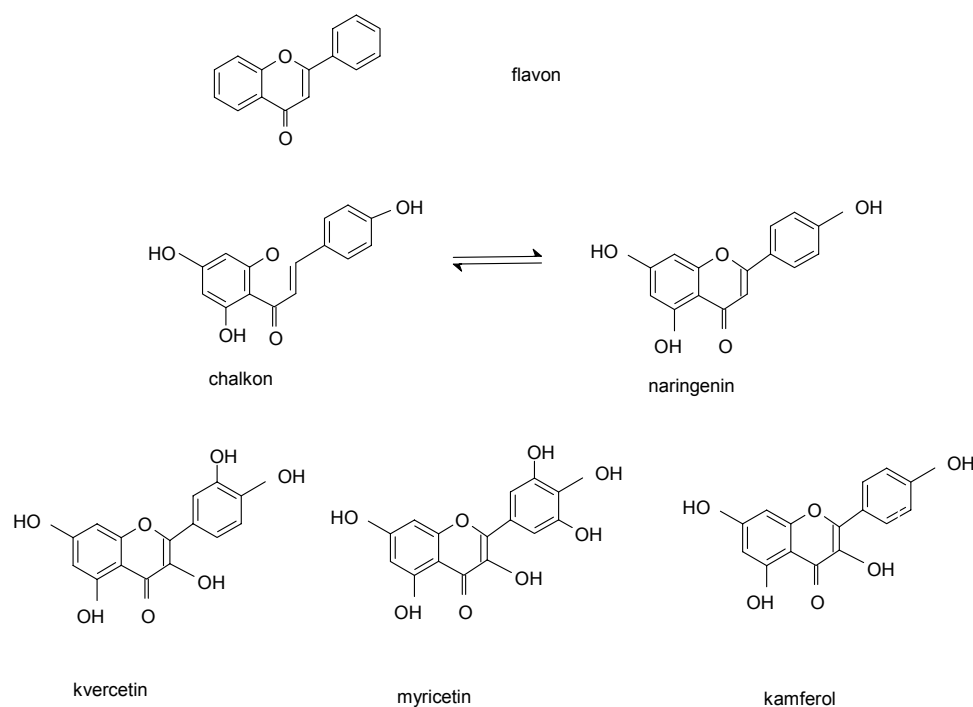
Rostlinné pletivo, které je delší dobu vystaveno škodlivému UV-B záření (280–320 nm), vykazuje různé druhy poškození, jako je snížení rychlosti růstu, redukce fotosyntetické účinnosti a produkce biomasy¹⁴. Ozáření rostlinného pletiva je jeden ze stresových faktorů, na které rostlina reaguje obrannou reakcí. Zvyšuje se syntéza látek, které absorbují UV záření, zvyšuje se metabolismus fenylylpropanoidů a flavonoidů, úzce spjatý s indukcí aktivity PAL, a následně dochází k morfologickým změnám, jako je zmenšení rostliny, zmenšení listů a zvětšení tloušťky listu^{15,16}. Mezi tyto odpovědi patří také akumulace látek absorbujících UV záření jako jsou flavony, flavonoly, isoflavonoidy a anthokyaniny¹⁶ (obr. 6).

3.2.1. Úloha flavonoidů při obranné reakci

Flavonoidy jako největší skupina fenylylpropanoidů

patří mezi rozpustná barviva velmi rozšířená v rostlinné říši tvořící barvu květů, plodů a někdy i listů. První zkoumané rostlinné druhy byly nápadně svojí žlutou barvou. Odtud je také odvozen název této skupiny látek z latinského *flavus* znamenající žlutý. V rostlinách vznikají flavonoidy z kyseliny *p*-kumarové vzniklé hydroxylací kyseliny *trans*-skořicové. Tato reakce je katalyzována *trans*-cinnamát-4-monooxygenasou (EC 1.14.13.11), cytochrom P-450-dependentní monooxygenasou. Další klíčovou roli sehrává 4-kumaroyl-*CoA*-ligasa (E.C.2.3.1.74), která z kyseliny *p*-kumarové a *CoA* vytváří 4-kumaroyl-*CoA*. V další fázi reagují tři molekuly malonyl-*CoA* s *p*-kumaroylem-*CoA* za katalýzy chalkonsynthasy (CHS) za vzniku chalkonu. Chalkony v roztoku samovolně cyklizují na příslušné flavanony. V rostlinném organismu je tento krok řízen enzymem chalkonisomerasou (CHI, EC 5.5.1.6) a ze žlutě zbarveného 4,2',4',6'-tetrahydroxychalkonu vzniká stereospecifickou isomerací bezbarvý flavanon – naringenin. V tomto stupni syntézy dochází k celé řadě dalších kroků katalyzovaných enzymy.

Flavonoidy ochraňují rostlinu před nadměrným UV zářením (280–320 nm), při kterém se uvolňuje velké množství reaktivních forem kyslíku. Mohou přímo zhaset superoxid, hydroxylový radikál, singletový kyslík. Protože jsou převážně lokalizované ve vakuole, je však velmi ne-



Obr. 6. Vzorce flavonů

pravděpodobně, že by zasahovaly *in vivo* přímo proti vysoce reaktivním formám kyslíku, které jsou uvolňovány z chloroplastů při fotosyntéze. Reagují s peroxidem vodíku, který je stabilní a je schopen difundovat přes membránu. Studie, které se zabývaly biosyntézou flavonoidů, ukázaly, že jejich vznik je indukován právě ozářením¹⁴. Akumulaci fotoindukovaných flavonoidů předchází fotoindukce enzymu PAL. Předpokládaná funkce světlem indukované PAL se vztahuje k produktům v určité větvi fenyylpropanoidního metabolismu, která specificky zvýší syntézu látek absorbujících UV záření¹⁴. Fotoindukce genů PAL, CHS, CHI a dihydroflavonolreduktasy (DFR) u *Arabidopsis* začíná akumulací mRNA pro tyto geny ve stejném pořadí jako jsou kroky v biosyntetickém metabolismu flavonoidů. Jeden ze způsobů, jak dosáhnout regulace těchto kroků, je aktivace/inhibice mechanismů využívajících meziprodukty fenyylpropanoidů. Aktivita PAL byla zkoumána za přítomnosti nebo absence několika fenolových sloučenin. Výsledky ukázaly, že enzym byl velmi citlivý na metabolity flavonolové a anthokyaninové syntézy, zejména na hydroxykořicovou kyselinu, naringenin a kvercetin, které silně inhibovaly enzymovou aktivitu. Enzymová inhibice těmito sloučeninami tedy zpětně reguluje biosyntézu fenyylpropanoidů¹⁴. Enzym PAL jako klíčový enzym tohoto metabolismu je inhibován produkty syntézy. Další významnou funkci v obranně rostliny mají flavonoidy jako fytoalexiny. V luštěninách typu sóji, hrachu a fazole se rapidně zvyšuje aktivita PAL, která předznamenává aku-

mulaci antimikrobiálních isoflavonoidních fytoalexinů v pletivech, které byly v kontaktu s houbovou infekcí nebo byly vystaveny působení mikrobů. Typickým příkladem je isoflavon medikarpin z vojtěšky (*Medicago sativa* L.). Flavonoidy inhibují řadu rostlinných enzymů např. malátdehydrogenasu (EC 1.1.1.37), glutamátdehydrogenasu (EC 1.4.1.2). Jako součást potravy vykazují flavonoidy protizánětlivou a antialergickou aktivitu, dále antithrombotické a vasoprotektivní účinky. Mnoho rostlin obsahujících flavonoidy (petržel, lékořice) působí jako diuretika a spasmolytika.

3.3. Aktivita L-fenylalaninamoniumlyasy při nízkých teplotách

Rostliny, které jsou pěstovány při nízkých teplotách, vykazují morfologické změny. Citlivost na chlad může být odlišná u různých částí rostliny. Kořeny, oddenky a cibulky jsou na chlad citlivější než např. stonkové vegetativní orgány. Nízké teploty způsobují zvýšení obsahu fenolových látek rozpustných ve vodě a jejich následnou inkorporaci do buněčných stěn ve formě suberinu a ligninu. Akumulace rozpustných fenolových látek je tedy spojená s lignifikací a inhibicí růstu. Tento efekt fenolových kyselin na růst je však velmi komplexní proces. Tyto sloučeniny mohou participovat na metabolismu auxinu, změně membránové permeability, mohou ovlivňovat respiraci a oxidativní fosforylaci nebo syntézu proteinů. Během

aklimatizace rostliny na nízké teploty dochází ke zvýšení aktivity PAL, která byla sledována u jablek, brambor, rajčat, kukuřice a řepkového semene. Bylo zjištěno, že aktivita PAL se během podchlazení zvyšuje díky tomu, že rychlost syntézy proteinu PAL je menší než rychlost jeho rozkladu. Při nízkých teplotách tak dochází ke zdvojnásobení obsahu fenolových kyselin. Koncentrace volných fenolových kyselin je v rostlinném organismu pod kontrolou z důvodů jejich potenciální toxicity. Tyto sloučeniny podléhají degradaci, konjugaci a polymerizačním reakcím s dalšími fenolovými a nefenolovými látkami. Vyskytují se nejčastěji jako glykosidy nebo estery. Glykosylace a esterifikace umožňují buňce předejít negativnímu efektu jejich akumulace. U kořenů, které jsou vystaveny nízkým teplotám, dochází ke zvýšení esterifikačních reakcí, zvláště esterifikace ferulové kyseliny¹⁷. U fotosyntetizujících pletiv ve vakuole jsou přítomné estery hydroxyskořicové kyseliny, které slouží jako substráty pro vakuolární peroxidasu v systému peroxidasa/fenolová látka/askorbát, který chrání buňku proti aktivnímu kyslíku. Podobně k tomu dochází i u kořene. Fenolové látky mají tedy antioxidační vlastnosti. Zatímco aktivita PAL se zvyšuje a akumulace rozpustných esterově vázaných fenolových látek roste, množství fenolových látek, které jsou vázány v buněčných stěnách, se snižuje. Je to způsobeno tím, že během ochlazení ubývá polysacharidů v buněčných stěnách a kyseliny tedy nemohou tvořit estery. Tento nedostatek kyselin v buněčných stěnách způsobuje fyziologické změny ve vlastnostech buněčných stěn, např. jejich menší roztažitelnost.

4. Závěr

Mezi významné mechanismy obranných reakcí rostlin na působení stresových faktorů patří tvorba fenylypropanoidních látek, které mají v rostlinném organismu antimikrobiální, antioxidační a strukturální funkce. Jejich biosyntéza je jednou z nejdůležitějších metabolických drah vedoucí ke vzniku přírodních produktů jako jsou lignany, ligniny, fenoly a flavonoidy. Prvním a současně i klíčovým enzymem biosyntézy fenylypropanoidních látek je L-fenylalaninamoniumlyasa (PAL). Zvýšení koncentrace PAL je odezvou na poranění, infekci, teplotní změny nebo radiaci. Zvýšená aktivita PAL byla detegována i v místech vzdálených od centra poškození případně napadení patogenem. Na přenosu signálu se podílí i vznikající kyselina salicylová a hydroxyskořicová. Zvýšená aktivita PAL při poškození některých rostlin vyvolává reakce, vedoucí ke zvýšení obsahu polyfenolů, které jsou dále oxidovány a způsobují hnědnutí rostlinného pletiva. Teplotním šokem nebo použitím inhibitorů PAL dochází ke snížení aktivity PAL, a tím také k redukci hnědnutí pletiva. Tento poznatek bude mít praktický význam při způsobu uskladnění některých potravin. Enzym PAL je klíčovým enzymem biosyntézy flavonoidů – látek, které jsou schopny absorbovat UV záření a chránit rostlinu před jeho škodlivými účinky. Produkce flavonoidů je indukována ozářením a jejich akumu-

laci v organismu předchází fotoindukce PAL. Konečné produkty biosyntézy fenylypropanoidů jsou v některých případech také inhibitory PAL. Dochází zde tedy ke zpětné regulaci těchto procesů. PAL je důležitým kontrolním bodem regulace fenylypropanoidní dráhy a jeho aktivita ukazatelem protistresových reakcí rostlin.

Seznam zkratk

ABA	kyselina abscisová
AIP	kyselina 2-aminoindan-2-fosfonová
BA2H	benzoát-2-hydroxylasa
CA4H	cinnamát-4-hydroxylasa
CHI	chalkoniserasa
CHS	chalkonsynthasa
DFR	dihydroflavonolreduktasa
HAL	histidinamoniumlyasa
HCA	amid hydroxyskořicové kyseliny
4HBA	4-hydroxybenzoová kyselina
IPL	isochorismátpyruvátlyasa
JA	jasmonová kyselina
MeJA	methyljasmonát
MIO	3,5-dihydro-5-methyliden-4 <i>H</i> -imidazol-4-on
<i>nahG</i>	salicyláthydroxylasový gen
PAL	fenylalaninamoniumlyasa
POD	peroxidasa
PPO	polyfenoloxidasa
SA	kyselina salicylová
SAR	systémová získaná odolnost
TAL	tyrosinamoniumlyasa

LITERATURA

- Chaman E. M., Copaja V. S., Argandoña H. V.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 2227 (2003).
- Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P.: *Chem. Listy* 99, 455 (2005).
- Sarma A. D., Sreelakshmi Y., Sharma R.: *Phytochemistry* 49, 2233 (1998).
- Cunha G. B. D.: *Enzyme Microb. Technol.* 36, 498 (2005).
- Calabrese Joseph C., Douglas Jordan B., Boodhoo A., Sariaslani S., Vanelli T.: *Biochemistry* 43(36), 11403 (2004).
- Campos-Vargas R., Nonogaki H., Suslow T., Saltveit M. E.: *Physiol. Plant.* 23, 82 (2005).
- Fukumoto L. R., Toivonen P. M. A., Delaquis P.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 4503 (2002).
- Koukol J., Conn E. E.: *J. Biol. Chem.* 236, 2692 (1961).
- Kang H., Saltveit M. E.: *Physiol. Plant.* 119, 450 (2003).
- Campos R., Nonogaki H., Suslow T., Saltveit M. E.: *Physiol. Plant.* 121, 429 (2004).
- Walters D., Cowley T., Mitchel A.: *J. Ex. Bot.* 53, 747

- (2002).
12. Jyouti Shah.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 365 (2003).
 13. Kawano T., Furuichi T., Muto S.: *Plant Biotech.* 21, 319 (2004).
 14. Reddy Suba V., Goud Venkateshwar K., Sharma R., Reddy R. A.: *Plant Physiol.* 105, 1059 (1994).
 15. Fritz R. R., Hodgins D. S., Abell C. W.: *J. Biol. Chem.* 251, 4646 (1976).
 16. Sarma A. D., Sharma R.: *Phytochemistry* 50, 729 (1999).
 17. Janas K. M., Cvikrová M., Palagiewicz A., Eder J.: *Plant Physiol. Biochem.* 38, 587 (2000)
 18. Janas K. M., Olechnowicz D.: *Acta Biochim. Pol.* 41, 191 (1994).
 19. Jangaard N. O.: *Phytochemistry* 13, 1765 (1974).
 20. Hanson K. R., Havir E. A.: *Biochem. Plants* 7, 577 (1981).
 21. Iredale S. E., Smith H.: *Phytochemistry* 13, 575 (1974).
 22. Watanabe S. K., Hernández-Velazco G., Iturbe-Chinas F., Lopez-Mungia A.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 406 (1992).
 23. Hisaminato H., Murata M., Homma S.: *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 65, 1016 (2001).
 24. Hodgins D. S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 159, 91 (1972).
 25. Alunni S., Cipiciani A., Fioroni G., Ottavi L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 170 (2003).
 26. Havir E. A., Hanson K. R.: *Biochemistry* 12, 1583 (1973).
 27. Smith-Becker J., Marois E., Huguet E. J., Midland S. L., Sims J. J., Keen N. T.: *Plant Physiol.* 116, 231 (1998).
 28. Nagai N., Kojima Y., Shimosaka M., Okazaki M.: *Agric. Biol. Chem.* 52, 2617 (1988).
 29. Minami E., Ozeki Y., Matsuoka M., Koizuka N., Tanaka Y.: *Eur. J. Biochem.* 185, 19 (1989).
 30. Rétey J.: *Biochim. Biophys. Acta* 1647, 179 (2003).

Š. Adámková, L. Luhová, M. Petřivalský, and P. Peč (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*): **Characterization of Enzyme Phenylalanine Ammonia-lyase and Its Role in Activation of Defensive Mechanisms in Plants**

This review summarizes the current knowledge on induction, reaction mechanism, occurrence and activity of phenylalanine ammonium-lyase. Attention was paid to defence reactions of plants based on the phenylpropanoid biosynthesis. These diverse compounds include flavonoids, lignin, coumarins and many phenols with a multiplicity of functions in their structural support, pigmentation, defence and signalling. The role of the enzyme as the catalyst of the gate metabolic step from primary metabolism into the phenylpropanoid pathway is also described.

Vážená paní, vážený pane,
dovolujeme si Vás pozvat na seminář

BIOINFORMATIKA III

Strukturní bioinformatika a molekulové modelování

Datum konání: 12. 10. 2006, 13.00 - 18.00 hod.
Místo: Pavilon E - Press Centrum - brněnské výstaviště

Plenární přednáška: Prof. Pavel Hobza, ÚOCHB Praha,
„Evoluce a struktura DNA“

Řečníci: R. Ettrich, P. Hobza, M. Křavina, B. Schneider,
J. Šponer, R. Svobodová-Kaňková, J. Vondrášek

Témata: modelování DNA – ribozomu – membránových proteinů
– enzymů – design léčiv – tvorba strukturálních databází

Registrace: <http://loschmidt.chemi.muni.cz/bioinf>

Kontakt: Dr. Jiří Damborský, Loschmidtovy laboratoře,
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Bohunice 5/A4, 615 00 Brno, jiri@chemi.muni.cz



ANTIFUNGÁLNÍ PROTEINY ROSTLIN – KLASIFIKACE, CHARAKTERISTIKA, MOŽNOSTI VYUŽITÍ

VERONIKA HEŘMANOVÁ^{a,b}, JAN BÁRTA^a
a VLADISLAV ČURNÝ^b

^aKatedra rostlinné výroby, ^bBiotechnologické centrum,
Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Studentská 13, 370 05 České Budějovice
vhermanova@centrum.cz

Došlo 26.5.05, přijato 30.6.05.

Klíčová slova: antifungální proteiny, stresové proteiny rostlin, rostlinné β -glukanasy, rostlinné chitinasy

Obsah

1. Úvod
2. Reakce rostliny na infekční agens
3. Klasifikace antifungálních proteinů
 - 3.1. Proteiny PR-1
 - 3.2. Proteiny PR-2 (β -glukanasy)
 - 3.3. Proteiny PR-3 (chitinasy)
 - 3.4. Proteiny PR-4 (proteiny vázající se na chitin)
 - 3.5. Proteiny PR-5 (proteiny podobné thaumatínu)
 - 3.6. Defensiny, thioniny
 - 3.7. Proteiny podobné cyklofilinu
 - 3.8. Proteiny inaktivující ribosomy
 - 3.9. Proteiny přenosu lipidů
 - 3.10. Inhibitory proteas
 - 3.11. Ostatní
4. Možnosti využití antifungálních proteinů
5. Závěr

1. Úvod

Antifungální proteiny jsou specifické stresové obranné proteiny, které mají schopnost omezovat až inhibovat růst hub. U vyšších organismů jsou tyto proteiny přirozenou součástí sekundárního obranného systému – vrozené imunity. Výskyt těchto proteinů není ovšem omezen pouze na vyšší organismy, ale obdobné proteiny byly nalezeny i u hmyzu, rostlin a mikroorganismů^{1,2}.

Studium antifungálních proteinů nabývá v posledních letech na významu. Vzhledem k tomu, že tyto proteiny jsou součástí přirozených obranných systémů člověka, ale i živočichů a rostlin, existuje možnost jejich využití proti houbovým patogenům. Zájem o antifungální proteiny pro-

jevily jak obory humánní a veterinární medicíny, tak i obory zemědělské či potravinářské¹.

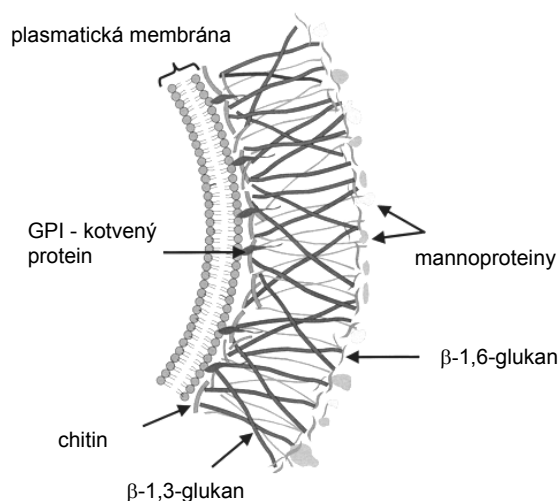
2. Reakce rostliny na patogenní organismy

Mezi rostlinami a fytopatogeny se vytvořily v průběhu koevoluce velmi spletité vzájemné vztahy. U patogenů se vyvinuly systémy, pomocí kterých napadají rostliny; rostliny získaly schopnost se účinně bránit infekčním agens. Průnik patogenů do buněk je ztížen řadou mechanických bariér (krycí pletiva, vosky, kutikula, buněčná stěna), avšak ani tyto struktury nejsou pro specializované patogeny nepřekonatelnou překážkou³. Z pohledu metabolismu a genové exprese dochází při kontaktu buňky s patogenem k řadě změn, jejichž cílem je omezit působení infekčního organismu v rostlině. Látka spouštějící tuto obrannou reakci na buněčné úrovni je tzv. elicitor^{3,4}, kterým bývá specifický metabolit identifikovatelný receptorem hostitelské rostliny. Většina obranných reakcí rostlin je závislá na aktivaci vhodných genů. Elicitory obvykle neovlivňují genovou aktivitu přímo, ale zprostředkovaně pomocí přenašečů signálu. Přenos od aktivovaných receptorů k DNA je možný více systémy. Jedná se především o fosfoinositidový systém, při kterém jsou hydrolyzou lipidů plasmatické membrány rostlinné buňky generovány dvě signální sloučeniny (inositol-1,4,5-trisfosfát a diacylglycerol), které za účasti iontů vápníku aktivují proteinkiny a posléze i expresi genů⁴. Následná obranná reakce zahrnuje tvorbu nekrotů (hypersenzitivní reakce), syntézu sloučenin s antibiotickým účinkem (fytoncidů) a syntézu specifických stresových proteinů^{2,5}. Hypersenzitivní reakce patří mezi neúčinnější obranné mechanismy⁶. V napadené buňce během krátké doby naroste koncentrace vysoce reaktivních volných radikálů a peroxidu vodíku, což vede k rychlé zkáze napadené buňky⁴. Hypersenzitivní reakce je pro okolní buňky často spouštěcím mechanismem pro syntézu fytoncidů a stresových proteinů PR (zkratka pochází z anglického označení „pathogenesis-related proteins“), nebo-li proteinů souvisejících s patogenezí^{6,7}. Mezi fytoicidy se řadí nejrůznější flavonoidy, terpenoidy, fenolické látky a alkaloidy^{3,4}. Proteiny PR jsou definovány jako stresové proteiny, jejichž syntéza je indukovaná přítomností specifického infekčního organismu^{2,4,6,8}. PR proteiny tvoří velmi početnou a různorodou skupinu. V současnosti jsou rostlinné proteiny PR klasifikovány do 14 skupin⁶.

3. Klasifikace antifungálních proteinů rostlin

Antifungální proteiny tvoří rozsáhlou a různorodou skupinu. Do současnosti bylo izolováno několik set těchto

proteinů a lze říci, že nové jsou objevovány téměř denně². Velký počet antifungálních proteinů, jejich různorodost i fakt, že jsou stále objevovány nové, ztěžuje jejich klasifikaci. Antifungální proteiny mohou být klasifikovány na základě struktury, enzymových vlastností, podobnosti s dříve popsanou skupinou proteinů, molekulové hmotnosti, sérologických vlastností^{2,6} nebo mechanismu účinku¹. Přehlednou klasifikaci antifungálních proteinů uvádějí ve své práci Selitrennikoff (2001), nebo Theis a Stahl (2004). Většina autorů^{1–3} se shoduje na rozdělení nejvýznamnějších antifungálních proteinů rostlin do pěti skupin. Toto členění odpovídá pěti základním třídám proteinů PR (PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5), u nichž byla prokázána antifungální aktivita. Každá z těchto pěti skupin je dělena na základě odlišného isoelektrického bodu na další dvě podtřídy. Kyselé antifungální proteiny se nacházejí v extracelulárním prostoru, zatímco bazické proteiny jsou přítomny v buněčných vakuolách⁶. Obdobné antifungální proteiny byly izolovány i z jiných než rostlinných zdrojů. Takové proteiny se označují jako proteiny podobné rostlinným PR proteinům, nebo-li PR-1/5-like proteiny¹. K základním pěti skupinám rostlinných antifungálních proteinů jsou dnes řazeny další skupiny – defensiny, thioniny, proteiny podobné cyklophilinu (angl. „cyclophilin-like proteins“, CLPs), proteiny inaktivující ribosomy (angl. „ribosome-inactivating proteins“, RIPs), proteiny přenosu lipidů (angl. „lipid-transfer proteins“, LTPs) a inhibitory proteas^{1,2,6}. Z doposud známých skupin antifungálních proteinů byl mechanismus účinku zcela popsán pouze u skupiny PR-2 a PR-3 proteinů², které narušují základní stavební strukturu buněčné stěny hub (viz obr 1). PR-2 proteiny (β -glukanasy) hydrolyzují strukturu β -glukanů, PR-3 (chitinasy) narušují chitinové polymery buněčné stěny.



Obr. 1. Schéma stavby buněčné stěny hub (GPI – glykofosfatidylinositol); převzato a upraveno z lit.²

3.1. Proteiny PR-1

Proteiny PR-1 vykazují podobnost vůči skupině proteinů bohatých na cystein. Jedná se o významnou skupinu PR proteinů, které se často využívají jako markery pro studium indukované rezistence rostlin⁶. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 15–17 kDa (cit.²). Proteiny PR-1 byly poprvé izolovány z tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)⁹, později byly nalezeny u mnoha dalších rostlin (např. *Oryza sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Arabidopsis thaliana* L.)^{6,10,11}. Antifungální aktivita byla u těchto proteinů prokázána proti řadě houbových patogenů – *Uromyces fabae*, *Phytophthora infestans*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora parasitica* a *Peronospora tabaci*¹¹. Stabilitní struktura většiny proteinů PR-1, odolná proteasové degradaci, je zajištěna přítomností šesti cysteinových zbytků, které zajišťují tvorbu sulfidických můstků⁶. Mechanismus účinku proteinů PR-1 není znám. Předpokládá se, že mechanismus antifungální aktivity rostlinných proteinů PR-1 je obdobný jako v případě proteinu označovaného helothermin². Helothermin je živočišný antifungální protein (PR-1-like protein), který u cílových buněk interaguje s proteiny membránových kanálků a inhibuje tak propouštění vápenatých iontů, následkem čehož dochází k lyzi buněk¹².

3.2. Proteiny PR-2 (β -glukanasy)

Společným znakem proteinů této skupiny je β -1,3-endoglukanasová aktivita. Vzhledem k enzymové aktivitě PR-2, spočívá jejich mechanismus účinku v hydrolyze struktury β -1,3-glukanů přítomných v buněčných stěnách hub. Postupně oslabování buněčných stěn vede následně k lyzi buněk. V primární struktuře β -glukanas je vždy přítomná oblast dvou reziduí kyseliny glutamové. Tato oblast je považována za aktivní místo, umožňující navázání na strukturu β -glukanu a štěpení β -glykosidických vazeb¹. Na základě analýzy aminokyselinové sekvence jsou PR-2 proteiny děleny do tří skupin^{2,13,14}. První skupina představuje bazické, intracelulární proteiny s velikostí přibližně 33 kDa, druhá a třetí skupina zahrnuje kyselé extracelulární proteiny o velikosti 36 kDa. Bazické PR-2 proteiny jsou produkovány ve formě prekurzorů, jejichž enzymová aktivita je dána posttranslačními úpravami¹⁵. Bazické isoformy vykazují 50 až 250 krát vyšší aktivitu než kyselé isoformy PR-2 proteinů¹⁶. Antifungální aktivita byla zjištěna již na mikromolární úrovni ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) proti celé řadě organismů – např. *Rhizoctonia solani*, *Candida albicans* nebo *Aspergillus fumigatus*². Proteiny PR-2 byly nalezeny u řady rostlin^{15–18}. Exprese proteinů PR-2 je u rostlin tabáku indukována jak přítomností viru mozaiky tabáku¹⁶, tak i na základě infekce inkompatibilními rasami patogenních druhů *Pseudomonas tabaci* nebo *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*¹⁹. U rostlin bramboru (*Solanum tuberosum* L.) byla zjištěna β -1,3-glukanasová aktivita u zásobního proteinu hlíz, patatínu¹⁵. Následně byla dokázána antifungální aktivita tohoto proteinu vůči patogenu *Phytophthora infestans*¹³.

3.3. Proteiny PR-3 (chitinasy)

Jedná se o skupinu proteinů PR, které vykazují endochitinasovou aktivitu. Tato aktivita je u bazických chitinas pětkrát vyšší než u kyselých¹⁶. Hmotnost většiny proteinů PR-3 se pohybuje v rozmezí 26–43 kDa. Rostlinné chitinasy jsou na základě struktury děleny do čtyř skupin¹. Chitinasy I třídy obsahují *N*-terminální doménu bohatou na cystein, která se skládá ze 40 aminokyselin (aglutininová doména obilného klíčku), a heveinu podobnou doménu (tzv. „hevein-like“ doménu), která má schopnost vazby na chitin. Proteiny PR-3 třídy II jsou podobné chitinasam první skupiny, ale postrádají *N*-terminální doménu a jejich hmotnost je 27–28 kDa. Třída III nevykazuje podobnost vůči žádné ze skupin chitinas. Velikost je 28–30 kDa. Třída IV je podobná proteinům první třídy, ale proteiny jsou z důvodu čtyřnásobné delece prokazatelně menší^{1,2}. Proteiny PR-3 byly izolovány z celé řady rostlin – tabáku, okurky, fazolu, hrachu, obilovin, ale i z mnoha dalších^{20–22}. Antifungální aktivitu vykazují proti řadě houbových organismů – *Alternaria solani*, *A. radicina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. graminearum*, *Botrytis cinerea*^{21,23,24}. Mechanismus účinku proteinů PR-3 je dán jejich enzymovou aktivitou. Jedná se o endochitinasy, které narušují chitin přítomný v buněčné stěně hub²⁵. Antifungální aktivita rostlinných endochitinas je *in vitro* synergisticky zvyšována přítomností proteinů PR-2 (cit.²⁶).

3.4. Proteiny PR-4 (proteiny vázající se na chitin)

Jedná se o významnou skupinu proteinů PR majících schopnost vazby na chitin buněčných stěn hub. Molekulová hmotnost je od 3,1 do 20 kDa (cit.¹). Pro kyselé proteiny PR-4 je nejčastěji uváděno 13–14,5 kDa (cit.^{2,3}). Proteiny PR-4 vykazují vysokou odolnost vůči extrémnímu pH a degradaci proteasami²⁷. Skupina proteinů PR-4 je na základě struktury klasifikována do dvou tříd¹. Proteiny PR-4 třídy I mají *N*-terminální doménu vázající se na chitin, která je podobná doméně přítomné u heveinu²⁸. Z tohoto důvodu se tato třída řadí do nadtřídy lektinů vázajících se na chitin. Do této skupiny patří např. proteiny Win 1 a Win 2, které byly izolovány z brambor (*Solanum tuberosum* L.)²⁹. Proteiny PR-4 třídy II na chitin se vázající doménu neobsahují. PR-4 proteiny byly opět izolovány z celé řady rostlin^{14,30,32}. Spektrum houbových organismů, vůči kterým vykazují antifungální aktivitu, je velmi široké – např. *Trichoderma harzianum*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *Botrytis cinerea*². Mechanismus účinku proteinů PR-4 není zcela objasněn. Proteiny PR-4 třídy I mají schopnost vázat se na β -chitin vznikající buněčné stěny²⁷, a tím narušovat polaritu a růst buněk¹⁴. Mechanismus účinku proteinů PR-4 třídy II, které postrádají vazebnou doménu, je nejasný².

3.5. Proteiny PR-5 (proteiny podobné thaumatinu)

Tyto antifungální proteiny o velikosti 24–25 kDa (cit.^{2,3,33}) vykazují vysokou podobnost primární struktury s thaumatinem (angl. „thaumatin-like protein“, TLPs). Thaumatin je sladce chutnající protein izolovaný z jihoafrické rostliny *Thaumatococcus danielli* Benth². Proteiny PR-5 byly nalezeny u celé řady rostlin – např. *Hordeum vulgare* L.³⁴, *Zea mays* L.³⁵, *Nicotiana tabacum* L.³⁶, ale i mnoha dalších. Přítomnost 16 cysteinových zbytků, které tvoří 8 disulfidických můstků, poskytuje proteinům PR-5 vysokou stabilitu vůči změnám teploty, pH a degradaci proteasami⁸. Struktura byla doposud determinována pouze u thaumatinu (*T. danielli*)³⁷, zeamatinu (*Zea mays*)³⁵ a PR-5d proteinu (*N. tabacum*)³⁶. Mechanismus účinku těchto antifungálních proteinů není doposud znám. Různá pozorování více či méně objasňují působení proteinů PR-5. Některé proteiny PR-5 způsobují změny v permeabilitě buněčných membrán – zeamatin způsobuje rychlou lyzi buněk houby *Neurospora crassa*, a to i při 4° C (cit.³⁸). U ostatních proteinů PR-5 byla zjištěna β -1,3-glukanasová aktivita a schopnost vázat se na β -glukan buněčných stěn³⁴. Osmotin (zdroj *N. tabacum*) způsobuje chaos při stavbě buněčné stěny hub³⁹. Proteiny PR-5 jsou účinné proti širokému spektru houbových patogenů. Nejznámějším proteinem PR-5 je zeamatin, o jehož využití se vážně uvažuje i v lékařství, a to z důvodu jeho účinnosti proti kvasinkám *Candida albicans* a *C. vaginitis*⁴⁰.

3.6. Defensiny a thioniny

Defensiny a thioniny jsou variabilní skupina malých (5 kDa; 45–54 aminokyselinových zbytků), proteinů bohatých na cystein^{2,3}. Antimikrobiální aktivita rostlinných thioninů je známa již od začátku 40. let, kdy byly získány pšeničné thioniny⁴¹. Rostlinné defensiny byly poprvé získány z pšenice (*Triticum aestivum* L.). Vzhledem k strukturální podobnosti s thioniny byly zpočátku defensiny označeny jako γ -thioniny a staly se podskupinou thioninů⁴². Později byla skupina γ -thioninů přejmenována na rostlinné defensiny⁴³. Rostlinné thioniny a defensiny byly do současnosti izolovány z mnoha rostlin^{3,44,45}. Inhibiční aktivita byla prokázána proti řadě houbových patogenů – *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicola*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Candida albicans*². Stabilní strukturu těmto proteinům poskytuje přítomnost sulfidických můstků. Nejčastěji se jedná o čtyři až pět sulfidických můstků^{43,45}. Thioniny jsou syntetizovány ve formě větších prekurzorů (15 kDa), které jsou uvnitř vlastních buněk neaktivní. Odštěpením terminální sekvence se stávají toxickými³. Mechanismus účinku této skupiny proteinů není zcela znám. Při ošetření houby *N. crassa* defensiny Rs-AFP2 (*Raphanus sativus* L.) a DM-AMP1 (*Dahlia merckii* L.) byla zjištěna schopnost vazby na specifické

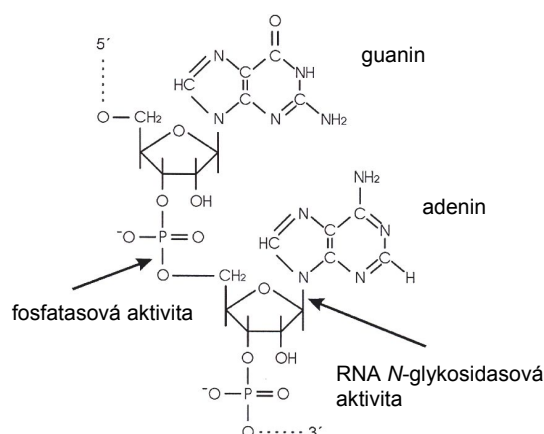
membránové receptory, následkem čehož docházelo k ztrátě iontů K^+ a lyzi buněk⁴⁴.

3.7. Proteiny podobné cyklofilinu

Tyto rostlinné antifungální proteiny (nejčastěji 18 kDa)^{46,47} jsou strukturálně podobné cyklofilinům (angl. „cyclophilin-like proteins“, CLPs), tedy proteinům, které představují intracelulární receptory pro cyklosporin^{2,48}. Poprvé byly tyto proteiny z rostlin izolovány v roce 1990, kdy byla nalezena cDNA těchto proteinů v rostlinách *Lycopersicon esculentum* Mill., *Zea mays* L., a *Brassica napus* L.⁴⁸. Zástupcem této skupiny jsou proteiny mungin (*Phaseolus mungo* L.) a CLAP (*Cicer arietinum* L.)⁴⁷. Proteiny CL jsou aktivní proti řadě houbových patogenů – *R. solani*, *F. oxysporum*, *B. cinerea*, *Coprinus comatus*. Mechanismus účinku těchto proteinů nebyl dostatečně objasněn, mungin *in vitro* inhibuje α -amylasu a vykazuje β -glukosidasovou aktivitu⁴⁶.

3.8. Proteiny inaktivující ribosomy

Proteiny inaktivující ribosomy (angl. „ribosome-inactivating proteins“, RIPs) jsou *N*-glykosidasy, které odbourávají purin z rRNA, což způsobuje rozpad ribosomů a zastavení syntézy proteinů (viz. obr. 2)^{1,2}. Jedná se o skupinu proteinů, které se nacházejí v podstatě u všech organismů. Rostlinné RIPs byly nalezeny např. u druhů *Mirabilis expansa* Ruiz & Pavon⁴⁹, *Pisum sativum* L.⁵⁰, *Zea mays* L., *Ricinus communis* L.⁵¹. Proteiny inaktivující ribosomy jsou rozděleny do tří skupin. Třída I zahrnuje jednořetězové *N*-glykosidasy s hmotností 11–30 kDa. Proteiny třídy II obsahují dva řetězce, a to lektin (B řetězec), který se váže na buňky a *N*-glykosidasu (A řetězec). Mole-



Obr. 2. Působení proteinů inaktivujících ribosomy; proteiny inaktivující ribosomy vykazují fosfatasovou aktivitu narušující fosfodiesterové vazby a RNA *N*-glykosidasovou aktivitu, která deadenyluje rRNA. Převzato a upraveno z lit.¹

kulová hmotnost je přibližně 60 kDa (cit.^{1,2}). Do této třídy patří např. ricin, ebulin a nigrin. Proteiny třídy III jsou složeny ze čtyř řetězců, které jsou organizovány jako dva dimery shodné s typem třídy II. Antifungální aktivita byla doposud popsána pouze u malého počtu zástupců proteinů RI (cit.²). Řetězec B (lektin) se váže na buňky hub a vytváří v buněčné stěně kanálky, pomocí kterých *N*-glykosidasový řetězec A proniká do buněk, kde poškozuje ribosomy⁵². Není známo, jakým způsobem do buněk pronikají proteiny třídy I, které neobsahují řetězec B (cit.²). Kromě antifungálního účinku vykazují tyto proteiny i silnou toxicitu vůči živočišným buňkám⁵².

3.9. Proteiny přenosu lipidů

Proteiny této skupiny (8–9 kDa) zajišťují přenos fosfolipidů mezi membránami (angl. „lipid-transfer proteins“, LTPs)⁵³. Struktura těchto proteinů je zcela specifická. Jsou stabilizovány čtyřmi disulfidickými můstky a vytvářejí centrální dutinu v podobě jakéhosi tunelu. Tyto proteiny jsou aktivní vůči řadě bakterií a hub, ale mechanismus účinku není znám⁵¹. Existují hypotézy, které tvrdí, že tyto proteiny mají schopnost začlenit se do buněčné membrány hub tak, že centrální hydrofóbní dutina vytvoří póry, které umožní odliv intracelulárních iontů a v konečném důsledku způsobí smrt buňky. Jaký je vztah mezi tímto účinkem a funkcí přenosu lipidů není jasné².

3.10. Inhibitory proteas

Inhibitory proteas patří k nejčastěji se vyskytujícím antifungálním proteinům rostlin¹. Cysteinové inhibitory proteas byly izolovány z velkého počtu rostlin^{2,54,55} a vytvářejí čtvrtou skupinu cystatinů, tzv. fyto-cystatiny. Fyto-cystatiny jsou jednoduché polypeptidy o velikosti 10 až 12 kDa (cit.²), které vykazují antifungální aktivitu vůči řadě zástupců fytopatogenních hub – *Claviceps*, *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Alternaria* a *Fusarium*⁵⁶. Princip antifungální aktivity inhibitorů proteas není znám². Z hlediska ochrany rostlin je významná i schopnost těchto proteinů inhibovat trávicí enzymy hmyzích škůdců – především trypsin a α -amylasu. U inhibitorů proteas byla popsána bifunkčnost – inhibice trávicích enzymů i antifungální aktivita. Nejpodrobněji byla antifungální aktivita bifunkčních proteinů popsána u proteinu zeamatinu (*Z. mays* L.)³⁸. Inhibitory proteas, izolované např. z ječmene nebo pšenice, nebyly z hlediska antifungální aktivity studovány.

3.11. Ostatní

Existuje celá řada rostlinných antifungálních proteinů, které nelze zařadit do žádné z výše uvedených skupin. Snakin-1 byl izolován z brambor (*Solanum tuberosum* L.), má velikost 6,9 kDa a je účinný již při koncentraci 10 μ M (cit.⁵⁷). Antifungální účinky vykazuje i 30 kDa velký glykoprotein izolovaný z rostliny *Engelmannia pinnatifida*

Nutt.⁵⁸. Ani u jednoho z těchto proteinů není znám mechanismus účinku.

4. Možnosti využití antifungálních proteinů

Možností využít antifungální proteiny jako zajímavou alternativu chemických fungicidních látek se zabývá mnoho oborů. Podle údajů¹ z roku 2004 bylo v osmi evropských zemích povoleno používání nisinu ke konzervaci potravin. Nisin je antimikrobiální protein produkovaný kmeny bakterie *Lactococcus lactis*⁵⁹. Další oblast využití antifungálních proteinů je farmacie. Ve fázi klinických testů se v současnosti nachází živočišný antifungální protein heliomycin izolovaný z organismu *Heliothis virescens*⁶⁰ a uvažuje se o využití kukuřičného proteinu zeamatinu při léčbě kandidózy způsobené kvasinkou *Candida albicans*^{33,40}. U skupiny proteinů inaktivující ribosomy (RIPs) byla zjištěna rozdílná toxicita vůči nádorovým a normálním buňkám člověka. Existuje teoretická možnost využití těchto proteinů jako selektivních protinádorových léků a imunotoxinů^{61,52}.

Vzhledem k tomu, že rostliny vytvářejí antifungální proteiny jako vlastní obranný systém, nabízí se využití těchto proteinů při ochraně zemědělských plodin. Detekce změn v přítomnosti a množství specifických PR proteinů (zejména PR-1 proteinů, β -glukanas, chitinas) se využívá při studiu indukované rezistence rostlin – proteiny PR se v tomto případě označují jako tzv. ISR („induced systemic resistance“) markery⁵. Možností zvýšit rezistenci rostlin expresí genů antifungálních proteinů v transgenních rostlinách se zabývá mnoho prací. Zvýšené rezistenci bylo dosaženo např. u rostlin tabáku vůči patogenu *Alternaria alternata* po vnesení *tlp* genů rýže⁶², vůči padlí (*Sphaerotheca panosa*) u rostlin růží po vnesení genu *Ace-AMP1* (syntéza proteinů podobných thaumatinu)⁶³, nebo u transgenních linií pšenice vůči fytopatogenní houbě *Fusarium graminearum* po vnesení genů kódujících chitinasu, β -glukanasu a TL proteiny⁶⁴. Zvyšování rezistence rostlin vůči rostlinným patogenům s využitím specifických rostlinných proteinů je v současnosti nejvýznamnější oblastí využití antifungálních proteinů.

5. Závěr

Antifungální proteiny rostlin jsou v současné době řazeny do 11 tříd. Tyto specifické proteiny jsou významnou součástí obranného systému všech rostlin. Antifungální vlastnosti těchto proteinů mohou být v budoucnosti významným nástrojem v boji proti patogenním organismům v mnoha oborech. Přestože jsou nové rostlinné antifungální proteiny objevovány téměř denně, víme o těchto výjimečných proteinech velmi málo. Budoucí využití antifungálních proteinů je podmíněno znalostí jejich specifických vlastností. Jedná se především o významné vlastnosti jako jsou selektivita, synergismus, imunologické vlastnos-

ti, možné křížové reakce s receptory hostitele (člověka), nebo vznik rezistence u cílového patogenu. U většiny antifungálních proteinů je také nutné doplnit chybějící informace o mechanismu účinku jejich působení.

Referát vznikl v rámci řešení projektu GA ČR č. 521/03/P036. Autoři děkují za finanční podporu.

LITERATURA

1. Theis T., Stahl U.: Cell. Mol. Life Sci. 6, 437 (2004).
2. Selitrennikoff C. P.: Appl. Environ. Microbiol. 67, 2883 (2001).
3. Terras F. R.: Dissertation. K. U. Leuven, Belgium 1994.
4. Gloser J., Prášil I. v knize: Fyziologie stresu (Procházka S., ed.) kap. 15. Academia, Praha 1998.
5. Heil M., Bostock R. M.: Ann. Bot. 89, 503 (2002).
6. van Loon L. C., van Strien E. A.: Physiol. Mol. Plant Pathol. 55, 85 (1999).
7. Kombrink E., Schmelzer E.: Eur. J. Plant Pathol. 107, 69 (2001).
8. Breiteneder H.: Allergy 59, 479 (2004).
9. van Loon L. C., Kammen A.: Virology 40, 1 (1970).
10. Agrawal G. K., Jwa N. S., Rakwal R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 274, 157 (2000).
11. Niederman T., Genetet I., Bruyere T., Gees R., Stintzi A., Legrand M., Fritig B., Mosinger E.: Plant Physiol. 108, 17 (1995).
12. Morrisette J., Kratzschmar J., Haendler B., El-Hayek R., Mochca-Morales J., Martin B. M., Patel J. R., Moss R. L., Schleuning W. D., Coronado R., Possani L. D.: Biophys. J. 68, 2280 (1995).
13. Tonon C., Guevara C., Daleo G., Oliva C.: J. Phytopathology 150, 189 (2002).
14. Nielsen K. K., Nielsen J. E., Madrid S. M., Mikkelsen J. D.: Plant Physiol. 113, 83 (1997).
15. Tonon C., Daleo G., Oliva C.: Plant Physiol. Bioch. 39, 849 (2001).
16. Linthorst H. J. M.: Crit. Rev. Plant Sci. 10, 123 (1991).
17. Zemanek A. B., Ko T-S., Thimmapuram J., Hamerschlag F. A., Korban S. S.: J. Plant Physiol. 8, 887 (2002).
18. Kim, Y. J., Hwang B. K.: Physiol. Mol. Plant Pathol. 50, 103 (1997).
19. Meins F. Jr., Ahl P.: Plant Sci. 61, 155 (1989).
20. Graham L. S., Sticklen M. B.: Can. J. Bot. 72, 1057 (1994).
21. Zavareh A. H., Tehrani A. S., Mohammadi M.: Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 69, 555 (2004).
22. Lee S. C., Hwang B. K.: Planta, v tisku (2005).
23. Taira T., Yamagami T., Aso Y., Ishiguro M., Ishihara M. 2001: Biosci. Biotechnol. Biochem. 65, 2710 (2001).
24. Kong L., Anderson J. M., Ohm H. W.: Genome 48, 29 (2005).

25. Sela-Burlage M. B., Ponstein A. S., Vlomans S. A., Melchers L. S., van den Elzen P. J. M., Cornelissen B. J. C.: *Plant Physiol.* 88, 936 (1993).
26. Jach G., Gornhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf E., Leah R., Schell J., Maas C.: *Plant J.* 8, 97 (1995).
27. Bormann C., Baier D., Horr I., Raps C., Berger J., Jung G., Schwartz H.: *J. Bacteriol.* 181, 7421 (1999).
28. van Damme E. J., Charels D., Roy S., Tierens K., Barre A., Martins J. C., Rouge P., van Leuven F., Does M., Peumans W. J.: *Plant Physiol.* 119, 1547 (1999).
29. Friedrich L., Moyer M., Ward E., Ryals J.: *Mol. Gen. Genet.* 230, 113 (1991).
30. Caporale C., Facchiano A., Bertini L., Leonardi L., Chilosi G., Buonocore V., Caruso C.: *J. Mol. Model.* 9, 9 (2003).
31. Nielsen K. K., Nielsen J. E., Madrid S. M., J. D. Mikkelsen S. M.: *Plant Physiol.* 113, 83 (1997).
32. Koo J. C., Lee S. Y., Chun H. J., Cheong Y. H., Choi J. S., Kawabata S. I.: *Biochim. Biophys. Acta* 1382, 80 (1998).
33. Gavrović-Jankulović M., Ćirković T., Vučković O., Atanasković-Marković M., Petersen A., Golgić G.: *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, 805 (2002).
34. Osmond R. I. W., Hrmova M., Fontaine F., Imberty A., Fincher G. B.: *Eur. J. Biochem.* 268, 4190 (2001).
35. Batalia M. A., Monzingo A. F., Ernst S., Roberts W., Robertus J. D.: *Nat. Struct. Biol.* 3, 19 (1996).
36. Koiwa H., Kato H., Nakatsu T., Oda J., Yamada Y., Sato F.: *J. Mol. Biol.* 286, 1137 (1999).
37. Ogata C. M., Gordon P. F., De Vos A. M., Kim S. H.: *J. Mol. Biol.* 228, 893 (1992).
38. Roberts W. K., Selitrennikoff C. P.: *J. Gen. Microbiol.* 136, 1771 (1990).
39. Yun D. J., Ibeas J. I., Lee H., Coca M. A., Narasimhan M. L., Uesono Y., Hasegawa P. M., Pardo J. M., Bressan R. A.: *Mol. Cell* 1, 807 (1998).
40. Stevens D. A., Calderon L., Martinez M., Clemons K. V., Wilson S. J., Selitrennikoff C. P.: *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 361 (2002).
41. Balls A. K., Hale W. S.: *Cereal Chem.* 17, 243 (1940).
42. Colilla F. J., Rocher R., Mendez E.: *FEBS Lett.* 270, 191 (1990).
43. Broekaert W. F., Terras F. R., Cammue B. P., Osborn R. W.: *Plant Physiol.* 108, 1353 (1995).
44. Thevissen K., Francois I. E., Takemoto J. Y., Ferket K. K., Meert E. M., Cammue B. P.: *FEMS Microbiol. Lett.* 226, 169 (2003).
45. Lay F. T., Brugliera F., Anderson M. A.: *Plant Physiol.* 131, 1283 (2003).
46. Ye X. Y., Ng T. B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 1111 (2000).
47. Ye X. Y., Ng T. B.: *Life Sci.* 70, 1129 (2002).
48. Gasser C. S., Gunning D. A., Budelier K. A., Brown S. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9519 (1990).
49. Vivanco J. M., Savary B. J., Flores H. E.: *Plant Physiol.* 119, 1447 (1999).
50. Nielson K., Payne G. A., Boston R. S.: *Plant Physiol.* 119, 1447 (2001).
51. Park S. W., Lawrence C. B., Linden J. C., Vivanco J. M.: *Plant Physiol.* 130, 164 (2002).
52. Peumas W. J., Hao Q., Van Damme J. M.: *FASEB J.* 15, 1493 (2001).
53. Kader J. C.: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 627 (1996).
54. Park K. S., Cheong J. J., Lee S. J., Suh M. C., Choi D.: *Biochim. Biophys. Acta* 1492, 509 (2000).
55. Soares-Costa A., Beltramini L. M., Thiemann O. H., Henrique-Silva F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1194 (2002).
56. Joshi B. N., Sainani M. N., Bastawade K. B., Gupta V. S., Ranjekar P. K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 382 (1998).
57. Segura A., Moreno M., Madueno F., Molina A., Garcia-Olmedo F.: *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 16 (1999).
58. Huynh Q. K., Borgmeyer J. R., Smith C. E., Bell L. D., Shah D. M.: *Biochem. J.* 15, 723 (1996).
59. Breukink E., De Kruijff B.: *Biochem. Biophys. Acta* 1462, 223 (1999).
60. Zasloff M.: *Nature* 415, 389 (2002).
61. Sandvig K., van Deurs B.: *EMBO J.* 19, 5943 (2000).
62. Velazhahan R., Muthukrishnan S.: *Bilogia Plantarum* 47, 347 (2003).
63. Li X., Gasic K., Cammue B., Broekaert W., Korban S. S.: *Planta* 218, 226 (2003).
64. Ahnand A., Zhou T., Trick H. N., Gill B. S., Bockus W. W., Muthukrishnan S.: *J. Exp. Bot.* 38, 1101 (2003).

V. Heřmanová^{a,b}, J. Bárta^a, and V. Čurn^b
^aDepartment of Plant Production, ^bBiotechnological Centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice): **Antifungal Plant Proteins – Classification, Characterization and Potential Applications**

This short review is focused on antifungal plant proteins, their classification and characterization. There are 11 groups of the proteins: PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5 proteins, defensins, thionins, CLPs, RIPs, LTPs, and protease inhibitors. The mechanisms of action of these proteins are as different as their sources and include degradation of fungal cell wall polymers, formation of membrane channels or damage of cellular ribosomes. The mode of action of many proteins remains unknown. The range of fungi that are inhibited by these proteins is very broad, including pathogens of many plants. The genes encoding antifungal proteins can be used to create transgenic plants with increased fungal field resistance. Some antifungal proteins (e.g. zeamatin) are tested for therapeutical use.

INHIBITORY PROTEAS, MECHANISMY ÚČINKU A PERSPEKTIVY JEJICH VYUŽITÍ V TRANSGENOZI ROSTLIN

MAREK HRAŠKA^{a,b}, SLAVOMÍR RAKOUSKÝ^{a,c}
a VLADISLAV ČURN^b

^aKatedra genetiky, Biologická fakulta, ^bBiotechnologické centrum, Zemědělské fakulta a ^cZdravotně sociální fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
mhraska@seznam.cz

Došlo 11.7.05, přijato 9.12.05.

Klíčová slova: inhibitory proteas, ochrana rostlin, transgenní rostliny

Obsah

1. Úvod
2. Integrovaná ochrana rostlin
3. Transgenní rostliny odolné vůči biotickým stresům
4. Inhibitory proteas
 - 4.1.1. Inhibitory serinových proteas
 - 4.1.2. Inhibitory cysteinových proteas
 - 4.1.3. Inhibitory aspartátových proteas a metalo-proteas
- 4.2. Mechanismus toxického působení na hmyz
- 4.3. Regulace inhibitorů proteas
- 4.4. Transgenní rostliny exprimující inhibitory proteas
5. Závěr

1. Úvod

Celosvětová populace se stále rozrůstá, na přelomu tisíciletí dosáhla hranice 6 mld obyvatel a odhady pro rok 2025 mluví již o 8,5 mld. Tento trend klade také stále vyšší nároky na zemědělství, a to nejen co se týče objemu produkce, ale také její kvality. Zemědělství však může vycházet pouze z omezených zdrojů. Podle údajů Světové banky činila průměrná plocha obdělávané zemědělské půdy v roce 1961 0,44 ha na obyvatele planety, v roce 2002 klesla na 0,26 ha a výhled pro rok 2050 hovoří o pouhých 0,15 ha (cit.¹). Zemědělství a šlechtění tedy stojí před nelehkým úkolem nasytit neustále rostoucí množství lidí ze stále se zmenšujících zdrojů.

Klasické šlechtění sice zaznamenalo během uplynulých desetiletí řady pokroků, přesto se již v současnosti přiblížilo hranici svých možností, neboť u řady plodin bylo dosaženo hranice biologického výnosu. Naopak nové poznatky genetiky a molekulární biologie nabízejí zcela nové

možnosti v tvorbě nových, tzv. geneticky upravených nebo-li transgenních odrůd zemědělských plodin. Přímé šlechtění na výnos je kvůli charakteru komplikovaného genetického založení tohoto znaku v současnosti stále ještě obtížné, ale existuje celá řada možností, jak ovlivňovat znaky a vlastnosti mající na konečný výnos a kvalitu rostlinné produkce významný vliv. Jedná se např. o kvalitativní změny spektra aminokyselin a bílkovin, vlastnosti umožňující jednodušší a levnější pěstování, zvyšování odolnosti rostlin vůči suchu, mrazu či zasolení půd. Významným činitelem je odolnost rostlin vůči biotickým stresům. Ztráty a poškození způsobené různými škůdci, houbovými, bakteriálními a virovými chorobami silně zatěžují ekonomiku rostlinné výroby^{1,2}. Ochrana rostlin má kromě přímého vlivu na výši produkce také vliv na rentabilitu pěstování a zdravotní nezávadnost potravin či krmiv.

2. Integrovaná ochrana rostlin

Integrovaná ochrana rostlin představuje moderní trend v boji proti chorobám a škůdcům, jejíž součástí je i tvorba rezistentních odrůd. Možnosti klasického šlechtění jsou však značně omezené, zejména v případech, kdy je rezistence založena kvantitativně, geny rezistence jsou lokalizovány na více lokusech a často ještě nejsou identifikovány. Šlechtitelský pokrok je proto velice zdoluhavý a neodpovídá poměrně rychle se měnícím potřebám pěstitelů. Velmi perspektivní alternativu v podobě možnosti záměrného vnesení genů kvalitativního charakteru představují techniky rekombinantní DNA – transgenozy. Z širokého okruhu rostlinných škůdců je hlavním předmětem zájmu hmyz, neboť se jedná o nejpočetnější skupinu škůdců v zemědělství. Transgenozy umožňuje již nyní poměrně vysoce specificky vymezit okruh cílových skupin hmyzu, na něž technologie (genový produkt) přednostně působí, zatímco jiné zůstávají prakticky nedotčeny. Náznorným příkladem jsou rostliny s vnesenými geny pro δ (delta)-endotoxin *Bacillus thuringiensis*, které již dosáhly značného rozšíření v zemědělské praxi (např. tzv. *Bt*-kukuřice, *Bt*-bavlník). Navíc využitím vhodných promotorů, vymezujících místo a dobu projevu vloženého genu v rostlině jakož i míru jeho exprese, je potenciální rizikovitost modifikovaných plodin dále výrazně snížena. K výčtu pozitiv dané technologie je třeba uvést i snížení zátěže životního prostředí v důsledku omezení či úplné absence postřiků insekticidními přípravky. Hmyz je často také přímým vektorem dalších onemocnění, či jím svým působením otevírá a ulehčuje cestu do rostlinného těla³. Nepřímo je tak ovlivněna kvalita rostlinné produkce a potravin z ní vyrobených. Např. v případě *Bt*-kukuřice bylo již nezvratně prokázáno, že její zrna obsahují až o 60 % méně kancerogenních mykotoxinů než běžná kukuřice, u které jsou hmyzem

poškozená zrna napadána houbami⁴.

Během evoluce se u rostlin vyvinula řada obranných mechanismů vůči škodlivým organismům. Většina jich je soustředěna do semen a jsou aktivovány konstitutivně nebo indukovaně po napadení či onemocnění. Jedná se převážně o látky bílkovinné povahy. Nejznámější rostlinám vlastní obranné proteiny jsou lektiny, ribosomy inaktivující proteiny, inhibitory proteolytických enzymů, glykosidasy, chitinasy či arcelininy¹. Rostliny jsou v neustálém kontaktu s okolím a jejich vztahy se škodlivými činiteli se neustále vyvíjejí a mění. Obranné bariéry rostlin jsou časem překonány a je třeba vyvinout si nový způsob ochrany, který je opět posléze překonán.

3. Transgenní rostliny odolné vůči biotickým stresům

Rostliny vytvořené postupy genového inženýrství, označované jako geneticky modifikované vyšší rostliny (GMVR), představují kvalitativně nový příspěvek do mozaiky integrované ochrany rostlin⁵. GMVR mohou efektivně nahradit, a výzkum a praxe potvrzují, že skutečně nahrazují, konvenčně používané agrochemikálie. Nicméně i v této oblasti vyvstávají otázky možného negativního vlivu v důsledku dané genetické modifikace. Konkrétně se jedná o možnost zrychlení selekce rezistentních populací škůdců či ras patogenních hub⁶. K výraznému omezení těchto rizik u hmyzu byly již vyvinuty a do praxe zavedeny účinné strategie využívající tzv. refugií, kdy na polích vedle odolných GMVR plodin musí být současně pěstován i určitý podíl běžných (citlivých) odrůd, které udržují dostatečnou zásobu citlivých forem hmyzu. Ty se pak kříží s ojediněle se vyskytujícími odolnými jedinci z „transgenních“ polí. Jejich potomstvo je obvykle opět náchylné a tak je oddálen nástup rezistentních forem hmyzu⁶.

Ochrana plodin vůči biotickým stresům je jedním z hlavních objektů zájmu transgenozy rostlin a v současnosti představuje velmi intenzivně řešenou problematiku. Získat či vytvořit transgenní plodinu však vyžaduje splnění několika základních požadavků jako jsou:

- existence vhodného cílového genomu,
- dostatečná charakterizace kandidátského genu a existence vektoru pro jeho vnesení,
- existence postupů pro kultivace explantátových kultur daného objektu a účinný regenerační systém,
- možnost modifikovat cizí gen a zvyšovat či usměrňovat tím jeho expresi,
- identifikace a selekce transformovaných (transgenních) buněk,
- charakterizace potenciálně transformovaných rostlin na molekulární úrovni.

Pokud jsou tyto požadavky jednou splněny, stává se produkce transgenních plodin nesoucích rozličné nové geny takřka rutinní záležitostí. V minulosti byly vypracovány postupy pro transformaci řady modelových i kultur-

ních rostlin³. Zavedení transgenní odrůdy do praxe předchází splnění celé řady dalších náročných kritérií⁷.

Do dnešního dne bylo vyvinuto mnoho postupů, jak vpravit cizorodou DNA do rostlinného genomu. Zdaleka nejrozšířenější jsou však dva okruhy postupů, a to přímá transformace nukleovou kyselinou a transgenozy pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. V prvním případě je plasmidová DNA nesoucí požadované geny nanášena na částičky inertního kovu (nejčastěji zlato či wolfram) a pomocí různých vysokotlakých zařízení je „vstřelována“ do cílové tkáně či shluku buněk⁸. Druhý způsob spočívá ve využití přirozeného jevu, kdy bakterie *A. tumefaciens* je sama o sobě schopna vnést část své DNA (tzv. T-DNA – transferred DNA) nesené na plasmidu Ti (tumor inducing) do rostlinného genomu⁹. Metodami molekulární biologie je možno poměrně snadno tuto T-DNA upravovat a vnášet tak do rostliny různé geny.

První transgenní rostliny tabáku byly získány v roce 1984 a od té doby byly získány transgenní rostliny od více než 100 dalších druhů. Z nich nejúspěšnější se dočkaly uvedení do pěstitelské praxe. Pro představu o rozvoji pěstitelských ploch GMVR odrůd, první transgenní plodiny začaly být velkoplošně pěstovány v r. 1996, v roce 2000 plocha pěstovaných GMVR plodin dosahovala 44,2 mil ha (cit.⁴) a v r. 2004 již 66,7 mil ha. Odhady pro letošní rok předpokládají až 88 mil ha (zdroj ISAAA 2004, cit.⁷). Co se týče plodin odolných proti hmyzu, největšího rozšíření se dočkaly rostliny exprimující gen pro δ -endotoxin z bakterie *B. thuringiensis*. Osevní plochy těchto *Bt*-plodin celosvětově neustále rostou, nicméně výzkum rezistence neustrnul pouze na tomto jednom úspěšném typu a pokračuje i jinými směry. Mnoho dalších genových produktů ovlivňuje výživu a fyziologii škůdců a jsou tedy potenciálně využitelné pro transgenozu rostlin. Předmětem zájmu jsou jak rostlinám vlastní látky (inhibitory proteas, chitinasy, různé sekundární metabolity či lektiny), tak i látky bakteriálního původu či odvozené od genové výbavy vyšších živočichů. Právě inhibitory proteas různého původu jsou intenzivně zkoumanou skupinou potenciálně insekticidních či antifungálních látek¹.

4. Inhibitory proteas

Proteolytické enzymy katalyzují štěpení molekuly bílkoviny na menší řetězce a posléze až na jednotlivé aminokyseliny. Rozlišují se čtyři hlavní skupiny proteas: serinové proteasy obsahující v aktivním centru aminokyselinu serin, cysteinové obsahující cystein, aspartátové se začleněným zbytkem kyselina asparagové a metaloproteasy obsahující ve svém aktivním centru kovové ionty Zn^{2+} , Ca^{2+} či Mn^{2+} (cit.¹).

Proteolýza je klíčový proces všech živých organismů, a proto musí být přesně regulována. Nepřekvapí tedy existence přirozeně se vyskytujících inhibitorů proteas (PI) různého původu, které se klasifikují podle cílových enzymů, které inhibují.

V rostlinách zastávají PI různé funkce, např. v zásob-

ních orgánech či při regulaci proteolytické aktivity. Podílejí se také na regulaci mnoha vývojových procesů včetně programované buněčné smrti a v neposlední řadě tvoří významnou složku obranných mechanismů rostlin vůči hmyzu a patogenům. V rostlinách se často vyskytují v překvapivě vysokých koncentracích¹⁰. Syntetizovány jsou buď konstitutivně nebo jako odpověď na právě vzniklé poškození či probíhající napadení¹.

První náznaky poukazující na možnou roli PI v obraně rostlin se objevily již v roce 1947. Mickel a Standish¹¹ pozorovali, že pokud jsou larvy rozličného hmyzu udržovány na extraktech sóji, tak ztrácejí schopnost normálního vývoje. Posléze byl prokázán toxický efekt inhibitoru trypsinu sóji na larvy brouka *Tribolium confusum*. Poté byla identifikována celá řada podobných látek, jejichž insekticidní účinky byly prokázány jak v *in vitro* testech na střevních enzymech hmyzu, tak i *in vivo* na živém hmyzu².

Z metodického hlediska skýtají geny kódující PI jednu významnou výhodu. Lze je poměrně jednoduše přenášet z jednoho rostlinného (či živočišného) druhu do druhého a docílit jejich exprese v nové rostlině za použití jejich již stávajících regulačních mechanismů, či pod kontrolou souběžně vnesených promotorů. Tímto způsobem Hilder a spol.¹² v roce 1987 transformovali tabák genem pro inhibitor trypsinu z bobovité rostliny vigny a navodili tak jeho zvýšenou odolnost vůči širokému spektru hmyzích škůdců. Doposud nebyl potvrzen negativní účinek nového genového produktu na vyšší organismy. Někteří autoři se dokonce domnívají, že vzhledem ke svému charakteru (jsou bohaté na lysin a cystein) mohou PI zlepšovat nutriční hodnotu rostlin¹³.

PI vykazují velmi široké spektrum inhibiční aktivity vůči mnoha organismům, jako např. hádčákům, jsou rovněž schopny potlačit zrání spor a růst mycelia některých houbových patogenů. Všechny tyto vlastnosti představují PI jako vhodnou skupinu látek využitelnou pro tvorbu transgenních odrůd polních plodin. Navíc transformace rostlin geny pro PI není zajímavá pouze z pohledu produkce odolných rostlin jako takových, ale i z pohledu využití rostlin jako „továren“ vyrábějících inhibiční proteiny využitelné i pro jiné účely v ostatních oblastech lidské činnosti².

4.1.1. Inhibitory serinových proteas

Role PI serinových proteas jako defenzivní složky ochrany rostlin je již poměrně dlouho známa. Serinové proteasy nejsou ve větším množství využívány v procesech primárního metabolismu a tudíž přítomnost velkého množství inhibitorů právě těchto enzymů vylučuje jejich jakoukoli roli v regulaci vnitřních pochodů rostlin. Inhibitory serinových proteas byly popsány v mnoha rostlinných druzích a rostlinné PI vykazují určitou podobnost. Nejvíce prozkoumanou skupinou jsou inhibitory trypsinu. Poměrně snadná dostupnost trypsinu a snadné měření jeho katalytické aktivity vedly k tomu, že PI serinových proteas se staly předmětem mnohem intenzivnějšího zkoumání než další zástupci PI, nicméně získané poznatky jsou úspěšně aplikovatelné nejen na celou skupinu PI serinových proteas,

ale i na ostatní třídy PI. Všechny inhibitory výše zmíněné skupiny jsou kompetitivní inhibitory.

Serinové proteasy byly nalezeny v zaživacím traktu mnohých zástupců hmyzu, zejména řádu motýlů *Lepidoptera*, který zahrnuje celou řadu významných škůdců rostlin. Mnoho těchto trávicích proteolytických enzymů je ovlivňováno právě PI serinových proteas, jejichž optimální pH prostředí 9–11 koresponduje s obvyklým pH střevního traktu řady zástupců *Lepidoptera*. Antinutriční účinek byl demonstrován celou řadou pokusů².

4.1.2. Inhibitory cysteinových proteas

Při izolacích střevních proteas z larev hmyzu zavíječe *Callosobruchus macalatus* a mšice *Zabrotes subfaceatus* byla odhalena, mimo jiné, též přítomnost cysteinových proteas. Podobné proteasy byly izolovány také ze střev několika dalších hmyzích druhů. Všechny byly inhibovány jak syntetickými, tak i přirozeně se vyskytujícími PI a jejich příslušnost k dané třídě byla posléze potvrzena řadou testů. Optimální pH cysteinových proteas je v neutrální až mírně kyselé oblasti (pH 5–7).

Pokročilými postupy enzymologie posledních let byla identifikována celá řada inhibitorů proteas, jako např. alpin. PI cysteinových proteas byly popsány v řadě rostlinných druhů, např. u bramboru, vigny, avokáda či papáji. Nejvíce prostudovaný je PI pocházející z rýže, tzv. oryzacystatin.

4.1.3. Inhibitory aspartátových proteas a metaloproteas

Znalosti o této skupině enzymů u hmyzu jsou ve srovnání se dvěma předešlými nesrovnatelně menší. Aspartátové proteasy byly nalezeny spolu s cysteinovými u šesti zástupců skupiny ploštic *Hemiptera*. Nízké pH střevního prostředí zástupců skupin brouků *Coleoptera* a *Hemiptera* představuje mnohem vhodnější podmínky pro aspartátové proteasy než vysoké pH (8–11) střev většiny ostatních druhů. V silně zásaditém prostředí ztrácejí svou aktivitu. U rostlin byly doposud charakterizovány dvě skupiny PI metaloproteas, rodina PI metalo-karboxypeptidas z bramboru a rajčat a skupina cathepsin D PI brambor.

4.2. Mechanismus toxického působení PI na hmyz

Přesný způsob, jakým PI pracují, je stále předmětem intenzivního výzkumu. Získané znalosti o projevech a regulaci inhibitorů pocházejících z rostlin, živočichů, mikroorganismů, ale i třeba z virů, přispěly k vývoji či modifikaci celé řady postupů v medicíně či zemědělství, využívajících právě PI.

Obecně lze konstatovat, že sekrece proteolytických enzymů ve střevě hmyzu je ovlivňována spíše obsahem bílkovin v přijímané potravě, než jejím celkovým množstvím¹⁴. Sekrece proteas je indukována dvěma odlišnými cestami. Jedná se o přímé působení složek potravy (hlavně bílkovin) na epiteliální buňky střeva hmyzu nebo o hormonální regulaci iniciovanou příjmem potravy. Modelové studie odhalily, že příjem potravy stimuluje syntézu

a sekreci trávicích enzymů z epiteliálních buněk zadní části středního střeva. Enzymy jsou pak uvolněny z membránově asociovaných komplexů a následně odděleny v podobě váčků, které jsou postupně spojovány s cytoskeletem. Peptidasy jsou vyloučeny do ekto-peritrofitického prostoru v epitelu, ze kterého prostupují transversálně do středního lumen. Zde pak degradují bílkoviny stravy. PI inhibují proteasovou aktivitu těchto trávicích enzymů a snižují tak množství proteinu, které může být stráveno. Inhibice proteas zároveň vede k nadprodukcii trávicích enzymů, což má za následek vyčerpání rezerv sirných aminokyselin. V krajním případě je výsledkem všech těchto pochodů oslabení hmyzu, jeho omezený vývoj a často smrt².

Trávicí proteolytické enzymy různých řádů hmyzu většinou náležejí k některé z hlavních skupin proteas. Zástupci skupin *Coleoptera* a *Hemiptera* vykazují přítomnost převážně cysteinových proteas, zatímco příslušníci motýlů *Lepidoptera*, blanokřídlých *Hymenoptera*, „kobylek“ *Orthoptera* a dvoukřídlých *Diptera* využívají spíše serinových enzymů. Účinek PI na hmyz nemusí být vždy inhibice proteolytické aktivity. Nedávné studie prokázaly, že může také dojít ke vzniku zpětné vazby. Cílový hmyz totiž často disponuje dvěma či více odlišnými skupinami trávicích enzymů. Jedny mohou být k inhibitorům citlivé, jiné naopak ne. Výsledkem působení PI na jedince disponujícího takovouto enzymovou výbavou pak může být přednostní produkce PI-rezistentních proteolytických enzymů^{15,16}.

Způsob, jakým se PI váží na cílové trávicí enzymy, se zdá být pro všechny čtyři skupiny stejný. Inhibitor se naváže na aktivní centrum enzymu a vytvoří komplex o velmi malé disociační konstantě (10^7 až 10^{14} M při neutrálním pH). Tím efektivně blokuje aktivní centrum. Jedná se o kompetitivní inhibici. Střevní proteasy nejsou jedinou skupinou látek ovlivňovaných PI, omezena je aktivita mnoha dalších enzymů, vodní rovnováha, a některé další fyziologické pochody⁶.

4.3. Regulace inhibitorů proteas

Inhibitory proteas, které se v rostlinách akumulují jako odpověď na poranění, byly již v minulosti dostatečně charakterizovány. První práce s těmito inhibitory u bramboru odhalily, že iniciační faktor proteas (PIIF- protease inhibitor initiation factor) uvolněný v odpovědi na poranění či poškození rostliny je tou sloučeninou, která uvolňuje sled dějů vedoucích k syntéze PI (cit.¹⁷).

Dnes se usuzuje na to, že produkce PI je řízena oktadekanovou dráhou, kterou je mimo jiné zprostředkován rozklad kyseliny linolenové na mnoho výsledných produktů, z nichž jedním je kyselina jasmonová (JA). Tyto pochody ve svém důsledku vedou k indukci exprese genů kódujících PI. Zajímavá je také funkční souvislost s poraněním. Za odezvu na poranění rostlin jsou zodpovědné čtyři systemicky působící faktory, signální látky systemin, kyselina abscisová (ABA), hydraulické signály a elektrické signály¹⁸. Molekuly signálních látek jsou transportovány od místa poranění vodivými pletivy rostli-

ny. První zástupce, systemin, peptid obsahující 18 aminokyselin, byl intenzivně zkoumán u rajčete, v jehož poraněných listech byla silně indukována exprese genů kódujících PI. Oproti tomu, transgenní rostliny, které exprimovaly protismyslovou („antisense“) cDNA prosysteminu, vykazovaly podstatné snížení syntézy PI a následně i snížení odolnosti rostliny vůči hmyzím škůdcům¹⁹. Je známo, že v odpovědi na poškození hmyzem či patogenem systemin rajčete reguluje expresi asi 20 obranných genů a také aktivuje signální dráhu, během které je kyselina linolenová uvolněna z membránových struktur a konvertována na JA. Povrchový receptor systeminu (160 kDa), indukovaný poraněním, reguluje intracelulární kaskádu zahrnující depolarizaci plazmatické membrány a otevření iontových kanálů. Výsledkem je zvýšený obsah intracelulárního Ca^{2+} , který aktivuje mitogenem aktivovanou fosfokinasu (MAP kinasu) a fosfolipasu A. Tyto rychlé změny ve svém důsledku vedou k uvolnění kyseliny linolenové z intracelulárních membrán, a zřejmě i z plazmatické membrány, a její konverzi na JA, silného aktivátora exprese obranných genů rostliny²⁰. Další práce na rajčeti prokázaly, že ke zvýšení hladiny jasmonátu dochází souhrou poranění rostliny, působení systeminu a různých oligosacharidů, vznikajících degradací pektinu, např. působením polygalaktorunasy. Úloha jasmonátu jako agens odpovídajícího na poranění rostliny a zvyšujícího lokální či systemickou expresi PI byla prokázána u mnoha rostlinných druhů²¹. Objev konzervativního motivu v promotoru PI-IK bramboru, tzv. G-boxu (sekvence CACGTGG), který je indukován JA, tuto myšlenku jen dále podporuje. Další studie na modelových objektech potvrdily významnou roli rostlinných růstových regulátorů, např. ABA, v přenosu signálu poranění. Hladina ABA a paralelně s ní i syntéza PI se zvyšuje v odpovědi na poranění, elektrické signály, tepelné šoky nebo aplikaci systeminu²². Přesto se však usuzuje pouze na okrajovou roli ABA v indukci tvorby PI, neboť bylo experimentálně prokázáno, že i velmi vysoké koncentrace ABA (100 mM) indukovaly pouze slabě transkripci mRNA PI (cit.²³).

Je zcela zřejmé, že dráhy přenášející informace o poranění a obranné dráhy se značně překrývají. Expese poraněním a JA indukovaných genů může být pozitivně či negativně regulována ethylenem či kyselinou salicylovou (SA). Obě sloučeniny jsou součástí obranné dráhy indukované patogenem. Stimulující efekt JA a tlumící efekt ethyleny byly prokázány ve studiích na modelech *Arabidopsis thaliana*²⁴ a *Griffonia simplicifolia*²⁵.

V některých případech jsou rostliny schopny „vzdát“ se jednoho obranného mechanismu ve prospěch jiného. Např. SA a její methylester jsou sloučeniny silně navozující tzv. systémově získanou rezistenci rostlin jako reakci na napadení některé její části patogenem. Nicméně nemusí tomu tak být vždy. V některých případech může SA potlačit obranu rostliny cestou naředění a zeslabení oktadekanové dráhy, zatímco její methylester působí opačně, ve prospěch obranných mechanismů rostliny. V nedávné době byla identifikována celá řada podobně se chovajících drah, zdaleka však nebyly plně charakterizovány. Komponenty

Tabulka I

Některé hmyzu odolné transgenní rostliny exprimující geny pro inhibitory proteas živočišného a rostlinného původu (přehled Schuler a spol., 1998, cit.⁶)

PI	Cílový hmyz	Transformované rostliny
Anti-chymotrypsin z <i>Manduca sexta</i>	<i>Homoptera</i>	bavlník, tabák
Anti-elastasa z <i>Manduca sexta</i>	<i>Homoptera</i>	vojtěška, bavlník, tabák
α -Antitrypsin (α 1 AT)	<i>Lepidoptera</i>	brambor
Antitrypsin z <i>Manduca sexta</i>	<i>Homoptera</i>	bavlník, tabák
Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu	<i>Lepidoptera, Orthoptera</i>	salát, petúnie, brambor, tabák, jetel plazivý
PI ze sleziny	<i>Lepidoptera</i>	brambor
C-II (PI sóji)	<i>Coleoptera, Lepidoptera</i>	řepka, topol, brambor, tabák
CMe (inhibitor trypsinu ječmene)	<i>Lepidoptera</i>	tabák
CMTI (inhibitor trypsinu dýně)		tabák
CpTI (inhibitor trypsinu luskovin)	<i>Coleoptera, Lepidoptera</i>	jabloň, řepka, salát, brambor, rýže, jahodník, slunečnice, sladké brambory, tabák, rajče
MTI-2 (PI hořčice)	<i>Lepidoptera</i>	<i>Arabidopsis</i> , tabák
OC-1 (PI rýže)	<i>Coleoptera, Homoptera</i>	řepka, topol, tabák
PHV (PI soji)	<i>Lepidoptera</i>	brambor, tabák
Pot PI-I (PI I bramboru)	<i>Lepidoptera, Orthoptera</i>	petunie, tabák
Pot PT-I (PI II bramboru)	<i>Lepidoptera, Orthoptera</i>	tabák, salát, rýže, břiza
SKTI (Kunitzův inhibitor trypsinu sóji)	<i>Lepidoptera</i>	brambor, tabák
PI I rajčete	<i>Lepidoptera</i>	vojtěška, tabák, rajče, lilek
PI II rajčete	<i>Lepidoptera</i>	tabák, rajče

těchto drah jsou většinou založené na reverzní fosforylaci, pochodech regulovaných vztahy vápník/kalmodulin a produkci aktivního kyslíku²⁶.

4.4. Transgenní rostliny exprimující inhibitory proteas

Zjištění, že v některých rostlinách přirozeně se vyskytující PI mohou potlačit činnost trávicích enzymů hmyzu, vedlo k myšlence vnést kódující sekvence PI do genomu zemědělsky významných plodin, či zvýšit expresi v rostlině již přítomných PI. Prvním úspěšným přenosem genu kódujícího PI byla v roce 1987 publikovaná transformace tabáku genem pro inhibitor trypsinu z bobovité rostliny vigny.

Doposud bylo pro transgenozu rostlin použito asi 14 genů kódujících PI. Převážně šlo o inhibitory serinových proteas pocházející z čeledi bobovitých *Fabaceae*, lilkovitých *Solanaceae* a lipnicovitých *Poaceae*. Cíleny byly převážně proti zástupcům hmyzu skupiny *Lepidoptera*, ale také proti některým škůdcům zastupujících řády *Coleoptera* a *Orthoptera*. Předmětem zájmu však nejsou pouze geny pro PI pocházející z rostlin, ale též geny pro PI živočišného původu. Stručný přehled o úspěšně transformovaných rostlinách sekvencemi PI podává tabulka I.

Ačkoliv hlavním objektem zájmu je hlavně hmyz, inhibitory proteas vykazují i aktivitu vůči houbovým pato-

genům, virům či háďátkům. Inhibitory serinových proteas potlačovaly růst polyfágní houby *Botrytis cinerea*, původce onemocnění luskovin *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, či patogena brukvovitých *Alternaria brassicicola*²⁷. PI cysteinových proteas pocházející z rýže exprimovaný v transgenním tabáku zvyšoval odolnost vůči potyvírům, viru lepivosti tabáku a Y viru brambor. Proti viru mozaiky tabáku však PI cysteinových proteas nebyl účinný²⁸. Inhibitory převážně serinových a cysteinových proteas byly s úspěchem použity pro tvorbu transgenních rostlin odolných vůči některým háďátkům^{29,30}.

5. Závěr

Přestože byly identifikovány geny kódující celou řadu PI pocházejících z různých organismů a bylo jimi transformováno mnoho druhů rostlin, vývoj tohoto typu transgenních rostlin je stále ještě na svém počátku. Výzkum poukázal na celou řadu limitujících a často i negativních faktorů v současnosti omezujících širší využití transgenních plodin exprimujících PI a dodnes nebyla žádná taková rostlina uvolněna pro komerční praxi.

Významným omezením rychlejšího vývoje této strategie GM rostlin je nesmírná variabilita trávicích proteas hmyzu, kdy je odhadováno, že ve střevě se vyskytuje více než jeden tisíc rozdílných enzymů. Je tedy nemožné ovliv-

nit expresi jednoho PI všechny proteasy hmyzu². Pro navození odolnosti transgenních rostlin tedy bude nezbytné vnášet více genů pro PI, lišících se v mechanismu působení či geny pro další insekticidní látky. Hmyz je navíc schopen kompenzovat inhibici jednoho proteolytického enzymu využitím jiného, který není ovlivněn³¹, či jednoduše přejít na produkci enzymů k PI necitlivých^{32–36}. V některých případech byl dokonce pozorován opačný efekt exprese PI v transgenní rostlině než snížení jejího poškození. Škodlivý hmyz sice vykazoval inhibici proteolytických enzymů, tuto si však kompenzoval jednoduše tím, že zkonsumoval více rostlinné hmoty^{37,38}. Letální účinek PI také není vždy 100%, často dochází pouze ke zpomalení vývoje hmyzu či snížení jeho plodnosti³⁹.

Z hlediska praktického využití je nezanedbatelnou otázkou také možný nežádoucí vliv rostlin exprimujících PI na necílové organismy. Ať už se jedná o přímou konzumaci rostlinných částí obsahující PI či o potravní vztahy predátorů a jejich potravy, které byly vystaveny účinkům PI, nelze tuto skutečnost přehlížet^{40–42}. Rostliny exprimující PI jsou předmětem hodnocení potenciálních rizik stejně jako všechny ostatní transgenní plodiny uvolněné do prostředí nebo u kterých je jejich uvolnění plánováno^{43,44}. Potenciální rizika PI pro živočichy a člověka nebyla zatím podrobněji studována vzhledem k tomu, že výzkum se doposud zaměřoval pouze na aspekty spojené s vývojem metodik a studium mechanismů účinku vůči cílovým skupinám organismů.

Efekt a využití transgenních rostlin exprimujících PI nelze doposud srovnávat např. s *Bt*-rostlinami, neboť výzkum v oblasti PI probíhá nesrovnatelně kratší dobu. Dodnes publikované výsledky však poukazují na to, že PI budou v budoucnu jedním ze způsobů efektivní kontroly škodlivých činitelů a najdou si své místo v integrované ochraně rostlin.

Práce vznikla za podpory grantů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MŠMT IPO5ME800 a MSM 60076658-06 a Grantové agentury ČR GA ČR-31/H160.

LITERATURA

1. Carliny C. R., Grossi-de-Sá M. F.: *Toxicon* 40, 1515 (2002).
2. Lawrence P. K., Koundal K. R.: *Electron. J. Biotechnol.* 5, 93 (2002).
3. Sharma H. C., Sharma K. K., Seetharama N., Ortiz R.: *Electron. J. Biotechnol.* 3, 6 (2000).
4. Munkvold G. P., Hellmich R. L., Rice L. G.: *Plant Dis.* 83, 130 (1999).
5. Babu R. M., Sajeena A., Seetharaman K., Reddy M. S.: *Crop Prot.* 22, 1071 (2003).
6. Schuler T. H., Poppy G. M., Kerry B. K., Denholm I.: *Trends Biotechnol.* 16, 168 (1998).
7. ISAAA : <http://www.isaaa.org/main.htm>, staženo 27. června 2005.
8. Klein T. M., Wolf E. D., Wu R., Stanford J. C.: *Nature* 327, 70 (1987).
9. Chilton M.-D., Drummond M. H., Merlo D. J., Sciaky D., Montoya A. L., Gordon M. P., Nester E. W.: *Cell* 11, 263 (1977).
10. Murdock L. L., Shade R. E.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 6605 (2002).
11. Mickel C. E., Standish J.: University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 178, 1 (1947).
12. Hilder V. A., Gatehouse A. M. R., Sheerman S. E., Barker R. F., Boulter D. A.: *Nature* 300, 160 (1987).
13. Ryan C. A., v knize: *Variable Plants and Herbivores in Natural and Managed Systems* (Denno R. F., McClure M. S., ed.), 741–747. Academic Press, New York 1989.
14. Baker J. E., Woo S. M., Mullen M. A.: *Ent. Exp. App.* 36, 97 (1984).
15. Jongsma M. A., Bakker P. L., Peters J., Bosch D., Stiekema W. J.: *PNAS* 92, 8041 (1995).
16. Michaud D., Nguyen-Quoc B., Vrain T. C., Fong D., Yelle S.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31, 451 (1996).
17. Melville J. C., Ryan C. A.: *Biol. Chem.* 247, 3415 (1973).
18. Malone M., Alarcon J. J.: *Planta* 196, 740 (1995).
19. McGurl B., Orozco-Cardenas M., Pearce G., Ryan C. A.: *PNAS* 91, 9799 (1994).
20. Ryan C. A.: *Biochim. Biophys Acta* 1477, 112 (2000).
21. Wasternack K. F., Parthier B.: *Trends Plant Sci.* 2, 302 (1997).
22. Koiwa H., Bressan R. A., Hasegawa P. M.: *Trends Plant Sci.* 2, 371 (1997).
23. Birkenmeier G. F., Ryan C. A.: *Plant Physiol.* 117, 687 (1998).
24. Epple P., Aprl K., Bohlmann H.: *Plant Physiol.* 109, 813 (1995).
25. Zhu-Salzman K., Salzman R. A., Koiwa H., Murdock L. L., Bressan R. A., Hasegawa P. M.: *Physiol. Plant.* 104, 365 (1998).
26. León J., Rojo E., Sanchez-Serano J. J.: *J. Exp. Botany* 52, 1 (2001).
27. Lorito M., Broadway R. M., Hayes C. K., Woo S. L., Noviello C., Williams D. L., Harman G. E.: *Mol. Plant-Microbe Int.* 7, 525 (1994).
28. Gutierrez-Campos R., Torres-Acosta J. A., Saucedo-Arias L. J., Gomez-Lim M. A.: *Nature Biotech.* 17, 1223 (1999).
29. Urwin P. E., Levesley A., McPherson M. J., Atkinson H. J.: *Mol. Breed.* 6, 257 (2000).
30. Urwin P. E., Troth K. M., Zubko E. I., Atkinson H. J.: *Mol. Breed.* 8, 95 (2001).
31. Wu Y., Llewellyn D., Mathews A., Dennis E. S.: *Mol. Breed.* 3, 371 (1997).
32. Jongsma M. A., Bakker P. L., Stiekema W. J., Bosch D.: *Mol. Breed.* 1, 181 (1995).
33. De Leo F., Bonadé-Bottino M. A., Ceci L. R., Gallerani R., Jouanin L.: *Plant Physiol.* 118, 997 (1998).
34. Bonadé-Bottino M., Lerin J., Zaccomer B., Jouanin L.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 131 (1999).

35. Paulilo L. C. M. S., Lopes A. R., Cristofolleti P. T., Parra J. R. P., Terra E. R., Silvia-Filho M. C.: *J. Econ. Entomol.* *93*, 892 (2000).
36. Brito L. O., Lopes A. R., Parra J. R. P., Terra W. R. Silva-Filho M. C.: *Crop Biochem. Physiol.* *128B*, 365 (2001).
37. Cloutier C., Jean C., Fournier M., Yelle S., Michaud D.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* *44*, 69 (2000).
38. Winterer J., Bergelson J.: *Mol. Ecol.* *10*, 1069 (2001).
39. De Leo F., Gallerani R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* *32*, 489 (2002).
40. Girard C., Picard-Nizou A. L., Grallien E., Zaccomer B., Jouanin L., Pham-Delegue M. H.: *Transgenic Res.* *7*, 239 (1998).
41. Bouchard E., Michaud D., Cloutier C.: *Mol. Ecol.* *12*, 2429 (2003).
42. Ferry N., Raemaekers R. J. M., Majerus M. E. N., Jouanin L., Port G., Gatehouse J. A., Gatehouse A. M. R.: *Mol. Ecol.* *12*, 493 (2003).
43. Atkinson H. J., Green J., Cowgill S., Aurora L.: *Trends Biotechnol.* *19*, 91 (2000).
44. Cowgill S. E., Atkinson, H. J.: *Transgenic Res.* *12*, 439 (2003).

M. Hraška^{a,b}, S. Rakouský^{a,c}, and V. Čurn^b
(^a*Department of Genetics, Faculty of Biology,* ^b*Biotechnological Centre, Faculty of Agronomy,* ^c*Health and Social Faculty, University of South Bohemia, České Budějovice*): **Protease Inhibitors, Mode of Action and Perspectives for Plant Transgenesis**

Contemporary cultivation of field crops utilizes new findings of biotechnologies, specifically recombinant DNA and transgenous techniques to an ever-increasing extent. Transgenic plants enriched in various new genes already became common practice in agriculture of a number of developed but also developing countries. The research in this field intensively grows, also entirely new directions, in addition to already proved gene manipulations, are the subject of interest. The contribution deals with classification and function of some protease inhibitors utilizable in transgenesis of plants. It concentrates also on the aspects associated with possible use of their recombinated genes in enhancement of resistance of plants to insect pests and some pathogens. Some examples are given of important transgenic plants which already express genes for most important protease inhibitors.

ASIMILACE DUSIČNANOVÉHO, AMONNÉHO A AMIDICKÉHO DUSÍKU U ZEMĚDĚLSKÝCH PLODIN

JOSEF ZEHNÁLEK, VOJTĚCH ADAM a RENÉ KIZEK

*Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
zahnalek@mendelu.cz*

Došlo 14.6.04, přepracováno 13.2.06, přijato 18.3.06.

Klíčová slova: asimilace dusíku, dusík, dusičnanový dusík, amonný dusík, amidický dusík, nitrogenasa, nitrátreduktasa, nitritreduktasa, glutamátdehydrogenasa, ureasa, aminotransferasy, dusíkatá hnojiva

Obsah

1. Úvod
2. Obsah a formy dusíku v půdě
3. Význam dusíku pro rostliny
 - 3.1. Příjem a asimilace dusíku rostlinami
 - 3.1.1. Příjem vzdušného dusíku
 - 3.1.2. Příjem nitrátů
 - 3.1.3. Příjem amonného dusíku
 - 3.1.4. Příjem dusíku z močoviny
 - 3.2. Vliv dusíku z kapalného hnojiva DAM-390 na ječmen jarní
4. Regulace a transport

1. Úvod

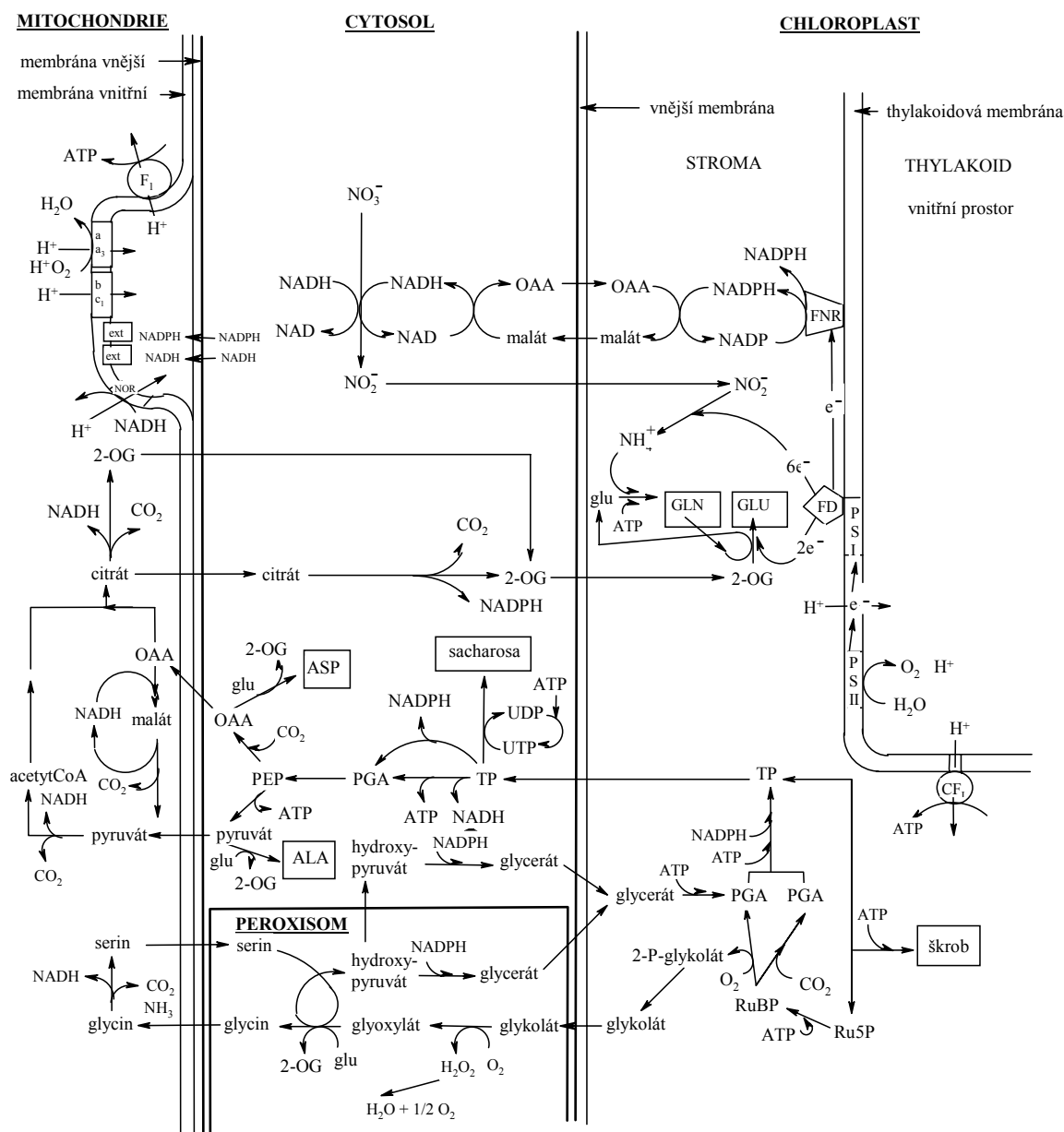
Zemědělské plodiny získávají svou energii ze slunečního záření v procesech spojených s fotosyntézou. Získaná chemická energie je využívána především pro asimilaci oxidu uhličitého, který vstupuje do Calvinova cyklu. Tímto způsobem představuje fotosyntéza základ látkového i energetického metabolismu rostlin a zabezpečuje zdroj energie i organických látek pro všechny heterotrofní organismy (organismy neschopné fotosyntézy). Produkty fotosyntézy jsou také zdrojem energie pro příjem mikro a makro elementů, včetně různých anorganických forem dusíku. Přehledné schéma tvorby a využití chemické energie v průběhu syntézy sacharidů a aminokyselin v buňkách listů C_3 rostlin je ukázáno na obr. 1 (cit.¹).

2. Obsah a formy dusíku v půdě

Hlavním zdrojem dusíku pro rostliny jsou amonné a nitrátové ionty obsažené v půdě. Obsah celkového dusíku v ornici (svrchní vrstva půdy 0–25 cm) je poměrně stálý (98–99 % organicky vázaný dusík a 1–2 % anorganicky vázaný dusík), protože je v rozhodující míře zabudovaný do těžce biologicky i chemicky rozložitelných sloučenin. Dusík je zde vázán na aromatická jádra huminových kyselin, fulvokyselin, huminů a dalších složitých organických sloučenin. Průměrný obsah dusíku v ornici se pohybuje v rozmezí 0,11–0,23 %. V závislosti na půdním typu se za vegetační období z půdních zásob (organicky vázaného dusíku) zpřístupní mineralizací 90–200 kg N na hektar. Mineralizace (tvorba anorganického dusíku) probíhá aerobním rozkladem půdní organické hmoty. Vzniklé aniony NO_3^- se nacházejí v půdním roztoku a kationy NH_4^+ jsou výměnným způsobem vázány na půdní sorpční komplex nebo pevně fixovány do mezivrstvových prostorů jílových minerálů. Koncentrace anorganického dusíku v půdním roztoku je relativně nízká a např. u dusičnanového dusíku se pohybuje od 0,1 do 1,0 mmol l^{-1} (cit.²).

3. Význam dusíku pro rostliny

V rostlinách je dusík obsažen jak v anorganické, tak hlavně v organické formě. Organické sloučeniny dusíku plní v rostlinách celou řadu funkcí, např. stavební, metabolickou, transportní i zásobní³. Množství dusíku v rostlinné sušině se v průměru pohybuje v rozmezí 1–3 % a zřídka klesá pod 1 %. Nitrofilní rostliny na ruderalních stanovištích mohou obsahovat v sušině až 6 % dusíku. Obsah dusíku je v rostlinách regulován různými způsoby, pravděpodobně i geneticky, a je v různých částech rostliny odlišný⁴. Významné jsou i rozdíly v obsahu dalších prvků (S, P, Mg, K atd.) mezi jednotlivými orgány a pletivy rostliny. Ke změnám v obsahu prvků v různých rostlinných částech dochází také v průběhu ontogeneze. U obilnin v období odnožování je intenzita příjmu živin přibližně na úrovni nárůstu jejich hmotnosti, zatímco při sloupkování intenzita příjmu živin (zejména u dusíku) zaostává za intenzitou růstu, a v době od květu do zrání je příjem dusíku, fosforu a hořčíku zhruba opět na úrovni nárůstu sušiny. Celkové množství přijímaného prvku se během růstu rostliny zvyšuje, ale obsah vztažený na jednotku hmotnosti sušiny klesá. Tento jev je způsoben zvyšováním množství celulosy, hemicelulosy a ligninu v celkové hmotnosti sušiny rostliny. Změny obsahu živin během ontogeneze mají poměrně pravidelný průběh a řada autorů je popsala i vhodnou matematickou funkcí, např. Justes a spol.⁵.



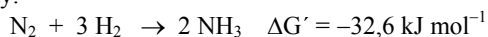
Obr. 1. Schéma produkce energie a jejího využití v průběhu syntézy sacharidů a hlavních aminokyselin v listových buňkách rostlin C₃; ALA – alanin, ASP – asparát, ATP – adenosintrifosfát, FD – ferredoxin, FNR – ferredoxin-NADP-oxidoreduktasa, GLN – glutamin, GLU – glutamát, NAD – nikotinamadeninukleotid, NADP – nikotinamadeninukleotidfosfát, OOA – oxalacetát, 2-OG – 2-oxoglutarát, PEP – fosfoenolpyruvát, PGA – 3-fosfoglycerát, PSI – fotosystém I, PSII – fotosystém II, Ru5P – ribulosa-5-fosfát, RuBP – ribulosa-1,5-bisfosfát, TP – triosafosfát

3.1. Příjem a asimilace dusíku rostlinami

3.1.1. Příjem vzdušného dusíku

Kromě půdy může být zdrojem dusíku pro rostliny atmosféra (jeho molekulární forma N₂). Molekula N₂ je chemicky velmi stabilní a k jejímu zapojení do oběhu

v živých organismech je nezbytná její redukce na amonné ionty.



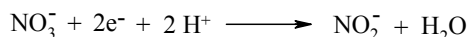
Redukce molekulárního dusíku probíhá jen u nemnoha prokaryotních organismů (např. půdní bakterie rodu *Azotobacter* a *Clostridium*, sinice rodu *Nostoc*). Nejeftivnější zdroj amoniaku pro vyšší rostliny jsou bakterie

rodu *Rhizobium*, které žijí symbioticky v hlízkách na kořenovém systému bobovitých rostlin a jejich činností je fixováno 10 až 30 g dusíku na m² za rok. V kořenových hlízkách se těsně spojují bakteriální buňky, které degenerují na tzv. bakteroidy s buňkami hostitelské rostliny. Bakteroidy produkují enzym nitrogenasu (EC 1.18.6.1.) a speciální hemoprotein leghemoglobin, jehož strukturální gen je součástí genomu hostitele. Enzym nitrogenasa má dvě složky: azoferredoxin se 4 atomy Fe a 4 sulfidovými skupinami na molekulu bílkoviny ($M_r = 6 \cdot 10^4$) a molybdoferredoxin (tetramer $\alpha_2\beta_2$; $M_{ra} = 5,1 \cdot 10^4$, $M_{r\beta} = 6 \cdot 10^4$), obsahující 2 atomy Mo, 24 atomů Fe a 24 sulfidových iontů na molekulu⁶. Bylo zjištěno, že v bakteroidu probíhá redukce dusíku na amoniak a v cytosolu buňky se tvoří kyselina asparagová, asparagin a glutamin, které se potom uplatňují v metabolismu dusíku.

3.1.2. Příjem nitrátů

Příjem nitrátů kořeny rostlin a jejich následná redukce a asimilace představují hlavní způsob, jímž je anorganický dusík přeměňován na organický. V celém procesu využití dusíku se jeví jako limitující redukce nitrátů enzymem nitrátreduktasou⁷, která je regulovaná především množstvím přijatého nitrátu. Nitrát je do buněk transportován aktivním transportním systémem a po vstupu do rostliny je NO₃⁻ redukován buď ihned v kořenech, nebo až v listech⁸. Nitrát vstupující do cytosolu může být: redukován na amonný iont, dočasně převeden do vakuoly⁹, symplastem transportován do xylému nebo pasivně unikne z kořenů zpět do substrátu. Redukce NO₃⁻ probíhá ve dvou stupních. Nejprve je nitrátreduktasou (EC 1.6.6.1) redukován

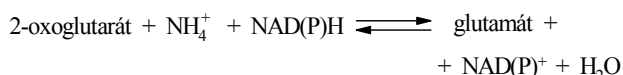
NO₃⁻ za vzniku NO₂⁻, který je pak enzymem nitritreduktasou (EC 1.7.7.1) dále redukován na NH₃:



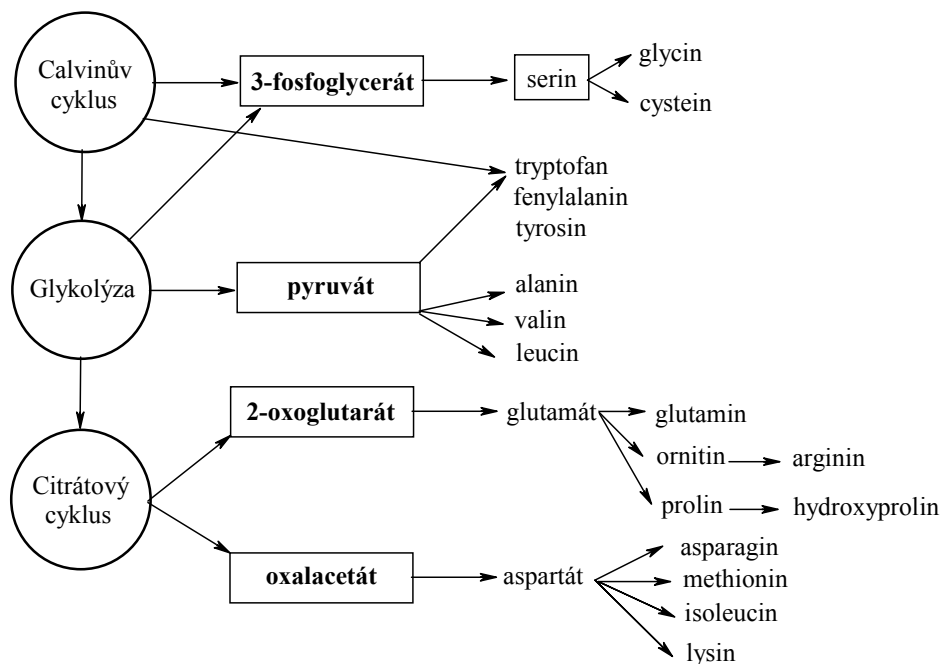
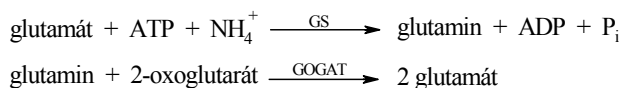
Nitrátreduktasa je lokalizována v cytosolu, kde je patrně asociována s vnější membránou plastidů, a využívá elektrony především z NADH. Její aktivita je řízena zejména samotnými nitráty a také světlem¹⁰. O regulaci nitrátreduktasy existuje velké množství prací, např.^{11,12}. Nitrity jsou pro buňky škodlivé, a proto jsou okamžitě redukovány nitritreduktasou lokalizovanou ve stromatu plastidů (obr. 1).

3.1.3. Příjem amonného dusíku

Zabudování amoniaku do aminokyselin probíhá dvěma způsoby. Při vyšších koncentracích NH₃ je funkční enzym glutamátdehydrogenasa (EC 1.4.1.2), který katalyzuje reakci 2-oxoglutarátu:



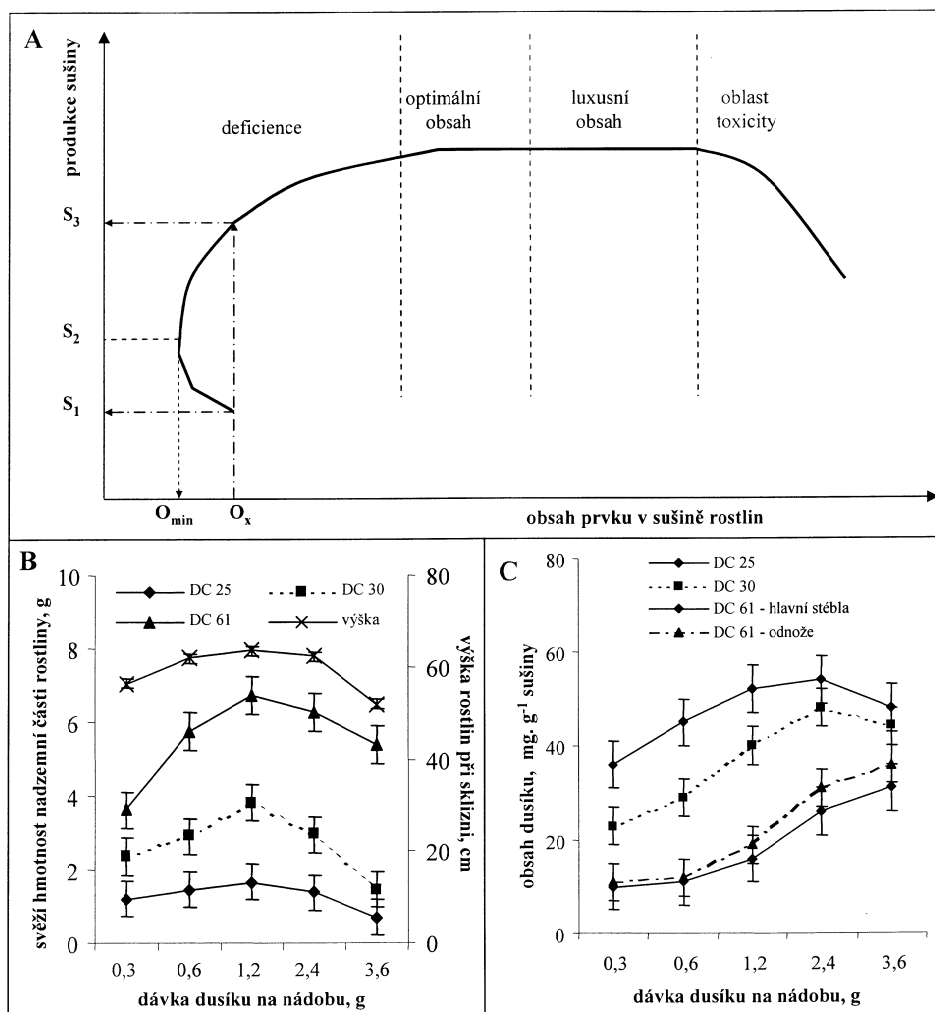
Účinnější se však jeví enzymový systém GS/GOGAT (GS = glutaminsyntetasa (EC 6.3.1.2), GOGAT = glutamát-synthasa (EC 1.4.1.13), který realizuje následující sled reakcí:



Obr. 2. Biosyntéza aminokyselin z rozličných intermediátů Calvinova cyklu, glykolýzy a citrátového cyklu

Glutaminsynthetasa je oblastí styku metabolismu uhlíku a dusíku v chloroplastech a podílí se také na zabudování amoniaku do kyseliny 2-oxoglutarové i v peroxizomech a mitochondriích^{13,14}. Klíčovou úlohu při syntéze aminokyselin má glutamát, který v rostlině představuje pool α -aminodusíku. Skupina aminotransferas se význač-

nou měrou podílí na vzájemných přeměnách aminokyselin^{15,16} a na mnohých syntetických pochodech, např. na syntéze sekundárních metabolitů. Uhlíkaté skelety pro různé aminokyseliny jsou odvozeny převážně z intermediátů fotosyntézy, glykolýzy a citrátového cyklu (obr. 1 a 2). Rostliny jsou schopny přijímat dusík i ve formě NH_4^+



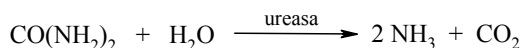
Obr. 3. (A) Schématické znázornění vztahu mezi obsahem živin v rostlině a tvorbou sušiny rostlin. Mají-li rostliny malou produkci sušiny (S_1), tak i nevelký příjem živin jim stačí pro dosažení obsahu živin O_x („akumulační efekt“). Pokud je dobře vyvážený příjem dostatečného množství živin a jejich inkorporace během období rychlého růstu, tak dochází ke značnému zvětšení produkce sušiny (z S_1 na S_3), a to bez potřeby nápadného zvýšení obsahu živin v rostlinném pletivu. Jestliže je příjem živin během období rychlého růstu pomalejší než přírůstek sušiny (z S_1 na S_3), pak obsah živin v rostlině úměrně klesá z O_x na O_{min} („zředovací efekt“). Přijímají-li rostliny dále živiny („luxusní výživa“), potom se produkce rostlin již nezvyšuje, a při značném nadbytku živin v rostlinách dochází k depresivnímu až toxickému účinku. (B) Vliv stupňovaných dávek dusíku v DAM – 390 před setím na růst rostlin ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L., cv. Zenit) během vegetace při jeho kultivaci v Mitscherlichových nádobách (20 rostlin v nádobě) s 6 kg zeminy (71 mg kg^{-1} fosforu, 143 mg kg^{-1} draslíku a 55 mg kg^{-1} hořčíku; postup stanovení viz.⁴⁵). Sedm dnů před setím ječmene bylo provedeno hnojení závlukou roztoky těchto minerálních hnojiv: superfosfát (8,3 % P ve formě $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$; Agrofert) a DAM-390 (vodný roztok 42,2 % dusičnanu amonného a 32,7 % močoviny; Duslo Šala). I. odběr rostlin byl v době odnožování (po 32 dnech kultivace) – DC 25, cit.³⁰; II. odběr v době sloupkování (po 42 dnech) – DC 30; III. odběr v době kvetení (po 70 dnech) – DC 61 a plně zralosti (po 100 dnech) – DC 91. Celkový dusík byl stanoven destilační metodou, fosfor spektrofotometricky, vápník a hořčík metodou atomové absorpční spektrofotometrie, draslík a sodík atomovou emisí spektrofotometrií⁴⁶. (C) Obsah celkového dusíku v nadzemních částech rostlin ječmene

a některých aminokyselin za účasti celé skupiny enzymů^{16,17}. Podle novějších poznatků může být na lokalitách s nízkým obsahem živin nebo s vysokým obsahem organických látek přijímán dusík v organických formách¹⁸. Na těchto stanovištích vylučují kořeny rostlin zvýšené množství polyfenolů, které urychlují rozklad bílkovin na aminokyseliny. Ty jsou spolu s fenoly přijímány rostlinami a následně začleněny do metabolismu^{14,19}.

3.1.4. Příjem dusíku z močoviny

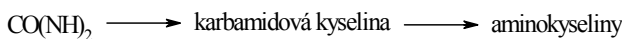
V přirozených půdních podmínkách je příjem celých molekul močoviny kořeny rostlin málo pravděpodobný vzhledem k jejímu rychlému enzymovému rozkladu^{2,20}. Pomocí mikrobiálního enzymu ureasy (EC 3.5.1.5.) se močovina hydrolyticky štěpí, vzniká uhlíčitán amonný, který se snadno rozkládá a uvolňuje se amoniak²¹.

Reakce probíhá podle rovnice:



Amonný dusík vzniklý rozkladem močoviny je buď přímo zdrojem dusíku pro rostliny nebo za vhodných podmínek je oxidován nitrifikačními bakteriemi až na dusičnany a ty jsou rostlinami přijímány. Je dokázáno, že rostliny mohou přijímat i celé nerozložené molekuly močoviny a využít je buď přímo zabudováním do organických látek nebo až po enzymovém rozkladu. Asimilace močoviny je aktivní metabolický proces, který je pro rostliny zdrojem nejen dusíku, ale i uhlíku. Potvrdily to práce se značenou močovinou např. u obilnin^{22,23}.

Začlenění močoviny do metabolismu rostlin může probíhat podle následujícího schématu:



Ze zemědělských plodin mají poměrně vysokou ureasovou aktivitu rostliny bobovité a naopak k rostlinám s nízkou ureasovou aktivitou patří obilniny. Ureasová aktivita byla zjištěna v semenech, nadzemních částech i kořenech rostlin. Při vysoké koncentraci močoviny v živném prostředí rostlin s vyšší ureasovou aktivitou může vznikat v jejich pletivech nadměrné množství volného amoniaku, který nejsou rostliny schopny detoxikovat zabudováním do organických sloučenin. O amoniaku je známo, že vyskytuje-li se v rostlinných buňkách ve větším množství než je jejich metabolická potřeba, působí jako prudký rostlinný jed²⁴. Vlastnosti močoviny umožňují její využití i pro mimokořenové přihnojování zemědělských plodin. Bylo zjištěno, že dusík z močoviny přijímají všechny nadzemní orgány rostlin^{25–28}.

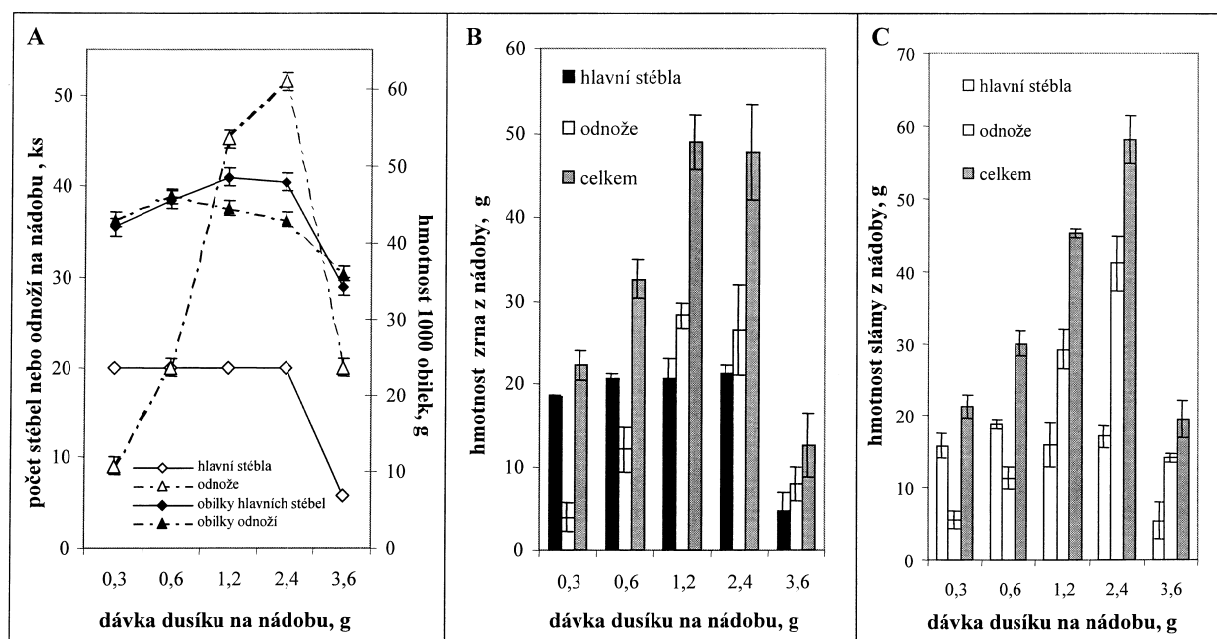
3.2. Vliv dusíku z kapalného hnojiva DAM-390 na ječmen jarní

Podle množství minerálního prvku v sušině byly popsány čtyři kategorie jeho vlivu na růst a vývoj rostliny: deficit, optimum, nadbytek a toxicita²⁹ (obr. 3A). Deficit prvku může být akutní (na rostlině se objevují viditelné

symptomy deficiencie, např. žloutnutí listů a růstová deprese) a latentní (viditelné symptomy se neprojevují, ale aplikace nedostatkového prvku zvýší produkci biomasy). Při optimálním a luxusním příjmu minerálního prvku nejsou pozorovatelné symptomy deficiencie a produkce biomasy se nemění (obr. 3A). Toxický obsah prvku se projevuje vznikem viditelných symptomů (nekrózy, změna obsahu rostlinných pigmentů, opad listů) a výrazně se snižuje produkce biomasy (Obr. 3A). Výše popsany mechanismus je ukázán na našem experimentálním modelu ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L., cv. Zenit) při aplikaci rozdílné dávky dusíku (N1 = 0,3; N2 = 0,6; N3 = 1,20; N4 = 2,40 a N5 = 3,6 g dusíku na nádobu; dusík byl aplikován ve formě kapalného hnojiva DAM-390 (vodný roztok 42,2 % dusičnanu amonného a 32,7 % močoviny). Rozdíly v růstu ječmene vlivem stupňovaných dávek dusíku byly pozorovány již ve fázi odnožování rostlin (DC 25, cit.³⁰) a sloupkování rostlin (DC 30) (obr. 3B). Hmotnost nadzemních částí rostlin byla u variant N2, N3 a N4 vyšší při porovnání s variantou N1 (0,3 g N na nádobu). Nejvyšší dávka dusíku použitá u varianty N5 (3,6 g N na nádobu) byla v oblasti toxicity. Hmotnost nadzemních částí rostlin ve fázi DC 25 nebo DC 30 byla snížena o více jak 40 nebo 35 % a výška rostlin byla snížena o 8 % ve srovnání s variantou N1 (obr. 3B). Získaný experimentální výsledek plně kopíruje průběh křivky ukázané na obr. 3A. Obsah prvků stanovený v sušině rostlin s dobou kultivace výrazně klesal, jak je dobře patrné z výsledků analýz obsahu dusíku v rostlinách odebraných v růstových fázích DC 30 a v období kvetení (DC 61) (obr. 3C). Zjistili jsme, že vyšší obsahy dusíku byly v odnožích a nižší v hlavních stéblech rostlin. Přestože se obsah dusíku v sušině nadzemní části rostliny během vegetace snižoval, jeho odběr nadzemní části se naopak zvyšoval. V období DC 25 byl odběr dusíku nadzemní části jedné rostliny 9,6 mg, v období DC 30 15,1 mg a DC 61 25,5 mg. Pozorovaná změna obsahu dusíku souvisí s velmi výrazným nárůstem biomasy rostlin (svěží i suché hmotnosti). Aplikovaný dusík ovlivnil také výnos ječmene. Je známo, že výnos obilnin tvoří tyto prvky: počet klasů na plošnou jednotku (počet rostlin a plodných stébel), počet zrn v klasu (počet klásků a plodných kvítků) a hmotnost obilek. Nejdříve se významně zvyšoval výnos až do aplikované dávky dusíku 1,2 g N na nádobu. Při vyšší dávce dusíku došlo k pozvolnému poklesu hmotnosti 1000 obilek ječmene (obr. 4A, B). V případě varianty s nejvyšší dávkou N (3,6 g na nádobu) výnos obilek naopak velmi výrazně poklesl v porovnání s variantou N1 (obr. 4B, C). U rostlin z varianty N3 a N4 byl výnos zrna (hmotnost zrn získaných ze sklizených rostlin) z odnoží vyšší než z hlavních stébel a podílel se na celkovém výnosu zrna 58 % respektive 55 %. Pouze nejvyšší dávka N5 způsobila pokles výnosu zrna i slámy (obr. 4B, C).

4. Regulace a transport

Rychlost příjmu minerálních živin rostlinami je regulována jejich obsahem v rostlinách mechanismem zpětné vazby^{31,32}. Rychlost příjmu příslušného minerálního prvku



Obr. 4. Vliv aplikace stupňovaných dávek dusíku v DAM-390 před setím (A) na počet stébel, odnoží a hmotnost 1000 obilky (B) hmotnost zrna z jedné nádoby a (C) slámy; ostatní podrobnosti jsou popsány na obr. 3

se zvyšuje při poklesu jeho obsahu v rostlině a naopak. Na této kontrole se významnou měrou podílejí i nadzemní orgány rostliny. Je-li v nadzemní části rostliny zvýšená koncentrace některého minerálního prvku, dochází k jeho transportu do vodivých elementů floému. Floémem je minerální prvek transportován do kořenů rostliny. Minerální prvek může být transportován ve formě sloučenin s organickými kyselinami nebo sirnými látkami. Sirné sloučeniny jsou známy svou schopností především vázat těžké kovy v rostlinách^{33–39}. Vytvořené komplexy jsou transportovány do vakuoly, nebo na místa, kde je jejich toxicita výrazně omezena⁴⁰. V kořenech se zvyšuje obsah minerálního prvku a jsou pravděpodobně aktivovány další ochranné mechanismy, které následně omezují příjem minerálního prvku z vnějšího prostředí. Přitom nejsou dostatečně známy procesy, které regulují transport z xylému do buněk mezofylu, ani procesy zabezpečující vstup iontů do floému v listech³². Rostliny využívají celou skupinu signálních molekul a transportérů, jako je např. kyselina salicylová a nebo oxid dusnatý⁴¹. Lze předpokládat, že změny v koncentraci minerálního prvku výrazně ovlivní tyto signální molekuly a selektivní buněčné transportéry³².

Dusík v cévním systému rostlin je přemísťovaný zejména ve formě aminokyselin a dusičnanů. Mladé listy musí být zásobeny aminokyselinami až do dosažení úplné zralosti⁴². Intenzita metabolismu dusíku a zejména rychlost biosyntézy bílkovin rozhoduje o směru přemísťování dusíkatých sloučenin do různých částí rostlin. Při nedostatku dusíku v rostlině nastává proteolýza ve starších částech rostliny a dusík je z nich transportovaný do mladších listů a na tvorbu semen⁴³. Proteolýza způsobuje zmenšení chlo-

roplastů a snižování obsahu chlorofylu. Proto prvním příznakem nedostatku dusíku je žloutnutí starých listů. Při silném nedostatku dusíku list odumře a někdy i opadne⁴⁴. Kromě vizuálních příznaků se dá nedostatek dusíku objektivněji a hlavně dříve zjistit chemickým rozбором rostlin.

Práce na této publikaci byla financována z Národního výzkumného centra LN00A081, grantu 525/04/P132 od GA ČR a IGA MZLU 3/2004.

LITERATURA

1. Noctor G., Foyer C. H.: *J. Exp. Bot.*, 49, 1895 (1998).
2. Marschner H.: *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London 1995.
3. Boldt R., Zrenner R.: *Physiol. Plant.* 117, 297 (2003).
4. Orsel M., Filleur S., Fraissier V., Daniel-Vedele F.: *J. Exp. Bot.* 53, 825 (2002).
5. Justes E., Jeuffroy M. H., Mary B.: *Diagnosis of the Nitrogen Status in Crops*. 73 (1997).
6. Schulze J.: *J. Plant. Nutr. Soil. Sc.* 162, 125 (2004).
7. Glass A. D. M., Britto D. T., Kaiser B. N., Kinghorn J. R., Kromzucker H. J., Kumar A., Okamoto O., Rawat S., Siddiqi M. Y., Unkles S. E., Vidmar J. J.: *J. Exp. Bot.* 53, 855 (2002).
8. Gastal F., Lemaire G.: *J. Exp. Bot.* 53, 789 (2002).
9. van der Leij M., Smith S. J., Miller A. J.: *Planta* 205, 64 (1998).
10. Kaiser W. M., Weiner H., Huber S. C.: *Physiol. Plant.* 105, 385 (1999).

11. Sahulka J.: Studie ČSAV 10, 5 (1980).
12. Yaneva I. A., Hoffmann G. W., Tischner R.: *Physiol. Plant.* 114, 65 (2002).
13. Lancien M., Gadal P., Hodges M.: *Plant Physiol.* 123, 817 (2000).
14. van den Heuvel R. H. H., Curti B., Vanoni M. A., Mattevi A.: *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 669 (2004).
15. Wadsworth G. J.: *Physiol. Plant.* 100, 998 (1997).
16. Marková M., Králová B.: *Chem. Listy* 98, 102 (2004).
17. Lohaus G., Büker M., Hußmann M., Soave C., Heldt H.-W.: *Planta* 205, 181 (1998).
18. Northup R. R., Yu Z. S., Dahlgren R. A., Vogt K. A.: *Nature* 377, 227 (1995).
19. Dixon R. A., Steele C. L.: *Trends Plant Sci.* 4, 394 (1999).
20. Zehnálek J., Minář J., Honza J.: *Rostl. Výr.* 36, 797 (1990).
21. Shelp B. J., Sieciechowicz K., Ireland R. J., Joy K. W.: *Can. J. Bot.* 63, 1135 (1985).
22. Zehnálek J., Procházka S.: *Rostl. Výr.* 32, 403 (1986).
23. Kronzucker H. J., Siddiqi M. Y., Glass A. D. M., Kirk G. J. D.: *Plant Physiol.* 119, 1041 (1999).
24. Liu L.-H., Ludewig U., Gassert B., Frommer W. B., von Wirén N.: *Plant Physiol.* 133, 1220 (2003).
25. Minář J., Zehnálek J.: *Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Purk. Brun.* 17, 187 (1987).
26. Zehnálek J., Minář J.: *Scripta Fac. Sci. Nat. Brun.* 17, 203 (1987).
27. Zehnálek J., Minář J., Vicherková M.: *Rostl. Výr.* 33, 653 (1987).
28. Zehnálek J., Minář J., Vicherková M.: *Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Purk. Brun.* 18, 343 (1988).
29. Larcher W.: *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, New York 1995.
30. Zadoks J. C., Chang T. T., Konzak C. F.: *Weed Research* 14, 415 (1974).
31. Sumner L. W., Mendes P., Dixon R. A.: *Phytochemistry* 62, 817 (2003).
32. Loque D., von Wieren N.: *J. Exp. Bot.* 55, 1293 (2004).
33. Petrlová J., Mikelová R., Stejskal K., Kleckerová A., Zítka O., Petrek J., Havel L., Zehnálek J., Adam V., Trnková L., Kizek R.: *J. Sep. Sci.* 29, 1166 (2006).
34. Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Havel L.: *Chem. Listy* 98, 166 (2004).
35. Trnková L., Kizek R., Vacek J.: *Bioelectrochemistry* 56, 57 (2002).
36. Zehnálek J., Adam V., Kizek R.: *Listy Cukrov.* 120, 222 (2004).
37. Zehnálek J., Vacek J., Kizek R.: *Listy Cukrov.* 120, 220 (2004).
38. Vacek J., Petrek J., Kizek R., Havel L., Klejdus B., Trnková L., Jelen F.: *Bioelectrochemistry* 63, 347 (2004).
39. Klejdus B., Zehnálek J., Adam V., Petřek J., Kizek R., Vacek J., Trnková L., Rozik R., Havel L., Kubáň V.: *Anal. Chim. Acta* 520, 117 (2004).
40. Kizek R., Vacek J., Trnková L., Klejdus B., Kubáň V.: *Chem. Listy* 97, 1003 (2003).
41. Shah J.: *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6, 365 (2003).
42. Noctor G., Novitskaya L., Lea P. J., Foyer C. H.: *J. Exp. Bot.* 53, 939 (2002).
43. Hörtensteiner S., Feller U.: *J. Exp. Bot.* 53, 927 (2002).
44. Wang C., Van den Ende W., Tillberg J.-E.: *Planta* 211, 701 (2000).
45. Mehlich A.: *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 1978, 477.
46. Walinga I., van Vark W., Houba V. G. J., van der Lee J. J.: *Plant Analysis Procedures*, Wageningen Agricultural University, Wageningen 1989.

J. Zehnálek, V. Adam, R. Kizek (*Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Assimilation of Nitrate, Ammonium and Amide Nitrogen by Agricultural Crops**

Nitrogen, carbon, oxygen and hydrogen are basic elements in organisms, forming an essential part of living matter. The main source of nitrogen for plants are ammonium and nitrate ions contained in soil. According to the amount of an individual mineral nutrient in plant dry matter, four categories of its influence on plant growth and evolution are described: deficiency, optimum, luxury and toxicity. In this work the influence of different doses of nitrogen (0.3–3.6 g per cultivation pot) on growth of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) is studied. In addition, different ways of assimilation of atmospheric, nitrate and amide nitrogen are described. Attention is also paid to possible regulation of transport and nitrogen amount in plants.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

ZÁVISLOST VÝNOSU A KVALITY SEMENE LUPINY ÚZKOLISTÉ (*Lupinus angustifolius*, L.) NA HNOJENÍ SLOUČENINAMI DUSÍKU

TOMÁŠ LOŠÁK

Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
losak@mendelu.cz

Došlo 30.1.06, přijato 16.3.06.

Klíčová slova: lupina, dusík, hnojení, termín, dávka, výnos, semeno, bílkoviny

Úvod

Lupina úzkolistá (*Lupinus angustifolius*, L.) se botanicky řadí mezi luskoviny (leguminózy), což jsou zástupci čeledi bobovitých. Rostliny z této čeledi se odlišují od ostatních rostlin tím, že jsou schopny si opatřit převážnou část dusíku prostřednictvím symbiózy s hlízkovými bakteriemi žijícími na jejich kořenech¹. Symbiotická fixace dusíku využívá energii získanou fotosyntézou u rostlin k přeměně N_2 na NH_3 . Centrální význam má enzym nitrogenasa sestávající ze dvou bílkovinných komplexů – Fe a Mo (cit.²). Redukce N_2 probíhá velmi rychle a předpokládá se, že má 3 stupně: diimid, hydrazin, amoniak³ (obr. 1). Na využití symbiotického efektu je možné inokulovat osivo příslušným druhem rhizóbií, a to zvláště na půdách, na kterých se delší čas luskoviny nepěstovaly⁴.

V běžných podmínkách spotřebují luskoviny pouze 5–10 % veškerého dusíku z půdy, a to během tzv. hladového období, které trvá do 25 dnů na počátku vegetace, než se na kořenech vytvoří hlízky. Pro překonání tohoto období je nezbytné hnojení minerálními hnojivy. Nejlepší doba k aplikaci dusíku je před výsevem, při vzházení, popř. při plném zapojení porostu⁵. Hnojení dusíkatými hnojivy lze doporučit především na méně úrodných půdách a tam, kde nebyly zajištěny dobré podmínky pro rostliny a fixaci vzdušného dusíku¹.

Kromě dusíku se na tvorbě výnosu lupiny a jeho kvalitě podílí i ostatní makrobiogenní prvky, a to především fosfor, draslík⁶ a hořčík⁷. Z mikrobiogenních prvků jsou významnými především zinek⁸, železo a molybden³. Výborné osvojování živin z půdy i z méně přijatelných forem souvisí u lupiny především s mohutnějším kořeno-

vým systémem včetně kořenové sekrece, a tím i s vyšší rozpouštěcí schopností⁵.

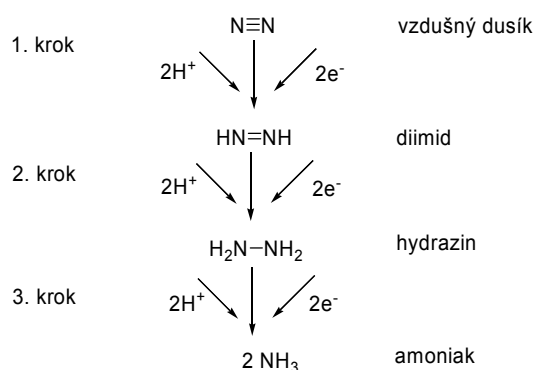
Účelem založení vegetačního nádobového pokusu s neinokulovaným osivem lupiny úzkolisté bylo posouzení vlivu suplementace sloučenin dusíku při různých termínech jeho aplikace a dávkách na změny úrovně výnosotvorných prvků, výnos semene a obsah hrubých bílkovin v semeni.

Experimentální část

Vegetační pokus

Vegetační nádobový pokus s úzkolistou lupinou odrůdy Sonet byl založen na jaře 2005 ve vegetační hale Ústavu agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. Do Mitscherlichových vegetačních nádob bylo naváženo 6 kg středně těžké zeminy charakterizované jako fluvizem s agrochemickými vlastnostmi uvedenými v tabulce I. Zemina vykazovala alkalickou půdní reakci (pH), obsah přístupného fosforu byl vysoký, draslík, hořčík a vápník byly na úrovni dobré a síra vyhovující zásoby. Obsah kadmia a zinku v půdě byl hluboce pod přípustnou normou.

Pokus zahrnoval 4 varianty, přičemž každá z nich byla 4x opakována. 10. května 2005 byla provedena předseťová aplikace dusíku u hnojených variant 2–4 a vyseto po 6 semenech lupiny do každé nádoby do hloubky 3–4 cm. Postupně vzházení započalo za 7 až 10 dnů a 25. května po vzejití všech rostlin ve fázi 2. páru pravých listů následovala druhá aplikace dusíku u variant 3–4. V této fázi růstu vykazovaly rostliny u všech variant vyrovnanou výšku 6–7 cm. V době květu (27. června) byl u všech variant proveden odběr rostlin k chemickým analýzám



Obr. 1. Proces redukce vzdušného dusíku na amoniak u bobovitých rostlin

Tabulka I

Agrochemická charakteristika zeminy před založením pokusu (mg kg^{-1})

pH/CaCl ₂	Obsah prvků [mg kg^{-1}]						
	P	K	Ca	Mg	S	Zn	Cd
7,47	138	226	2784	167	24,7	11,5	0,085

Tabulka II

Termín a dávkování dusíkatých sloučenin

Var. číslo	Schéma	Termín a dávka dusíku [g dusíku na nádobu]			Celková dávka dusíku [g na nádobu]
		před setím	po vzejití	květ	
1	N ₀	0	0	0	0
2	N ₁	0,5	0	0	0,5
3	N ₂	0,5	0,5	1	2
4	N ₃	0,5	0,5	2	3

rostlin na vybrané makrobiogenní prvky (N, P, K, Ca, Mg) a uskutečněna poslední aplikace N u variant 3–4. Během vegetace byla prováděna pravidelná závlhka demineralizovanou vodou na úroveň 60 % maximální kapilární kapacity, kypření a udržování bezplevelného stavu.

Sklizeň pokusu následovala v plné zralosti 2. srpna 2005. Současně byl zjišťován počet lusků na rostlinu, počet semen v lusk, výnos semene na rostlinu, hmotnost tisíce semen (HTS) a % bílkovin v semeni. Výnosové výsledky byly statisticky vyhodnoceny analýzou variance a testu LSD.

Analytické metody

Zemina byla pro stanovení přístupných živin (P, K, Ca, Mg) extrahována podle Mehlicha III (CH₃COOH, NH₄NO₃, NH₄F, HNO₃ a EDTA). Stanovení obsahu přístupného fosforu ve výluhu bylo provedeno kolorimetricky a obsah přístupného draslíku, hořčíku a vápníku byl stanoven atomovou absorpční spektrofotometrií. Stanovení síranové síry v půdě předcházela extrakce demineralizovanou vodou v poměru 1:5 podle ČSN ISO 11048 po dobu 16 h na rotační třepačce. Vlastní měření bylo prováděno v akreditované laboratoři ÚKZÚZ Brno kapilární zonální elektroforézou (CZE) na přístroji CES-1 (Dionex Corp., USA) s křemennou kapilárou. Obsah Zn a Cd v půdě byl stanoven po extrakci ve 2 M-HNO₃ (poměr půda : vyluhovadlo 1 : 5) metodou atomové absorpční spektrofotometrie. Aktivita vodíkových iontů se zjišťovala ve výluhu půdy 0,01 M-CaCl₂ potenciometricky skleněnou elektrodou proti referenční kalamelové elektrodě.

Stanovení N, P, K, Ca, Mg v rostlinném materiálu a N v semeni předcházela jeho mineralizace na mokré cestě. Proces spočívá v rozkladu rostlinné hmoty za použití koncentrované H₂SO₄ s postupným přidáváním H₂O₂. Použitím kyseliny neriskujeme ztráty na prvcích a odstraníme kvantitativně kyselinu křemičitou. Sraženinu kyseliny křemičité

eliminujeme z roztoku filtrací do 100–250 ml odměrné baňky. Doplněním filtrátu v baňce ke značce získáme zásobní roztok, z něhož zjišťujeme jednotlivé prvky. Dusík se stanovuje metodou podle Kjeldahla, fosfor kolorimetricky vanadičnanovou metodou, draslík metodou plamenné fotometrie a vápník s hořčíkem metodou atomové absorpční spektrofotometrie (AAS). Obsah hrubých bílkovin (dusíkatých látek) v semeni při sklizni byl zjištěn vynásobením procent dusíku faktorem 6,25.

Způsob a termín dávkování sloučenin dusíku

V pokusu byly studovány čtyři úrovně koncentrací N při třech termínech aplikace, jak uvádí tab. II. Dusík byl u hnojených variant vybilancován na danou úroveň ve formě NH₄NO₃. Jedná se o dusíkaté minerální hnojivo s obsahem 34,5 % N ve dvou formách, které rostliny dobře využívají a s ohledem na jeho působení se jeví jako univerzální hnojivo.

Dusičnan amonný vykazuje i nižší ekvivalent kyselosti (–33 kg CaO na 100 kg hnojiva) než močovina či síran amonný. Výhodný je zejména na přihnojení během vegetace. Hnojivo bylo u jednotlivých variant aplikováno do nádob formou závlhky.

Výsledky a diskuse

Výnosové výsledky jsou prezentovány v tabulce III. Je zřejmé, že počet lusků na rostlinu byl u všech hnojených variant (varianty 2–4) statisticky vysoce průkazně ($\alpha = 0,01$) vyšší v porovnání s nehnojenou kontrolní variantou (varianta 1). Počet lusků narůstal s dávkou dusíku o 29,1–45,4 % (tab. III), přičemž nejvyšších počtů 7,7–8 lusků na 1 rostlinu bylo dosaženo u variant 2 a 3, mezi

Tabulka III
Výnosové výsledky pokusu

Var. č.	Schéma	Dávka N [g/nádoba]	Počet lusků		Počet semen		HTS		Výnos semene	
			[ks/rost.]	[%]	[ks/lusk]	[%]	[g]	[%]	[g/rost.]	[%]
1	N ₀	0	5,5 ^a	100	4,2 ^a	100	85,4 ^a	100	1,98 ^a	100
2	N ₁	0,5	8,0 ^b	145,4	6,7 ^b	159,5	111,8 ^b	130,9	5,96 ^b	301,0
3	N ₂	2	7,7 ^b	140,0	7,5 ^c	178,6	133,2 ^c	155,9	7,65 ^c	386,3
4	N ₃	3	7,1 ^c	129,1	7,2 ^c	171,4	109,4 ^b	128,1	5,61 ^b	283,3

^{a, b, c} Varianty označené různými písmeny se od sebe statisticky průkazně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,01$

nimiž ovšem již nebylo statistických diferencí. Podle El-Far a spol.⁹ (2001) se dělená aplikace hnojiv do dvou dávek rovněž pozitivně odrazilo jak na nárůstu počtu lusků na rostlinu, tak i na počtu větví. Soheir¹⁰ taktéž uvádí, že zvýšením dávky dusíku ze 30 na 45 kg N ha⁻¹ nastala stimulace počtu lusků lupiny.

Počet semen v lusků kolísal mezi 4,2–7,5 a rovněž se zvyšoval s dávkou dusíku o 59,5–78,6 %, přičemž mezi dvěma nejvyššími celkovými dávkami dusíku (2 a 3 g N na nádobu u variant 3 a 4) nebyly statisticky signifikantní rozdíly. Nejvyšší počet semen nebyl spojen s nejvyšší hladinou dusíku. Ke shodným výsledkům při stejném pokusném schématu v nádobovém experimentu dospěl i Rubenschuh¹¹.

Hmotnost tisíce semen (HTS) se pohybovala v rozmezí 85,4–133,2 g a narůstala s dávkou dusíku až na hladinu 2 g N na nádobu (varianta 3). Dusík se podílel na zvýšení HTS o 28,1–55,9 %, přičemž mezi variantou 2 a 4 nebyly zaznamenány statistické rozdíly (tab. III). Wiatrak a spol.¹² uvádí, že HTS u lupiny byla 1 kg N zvýšena o 0,07 g. El-Far a spol.⁹ popisuje v polním pokusu nejvyšší hodnotu HTS při děleném hnojení ve dvou dávkách.

Celkový výnos semene na rostlinu se odvíjí od utváření výnosotvorných prvků. Úroveň výnosu je nejvýrazněji ovlivněna počtem lusků a semen na rostlinu, méně hmotností tisíce semen¹³. Výnos semene se zvyšoval s dávkou dusíku z 1,98 g na rostlinu (varianta 1) na 7,65 g na rostli-

nu (varianta 3), přičemž mezi variantami 2 a 4 nebylo statistických diferencí (tab. III). Při dělené aplikaci dusíku ve třech termínech (před setím, po vzejití, květ) bylo u varianty 3 dosaženo nejvyššího výnosu ze všech variant a výnosové zvýšení oproti nehnojené kontrolní variantě dosahovalo 286,3 %. Schulze a spol.¹⁴ uvádí zřetelný nárůst výnosu semene lupiny po aplikaci dusíku ve fázi kvetení. Taktéž El-Far a spol.⁹ popisuje zvýšení výnosu semene lupiny při dělené dvojí aplikaci živin během vegetace. Předsetová aplikace 75 kg N ha⁻¹ ve formě (NH₄)₂SO₄ snížila výnos semene v porovnání s aplikací NH₄NO₃ a Ca(NO₃)₂ (cit.)¹⁵. Samotná aplikace dusíku bez inokulace osiva, stejně jako inokulované osivo bez suplementace minerální formy dusíku a kombinace obou těchto variant, se projevila ve všech případech signifikantním nárůstem výnosu semene v porovnání s kontrolou¹⁶.

Chemické analýzy rostlin ve fázi květu a obsah bílkovin v semeni při sklizni uvádí tabulka IV. Z výsledků analýz je zřejmé, že koncentrace dusíku v rostlinném materiálu ve fázi květu byla nejnižší u nehnojené kontrolní varianty (1,64 % N) a u všech ostatních hnojených variant se pohybovala v rozpětí 3,00–3,26 % N, bez výraznějšího vlivu dávky dusíku či termínu jeho aplikace. Obsah N v rostlinách se zvýšil s jeho dávkou v hnojivu³. Obsah fosforu kolísal v rozpětí 0,20–0,30 % P a blížil se hodnotě 0,21 %, ke které klesá jeho obsah v průběhu vegetace¹⁷.

V semeni lupiny je obsaženo 37–50 % hrubých

Tabulka IV
Chemické rozborů rostlin ve fázi kvetení a semene při sklizni

Var. č.	Schéma	Dávka N [g/nádoba]	Obsah v sušině rostliny ve fázi květu [%]					Obsah hrubých bílkovin v semeni [%]
			N	P	K	Ca	Mg	
1	N ₀	0	1,64	0,30	1,88	2,29	0,44	20,75 ^a
2	N ₁	0,5	3,26	0,21	2,16	2,49	0,37	26,00 ^b
3	N ₂	2	3,00	0,22	1,96	2,08	0,33	37,31 ^c
4	N ₃	3	3,12	0,20	1,65	2,45	0,34	42,18 ^d

^{a, b, c, d} Varianty označené různými písmeny se od sebe statisticky průkazně liší na hladině významnosti $\alpha = 0,01$

bílkovin¹⁸. S dávkou dusíku se jejich obsah statisticky výsoce průkazně zvyšoval z 20,75 % na 42,18 %, a tím významně narůstala nutriční hodnota semene. Při shodném pokusném schématu uvádí Rubenschuh¹¹ nárůst obsahu bílkovin na 45,1–47,3 %. Aplikací hnojiv s dusíkem ve formě NH_4NO_3 a $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ došlo k signifikantnímu zvýšení obsahu bílkovin oproti variantám dusíkem nehnojeným či hnojeným ve formě amonné¹⁹. Obsah bílkovin v polních experimentech mohou ovlivnit klimatické podmínky²⁰.

Závěr

Ve vegetačním nádobovém pokusu s neinokulovaným osivem lupiny úzkolisté byl prokázán pozitivní vliv dělené aplikace dusíku během vegetace ve formě NH_4NO_3 na zvýšení počtu lusků na rostlině a semen v luscích, hmotnost tisíce semen, a tím i výnos semene na rostlinu. Obsah hrubých bílkovin v semeni při sklizni lineárně narůstal s dávkou dusíku až na 42,18 %, a tím se zvyšovala i nutriční kvalita semene.

LITERATURA

1. Vaněk V., Balík J., Pavlíková D., Tlustoš P., v knize: *Výživa a hnojení polních a zahradních plodin*. Zemědělec, Praha 2002.
2. Mengel K., Kirkby E. A., v knize: *Principles of Plant Nutrition*. Int. Potash Institute, Bern 1978.
3. Marschner H., v knize: *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press Limited, London 1995.
4. Fecenko J., Ložek O., v knize: *Výživa a hnojení polních plodin*. SPU, Nitra 2000.
5. Hlušek J., Richter R., Ryant P., v knize: *Výživa a hnojení zahradních plodin*. Zemědělec, Praha 2002.
6. Gremigni P., Hamblin J., Harris D., Cowling W. A.: *Plant Soil* 253, 413 (2003).
7. Brennan R. F., Longnecker N. E.: *Aust. J. Exp. Agr.* 41, 1199 (2001).
8. Pastor J., Hernandez A. J., Prieto N., Fernandez-Pascual M.: *J. Plant Physiol.* 160, 1457 (2002).
9. El-Far I. A., Ghallab A., El-Nagar G. R.: *Assiut J. Agr. Scienc.* 32, 1 (2001).
10. Soheir A. M.: *Ann. Agricultural Sci. Cairo* 47, 225 (2002).
11. Rubenschuh U.: *Dissertation*. Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen 1997.
12. Wiatrak P. J., Wright D. L., Marois J. J.: *Agron. J.* 96, 1765 (2004).
13. Hondelmann W.: *Theor. Appl. Genet.* 68, 1 (1984).
14. Schulze J., Beschow H., Merbach W.: *Proceedings of the 9th International Lupin Conference*, str. 246. Klink/Muritz 1999.
15. Barlog P.: *Aust. J. Agr. Res.* 53, 671 (2002).
16. HobAllah A. A., Kandil A. A.: *Arab Universities J. Agr. Scienc.* 9, 639 (2001).
17. Bolland M. D. A., Brennan R. F.: *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 36, 1177 (2005).
18. Schöneberger H., Gross R., Cremer H. D., Elmadfa I.: *J. Nutr.* 112, 70 (1982).
19. Barlog P., Grzebisz W.: *Electron. J. Polish Agricultural Universities* 3, 2 (2000).
20. Podsiado C., Kotlarz A.: *Inzynieria Rolnicza* 5, 370 (2001).

T. Lošák (*Department of Agrochemistry, Soil Science, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, Czech Republic*): **Fertilisation of Narrow-Leaf Lupine with Nitrogen Compounds and its Effect on Yields and Quality of Seeds**

In a vegetation pot experiment with non-inoculated seed stock of narrow-leaf lupine (*Lupinus angustifolius*, L.), we investigated the effect of NH_4NO_3 applied at different times and in various doses on changes in the level of yield-forming elements, seed yields and the content of crude protein in seeds. The experiment included four application procedures and control treatment with no nitrogen fertiliser. In the other treatments we applied nitrogen either in a single dose before sowing or in three split doses. In the latter case nitrogen was applied before sowing, after emergence and during flowering. The treatments resulted in a significant increase in the number of pods per plant (40 %), number of seeds in pods (78.6 %), the 1000-seed weight (55.9 %) and, therefore, higher seed yields per plant (286.3 %) compared with the control treatment. With increasing nitrogen doses, its content in plants during flowering increased to 3.00–3.26 %. The content of crude proteins in seeds during harvest increased linearly from 20.75 % to 42.18 %, thus increasing their nutritional quality.

SUPLEMENTÁCIA OZIMNEJ PŠENICE SELÉNOM

LADISLAV DUCSAY^a, OTTO LOŽEK^a,
LADISLAV VARGA^a a TOMÁŠ LOŠÁK^b

^aKatedra agrochémie a výživy rastlín, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 976 01 Nitra, ^bÚstav agrochémie, pôdoznanstvá, mikrobiológia a výživy rastlín, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
ladislav.ducsay@uniag.sk, losak@mendelu.cz

Došlo 29.9.05, prepracované 13.2.06, prijaté 16.3.06.

Kľúčové slová: selén, ozimná pšenica, zrno

Úvod

Selén patrí do skupiny mikroelementov, ktoré sú potrebné vo veľmi malých množstvách pre zvieratá a ľudí na správne fungovanie základných životných funkcií. Selén sa môže vyskytovať vo forme anorganických aj organických zlúčenín. V anorganických zlúčeninách sa vyskytuje v oxidačných stupňoch –II, 0, + IV a +VI, pričom prevládajúce oxidačné stupne sú +IV (SeO_3^{2-}) a +VI (SeO_4^{2-}). V organických zlúčeninách je prevládajúcim oxidačným stupňom –II. Môže ísť o metylované formy alebo aminokyseliny, v ktorých selén nahrádza síru (selenocystein, selenometionín a selenometylselenometionín)¹.

Koncentrácia selénu v rastlinách a zvieratách je v silnej korelácii s jeho koncentráciou v pôdach. Koncentrácia selénu v poľnohospodárskych produktoch je v mnohých oblastiach sveta veľmi nízka. Medzi takéto oblasti patrí aj prevažná časť strednej a severnej Európy, kde priemerný celkový obsah selénu sa väčšinou pohybuje v rozpätí od 0,12 mg kg⁻¹ do 0,3 mg kg⁻¹ pôdy^{2,3}. Vo väčšine pôd Slovenska sa obsah selénu pohybuje od 0,2 do 0,33 mg kg⁻¹ pôdy⁴.

Podľa štatistických údajov priemerný príjem u obyvateľov Slovenska sa pohybuje na úrovni 0,038 mg Se na deň, ktorý je nižší ako odporúčaný príjem 0,050–0,200 mg Se na deň⁵. Preto je opodstatnená snaha o zaistenie vyššej koncentrácie selénu na začiatku potravinového reťazca. Môže sa to uskutočňovať napr. zabudovaním selénu do hnojív⁶, aplikáciou selénových zlúčenín do pôdy⁷, alebo využitím foliárnej aplikácie na list^{8,9}. Na stanovenie nízkych koncentrácií selénu vo vzorkách rastlinného a živočíšneho pôvodu sa v súčasnosti využíva najmä metóda HGAAS (cit.¹⁰).

Cieľom práce bolo overiť možnosť zvýšenia obsahu

selénu v zrne ozimnej pšenice vplyvom foliárnej aplikácie (na list) selénových zlúčenín vo fáze odnožovania ozimnej pšenice.

Experimentálna časť

Polné pokusy

Maloparcelové polné pokusy sme zakladali v prvej dekáde októbra v rokoch 1998 až 2000 na Šľachtiteľskej stanici Sládkovičovo-Nový Dvůr (17°34'40" východnej dĺžky a 48°22'20" západnej šírky) s odrodou (Blava) pšenice letnej formy ozimnej (*Triticum aestivum L.*). Agrochemická charakteristika pôdy pred založením pokusov je uvedená v tabuľke I.

Analytické metódy

Pôda

Pôda bola extrahovaná podľa Mehlicha II (0,2 mol l⁻¹ CH₃COOH, 0,015 mol l⁻¹ NH₄F, 0,2 mol l⁻¹ NH₄Cl a 0,012 mol l⁻¹ HCl). Stanovenie obsahu prístupného fosforu vo výluhu bolo uskutočnené kolorimetricky a draslíka plameňometricky. Obsah selénu v pôdach bol stanovený metódou HGAAS z extrakčného roztoku, ktorý bol pripravený rozkladom pôdy zmesou kyselín: HF + HNO₃ + HCl (cit.¹¹).

Zrno

Po zbere bolo zrno homogenizované na laboratórnom šrotovníku a ďalej analyzované. Na analytických váhach sa presne navážilo 0,25 g suchého homogénneho materiálu do spaľovacej misky. Pridalo sa 8 ml roztoku Mg(NO₃)₂ · 6 H₂O; c = 500 g l⁻¹ a zahrievalo sa pri teplote 300 °C do vysušenia dusičnanu. Potom sa vzorky spaľovali v muflovej peci pri teplote 490 ± 20 °C po dobu 3 až 4 h (pokiaľ sa organické látky úplne nerozložia). Po vychladnutí sa popol zvlhčil 2 ml destilovanej vody, pridal sa 14 ml konc. HCl (35 %) a pod hodinovým sklom sa digerovalo minimálne 3 h. Potom sa mineralizát kvantita-

Tabuľka I

Výsledky chemickej analýzy pôd pred založením pokusov v rokoch 1998 až 2000 (stanovené metódou Mehlich II)

Parameter	Hodnota		
	1998	1999	2000
pH/KCl, jednotky pH	7,26	6,73	7,07
Fosfor, mg kg ⁻¹	81,0	94,0	124,0
Draslík, mg kg ⁻¹	210,0	224,0	268,0
Selén ^a , mg kg ⁻¹	0,27	0,25	0,29

^a Celkový obsah, rozklad pôdy HF + HNO₃ + HCl

tívne preniesol do 25 ml odmernej banky a doplnil sa po značku destilovanou vodou. Obsah selénu sa stanovoval atómovým absorpčným spektrometrom Varian SpectrAA 300 s pomocou kontinuálneho hydridového generátora VGA 76. Podmienky merania boli nasledovné: vlnová dĺžka – 196 nm, šírka štrbiny – 1,0 nm; kompenzácia pozadia – deutériová lampka. Atomizačným prostredím bola kremenná trubica vyhrievaná na 900 °C. Redukčným činidlom bol NaBH₄ (0,6% roztok v 0,5% NaOH). Bol použitý základný štandardný roztok selénu (Merck) o koncentrácii 1 g l⁻¹. Výsledky boli štatisticky zhodnocované analýzou variancie pomocou testu LSD.

Forma dávkovania zlúčenín selénu na list

V maloparcelovom pokuse sme sledovali akumuláciu selénu zrnou ozimnej pšenice vplyvom aplikovania stupňovaných dávok selénu na list. Použili sme päť variantov pokusu: variant 1 – kontrola, variant 2 – 0,5 g Se ha⁻¹, variant 3 – 1 g Se ha⁻¹, variant 4 – 10 g Se ha⁻¹, variant 5 – 20 g Se ha⁻¹. Foliárnu aplikáciu stúpajúcich dávok selénu sme uskutočnili vo fáze na konci odnožovania (kód decimálnej Zadoksovej stupnice = 29, cit.¹²). Použili sme roztok seleničitanu sodného (Na₂SeO₃ · 5 H₂O).

Výsledky a diskusia

Prístupný obsah zlúčenín selénu v pôde

Limitné hodnoty obsahu selénu (v mg kg⁻¹ suchej hmoty, rozklad lúčavkou kráľovskou) v pôdach Slovenska sú zahrnuté v zákone č. 220/2004 Z.z. Do roku 2004 sa limitné hodnoty celkového obsahu selénu v pôdach (rozklad zeminy zmesou HF + HNO₃ + HCl) posudzovali podľa Vestníka MP SR z roku 1994, kde je uvádzaný limitný obsah celkového selénu 0,8 mg kg⁻¹. Z uvedeného je možné konštatovať, že pokusné stanovište nebolo selénom zaťažené.

Tabulka II

Priemerné obsahy selénu v zrne ozimnej pšenice (mg Se kg⁻¹) vplyvom foliárne aplikovaných stupňovaných dávok zlúčenín selénu

Variant	Obsah selénu v zrne ozimnej pšenice [mg Se kg ⁻¹]			Trojročný priemer
	1999	2000	2001	
1	0,044	0,049	0,024	0,039 ^a
2	0,064	0,065	0,013	0,047 ^a
3	0,078	0,095	0,013	0,062 ^a
4	0,100	0,105	0,077	0,094 ^b
5	0,117	0,151	0,307	0,192 ^c

^{a,b,c} Varianty označené rovnakými písmenami sa od seba štatisticky preukazne neodlišujú na hladine významnosti $\alpha = 0,05$

Zistený obsah zlúčenín selénu v zrne testovanej pšenice a jeho porovnanie s údajmi iných autorov

Obsah je uvedený v tabuľke II. Priemerný obsah selénu bez jeho aplikácie na list dosahoval hodnotu 0,039 mg na kg sušiny zrna pšenice. Zrno ozimnej pšenice v hlavných obilninárskych regiónoch Veľkej Británie obsahovalo priemerne 0,028 mg Se kg⁻¹ sušiny v sedemnásťročnej perióde sledovania¹³. Priemerný obsah selénu v zrne pšenice v Srbsku sa pohybuje na úrovni 0,027 mg kg⁻¹ sušiny¹⁴.

Aplikovaná dávka selénu (0,5 a 1 g Se ha⁻¹) nespôsobila jeho štatisticky preukazné zvýšenie obsahu v zrne a pohybovala sa na úrovni 0,047 a 0,062 mg Se kg⁻¹. Foliárna aplikácia 10 resp. 20 g Se ha⁻¹ zvýšila štatisticky preukazne obsah Se v zrne pšenice na 0,094 resp. 0,192 mg kg⁻¹ v porovnaní s variantom bez aplikovaného Se. Vplyvom foliárnej aplikácie seleničitanu sodného v dávke 6 resp. 12 g Se ha⁻¹ došlo k nárastu obsahu selénu v zrne ozimnej pšenice na hodnoty v rozpätí od 0,042 do 0,067 mg kg⁻¹ resp. od 0,065 do 0,180 mg kg⁻¹ sušiny¹⁵, čo je v zhode aj s našimi výsledkami. Vo Fínsku vplyvom suplementácie selénu do hnojív používaných na hnojenie poľných plodín sa zvýšil priemerný obsah selénu v zrne ozimnej pšenice na hodnotu 0,174 mg kg⁻¹ sušiny¹⁶.

Prístupnosť selénu rastlinám závisí od oxidačného stupňa selénu. Selénan (Se +VI) je 10 až 20 krát lepšie prístupný než seleničitan (Se +IV). Vplyvom foliárnej aplikácie selénu v dávke 10 resp. 20 g Se vo forme selénanu sodného, akumulácia selénu bola na úrovni 0,512 resp. 1,130 mg kg⁻¹ zrna jačmeňa¹⁷.

Záver

Z trojročných výsledkov maloparcelových poľných pokusov so stupňovanými dávkami selénu aplikovaných foliárne na list pšenice vyplynulo, že došlo k zvyšovaniu obsahu selénu v závislosti s jeho aplikovanou dávkou. V daných podmienkach je dávka 10 g Se ha⁻¹ vo forme

seleničitanu dostačujúca pre zaistenie potrebného obsahu selénu v zrne ozimnej pšenice, ktorá sa môže využiť na zlepšenie suplementácie potravinového reťazca človeka na jeho začiatku.

Práca bola riešená v rámci grantového projektu VEGA č. 1/6076/99.

LITERATÚRA

1. Farkašová I., Žemberyová M.: Chem. Listy 93, 633 (1999).
2. Ylaeranta T.: Ann. Agriculturae Fenniae 22, 122 (1983).
3. Stadlober M., Sager M., Irgolic K. J.: Food Chem. 73, 357 (2001).
4. Linkeš V., Kobza J., Švec M., Ilka P., Pavlemda P., Barančíková G., Matúšková L., v knihe: *Monitoring pôd Slovenskej republiky*. VÚPÚ, Bratislava (1997).
5. Maďarič A., Kadrábová J.: Farmaceutický Obzor 66, 259 (1997).
6. Aro A., Alfthan G., Varo P.: Analyst 120, 841 (1995).
7. Hlušek J., Jůzl M., Čepl J., Lošák T.: Chem. Listy 99, 515 (2005).
8. Ducsay L., Ložek O.: Plant, Soil Environ. 52, 78 (2006).
9. Milovac M., Djermanovic V., Djujic I.: J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 17, 312 (1998).
10. Hegedüs O., Hegedüsová A., Gašparík J., Ivičičová A.: Chem. Listy 99, 518 (2005).
11. Matúšková L., v knihe: *Závazné metódy rozborov pôd* (Fiala K., ed.) kap. 2. VÚPOP, Bratislava 1999.
12. Chang T. T., Konzak C. F., Zadoks J. C.: Weed Res. 14, 415 (1974).
13. Adams M. L., Lombi E., Zhao F. J., McGrath S. P.: J. Sci. Food Agric. 82, 1160 (2002).
14. Mihailovic M., Lindberg P., Jovanovic I.: Acta Veterinaria (Yugoslavia) 46, 343 (1996).
15. Milovac M., Djermanovic V., Djujic I.: J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 17, 312 (1998).
16. Aro A., Alfthan G., Varo P.: Analyst 120, 841 (1995).
17. MacLeod J. A., Gupta U. C., Milburn P., Sanderson J. B.: Can. J. Soil Sci. 78, 685 (1998).

L. Ducsay^a, O. Ložek^a, L. Varga^a, and T. Lošák^b
^a Department of Agrochemistry and Plant Nutrition, University of Agriculture, Nitra, Slovak Republic, ^b Department of Agrochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, Czech Republic): **Effects of Winter Wheat Supplementation with Selenium**

Effect of foliar application of Se doses (0.5-20 g per hectare) on Se accumulation in winter wheat grain was investigated in field fertilization experiments. Se fertilization (as Na₂SeO₃·5H₂O solution) was realized at the growth stage of the 6th leaf. Se fertilization did not influence the yields of grain. Both the doses 10 and 20 g Se per hectare significantly increased Se accumulation in grain. The average Se content in dry matter of grain was 0.039 mg per kg without Se treatment; at the Se doses 10 and 20 g per hectare it increased to 0.094 and 0.192 mg per kg, respectively. Hence the dose 10 g Se per hectare is sufficient for reaching the required Se content in winter wheat grain.

VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA OBSAH POLYFENOLŮ A ANTI- OXIDAČNÍ AKTIVITU HLÍZ BRAMBOR

JAROMÍR LACHMAN^a, KAREL HAMOUZ^b,
JAROSLAV ČEPL^c, VLADIMÍR PIVEC^a,
MILOSLAV ŠULC^a a PETR DVOŘÁK^b

^a Katedra chemie, ^b Katedra rostlinné výroby, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 Suchdol, ^c Výzkumný ústav bramborářský, Dobrovského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod
lachman@af.czu.cz

Došlo 17.1.06, přijato 23.3.06.

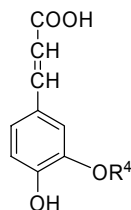
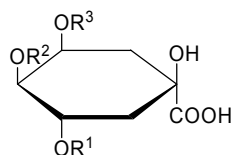
Klíčová slova: hlízy brambor, polyfenoly, antioxidační aktivita, žluté a fialové odrůdy, stanoviště, hnojení

Úvod

V poslední době se v bramborových hlízách intenzivně studují látky, které mohou mít v lidské výživě významné postavení i přes nižší obsah¹. Významnou skupinu látek, která je v poslední době v bramborách intenzivně zkoumána, jsou látky s antioxidačními účinky^{2–6}. Jednu z nejrozšířenějších skupin antioxidantů představují fenolové látky, z nichž v bramborách je nejvíce zastoupena chlorogenová kyselina a její isomery^{3,4,7} a kávová kyselina

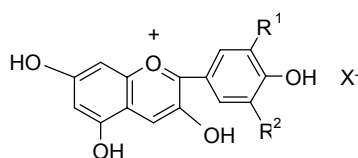
Tabulka I
Hlavní fenolové kyseliny v hlízách brambor

Triviální název	Systematický název
Ferulová kyselina	4-hydroxy-3-methoxyfenylprop-3-enová kyselina
Chlorogenová kyselina	3 <i>O</i> -(3,4-dihydroxycinnamoyl)chinová kyselina, tj. 3-[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,4,5-trihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina
Isochlorogenová kyselina <i>a</i>	3 <i>O</i> ,4 <i>O</i> -bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)chinová kyselina, tj. 3,4-bis[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,5-dihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina
Isochlorogenová kyselina <i>b</i>	3 <i>O</i> ,5 <i>O</i> -bis(3,4-dihydroxycinnamoyl)chinová kyselina, tj. 3,5-bis[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,4-dihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina
Kávová kyselina	3,4-dihydroxyfenylprop-3-enová kyselina
Kryptochlorogenová kyselina	4 <i>O</i> -(3,4-dihydroxycinnamoyl)chinová kyselina, tj. 4-[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,3,5-trihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina
Neochlorogenová kyselina	5 <i>O</i> -(3,4-dihydroxycinnamoyl)chinová kyselina, tj. 5-[(3,4-dihydroxycinnamoyl)oxy]-1,4,5-trihydroxycyklohexan-1-karboxylová kyselina



Látka	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Chlorogenová kyselina		H	H	
Isochlorogenová kyselina <i>a</i>			H	
Isochlorogenová kyselina <i>b</i>		H		
Kryptochlorogenová kyselina	H		H	
Neochlorogenová kyselina	H	H		
Kávová kyselina				H
Ferulová kyselina				CH ₃

Obr. 1. Struktura fenolkarboxylových kyselin v hlízách brambor



Obr. 2. Aglykony anthokyanů brambor

Látka	R ¹	R ²
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

(tab. I, obr. 1). V současné době jsou prováděny šlechtitelské pokusy s cílem zvýšit antioxidační aktivitu brambor navýšením obsahu fenolových látek a karotenoidů jako hlavních složek přispívajících k jejich antioxidační aktivitě⁸ nebo zvýšením obsahu selenu navýšením jeho obsahu ve výživě brambor⁹. Flavonoidy a u barevných odrůd také anthokyaniny (obr. 2), jsou zastoupeny hlavně v buněčných vakuolách peridermu, zvláště ve tkáních hlíz transgenických brambor¹⁰. Anthokyaniny jsou přítomny buď jako neacylované glykosidy nebo glykosidy acylované převážně *p*-kumarovou kyselinou¹¹. Byla nalezena pozitivní korelace¹² mezi antioxidační aktivitou a obsahem celkových polyfenolů a anthokyaninů se závěrem, že především tyto látky hrají podstatnou roli v antioxidační kapacitě brambor. Ačkoliv obsah těchto látek ve slupkách brambor je 0,9–1,6 násobek obsahu v dužnině hlíz, příspěvek slupky k celkovému obsahu fenolových látek a anthokyaninů činil pouze 20 %. Obsah chlorogenové kyseliny hraje významnou roli v antioxidačním potenciálu hlíz¹³, což však nebylo potvrzeno pro volnou aminokyselinu L-tyrosin. K celkové antioxidační aktivitě přispívají i karotenoidy obsažené v dužnině bramborových hlíz v rozsahu 0,5–1 mg v kg čerstvé hmoty u bíle zbarvených odrůd a dosahujících hodnot až 20 mg v kilogramu čerstvé hmoty u brambor se žlutě až oranžově zbarvenou dužninou¹⁴. Brambory s červeně zbarvenou dužninou obsahují anthokyaniny¹⁵ v závislosti na tom, zda mají dužninu hlíz zbarvenou pouze částečně nebo úplně. Tyto odrůdy obsahují 69–350 mg anthokyaninů na 1 kg čerstvé hmoty a u fialově zbarvených odrůd brambor bývá jejich obsah 55–171 mg kg⁻¹ čerstvé hmoty¹⁶.

Jak bylo zjištěno, mohou být některé specie rodu *Solanum* vhodným zdrojem genů pro akumulaci antioxidantů

brambor, jejich obsah je však také ve značné míře ovlivněn agrotechnickými postupy pěstování a environmentálními faktory. Vztah mezi antioxidační kapacitou bramborových hlíz a obsahem flavonoidů je složitý¹⁷ a i když chlorogenová kyselina je hlavním antioxidantem hlíz brambor^{18,19}, objevují se stále další účinné fenolové antioxidanty, např. alkylferuláty obsažené v lipofilní frakci²⁰. Celkový obsah polyfenolových látek a anthokyaninů je rozdílný v různých stádiích zralosti hlíz^{21,22}, je ovlivněn různými environmentálními podmínkami, např. delšími dny a nižšími teplotami²³ nebo způsobem a dávkami hnojení^{24,25}.

Vzhledem k uvedeným skutečnostem bylo hlavním cílem této studie stanovit rozdíly v obsahu celkových polyfenolů a v antioxidační aktivitě mezi odrůdami s bíle až žlutě zbarvenou dužninou a fialově zbarvenými odrůdami a určit vliv klimatických podmínek stanoviště a hnojení, se zvláštním důrazem na draslík, na tyto dva vybrané kvalitativní parametry hlíz brambor.

Experimentální část

Polní pokusy

V přesných polních pokusech na čtyřech lokalitách v České republice s rozdílnou nadmořskou výškou byly vypěstovány jednotným způsobem podle zásad běžné agrotechniky čtyři odrůdy brambor (Impala, Karin, Ditta, Saturna), na stanovišti Suchdol navíc dvě odrůdy s fialovou barvou dužniny Valří a Violette. Základní charakteristika jednotlivých stanovišť z hlediska nadmořské výšky, klimatických podmínek, půdních podmínek a zásoby živin v půdě je uvedena v tab. II. Předplodinou v pokusech byla ozimá pšenice, na podzim byl zaoran

Tabulka II

Charakteristika pokusných stanovišť

Stanoviště	Nadmoř. výška [m]	Prům. roč. teplota [°C]	Roční srážky [mm]	Půdní typ a druh	Zásoba živin v půdě [mg kg ⁻¹]		
					P	K	Mg
Přerov n. Labem	178	8,8	622	HM-ph,h	134	201	73
Praha-Suchdol	286	8,2	510	HM-h	175	245	210
Lípa	505	7,7	632	HPg-ph	93	154	94
Stachy	860	6,3	755	HPp-hp	248	124	134
Valečov	460	6,9	649	HPg-ph,h	171	203	161

Půdní typy: HM – hnědozem typická, HPg – kambizem kyselá pseudoglejová (hnědá půda oglejená), HPp – kryptopodzol (hnědá půda podzolová); Půdní druhy: ph – písčitolinitá, hp – hlinitopísčítá, h – hlinitá

chlévkový hnůj v dávce 30 t ha⁻¹ společně s P a K hnojivem v dávkách podle zásoby živin v půdě. Na jaře byla na uvláčený pozemek rozmetána dusíkatá hnojiva, a to 2/3 z celkové dávky 120 kg N ha⁻¹ a zbytek dávky byl aplikován po vzejití porostu. Pozemek byl prokypřen do hloubky 15–18 cm a vytvořeny brázdy. Vlastní pokusy byly založeny ve čtyřech opakováních ve sponu 75 × 30 cm, velikost parcely 300 cm (4 řádky) × 720 cm. Před vzejitím trsů byl aplikován preemergentní herbicid Afalon 45 SC (linuron 450 g) v dávce 1,5 l ha⁻¹. Před zapojením porostu bylo provedeno nahrnutí zeminy na hrůbky. Během vegetace bylo jedenkrát provedeno ošetření insekticidem proti mandelince bramborové a 5–7 ošetření fungicidy proti plísni bramborové podle potřeby na jednotlivých stanovištích.

Druhý pokus byl založen na stanovišti Valečov (tab. II), kde byl sledován vliv různé úrovně hnojení živinami N, P, K, Mg na obsah celkových polyfenolů. Pokus byl realizován se dvěma odrůdami Ditta a Karin, agrotechnika byla shodná jako u prvního pokusu. Varianty hnojení byly následující: varianta 1: bez hnojení průmyslovými hnojivem; varianta 2: N 100 kg ha⁻¹, P₂O₅ 100 kg ha⁻¹, K₂O 130 kg ha⁻¹, MgO 50 kg ha⁻¹; varianta 3: N 100 kg ha⁻¹, P₂O₅ 100 kg ha⁻¹, K₂O 200 kg ha⁻¹, MgO 100 kg ha⁻¹; varianta 4: N 180 kg ha⁻¹, P₂O₅ 100 kg ha⁻¹, K₂O 130 kg ha⁻¹, MgO 50 kg ha⁻¹.

Po sklizni ve fyziologické zralosti byly z jednotlivých opakování každého pokusu odebrány vzorky hlíz k laboratorním rozborům, které byly provedeny na Katedře chemie České zemědělské univerzity v Praze. Pro stanovení obsahu polyfenolů byly vzorky hned po sklizni zmrazeny a poté mrazově sublimovány.

Analytické metody

Mrazová sublimace

Hlízy brambor byly lyofilizovány na lyofilizátoru Lyovac GT 2 (Leybold-Heraeus, Německo) a po vysušení a stabilizaci v exsikatoru byly rozemlety na prášek v laboratorním mlýnku a poté extrahovány 80% vodným roztokem ethanolu po 24 h (15 min v ultrazvukové lázni a 1 h na třepačce). Navážka vzorků byla 10 g. Získané extrakty byly kvantitativně převedeny do 100 ml odměrných baněk a doplněny 80% vodným ethanolom po rysku, ke stanovení byly pipetovány 0,5 ml alikvotní podíly.

Stanovení celkových polyfenolů (CP) Folinovým-Ciocalteauovým činidlem

Ke stanovení byla použita modifikovaná metoda²⁶ s Folinovým-Ciocalteauovým činidlem. Vzorek (0,5 ml) byl pipetován do 50 ml odměrné baňky a zředěn destilovanou vodou. Poté bylo přidáno 2,5 ml Folinova-Ciocalteauova činidla (PENTA, Česká republika) a po promíchání 7,5 ml 20% roztoku karbonátu sodného. Po 2 hodinách stání při laboratorní teplotě byla změřena absorbance na spektrofotometru He λ ios γ (Spectronic Unicam, Velká Británie) při vlnové délce $\lambda=765$ nm proti slepému pokusu. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalen-

ty gallové kyseliny (v g kg⁻¹ sušiny, gallová kyselina Merck, Německo). Průměrné hodnoty byly získány ze tří paralelních stanovení.

Stanovení antioxidační antiradikálové aktivity (AAA) metodou s DPPH•

AAA byla měřena po reakci se stabilním volným radikálem 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylem (DPPH•)²⁷. Těsně před stanovením byl připraven čerstvý roztok DPPH (25 mg DPPH bylo rozpuštěno v 1 l methanolu, Sigma Aldrich). Fialový roztok DPPH• (3 ml) byl odpipetován do plastických kyvet o tloušťce 1 cm a byla změřena absorbance při vlnové délce $\lambda=515$ nm na spektrofotometru He λ ios γ (Spectronic Unicam, Velká Británie) (t_0). Poté bylo přidáno 5 μ l vzorku a po promíchání tyčinkou byla reakční směs ponechána stát 5 min. Po pětiminutovém stání při laboratorní teplotě byla opět změřena absorbance (t_5) a AAA byla vyjádřena z poklesu absorbance v % dle vztahu: % inaktivace = $100 - [(A_{t_5}/A_{t_0}) \times 100]$. Průměrné výsledky byly získány ze sedmi paralelních stanovení a vyjádřeny jako ekvivalenty askorbové kyseliny (mg kg⁻¹ sušiny, askorbová kyselina, Sigma, Německo). Hodnota R^2 pro askorbovou kyselinu byla 0,9991.

Statistické zhodnocení

Výsledky byly statisticky zpracovány metodou variantační analýzy – Tukeyho testem na hladině významnosti $P = 0,05$.

Výsledky a diskuse

Obsah celkových polyfenolů

Vliv stanoviště

Na čtyřech stanovištích, která se výrazně lišila nadmořskou výškou, klimatickými a půdními podmínkami, nebylo dosaženo statisticky průkazného rozdílu v obsahu celkových polyfenolů v hlízách. Byl však zjištěn zajímavý trend vyššího obsahu celkových polyfenolů na stanovišti Stachy (minimálně o 11,4 % vyšší obsah celkových polyfenolů proti ostatním stanovištím – tab. III). Stanoviště Stachy se od ostatních výrazně odlišuje nejvyšší nadmořskou výškou, nejnižší průměrnou roční teplotou, nejvyšším úhrnem srážek a nejnižší úrodností půdy (tab. II). Uvedený trend na stanovišti Stachy se potvrdil u všech čtyř pokusných odrůd. Rozdíly v obsahu CP mezi dalšími třemi stanovišti byly minimální. Naše výsledky ukazují, že drsnější klimatické podmínky v polohách s vyšší nadmořskou výškou způsobily mírné zvýšení obsahu celkových polyfenolových látek. Potvrdily se tak výsledky našich dřívějších pokusů, které prokázaly, že výše položená chladnější stanoviště s vyšším úhrnem srážek poskytují hlízy s vyšším obsahem celkových polyfenolů²⁸. O vlivu lokality není v literatuře dostatek prokazatelných poznatků a přikládá se větší význam jiným faktorům: vlivu odrůdy, vlivu ročníku a stresovým faktorům, jako jsou mechanické poškození hlíz, napadení patogeny a působení světla na hlízy⁶. Po-

Tabulka III

Vliv čtyř stanovišť na obsah celkových polyfenolů (g kg^{-1} sušiny)

Stanoviště	Odrůda	Celkové polyfenoly [g kg^{-1} sušiny]	Průměr stanoviště	% (Přerov n.L.=100 %)
Přerov n. L.	Impala	3,052	2,93	100,0
	Karin	3,261		
	Ditta	2,885		
	Saturna	2,523		
Suchdol	Impala	3,282	2,962	101,1
	Karin	3,441		
	Ditta	2,664		
	Saturna	2,461		
Lípa	Impala	3,232	2,904	99,1
	Karin	3,676		
	Ditta	2,461		
	Saturna	2,248		
Stachy	Impala	3,826	3,295	112,5
	Karin	3,589		
	Ditta	3,153		
	Saturna	2,612		

 $D_{\min 0,05} = 0,5034$ (stanoviště), $D_{\min 0,05} = 0,339$ (odrůda)

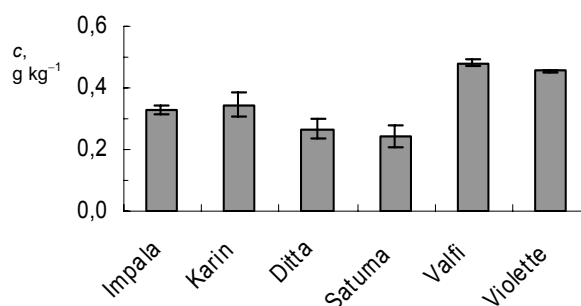
dobné výsledky byly získány i při pěstování brambor ve státě Colorado (delší dny a nižší teploty), které měly 1,4 až 2,5 krát vyšší obsah anthokyanů a celkových polyfenolů ve srovnání s bramborami vypěstovanými v Texasu²².

Vliv odrůdy

Odrůda měla ze sledovaných faktorů největší vliv na obsah CP v hlízách. Ze šesti pokusných odrůd byly čtyři odrůdy s tradiční žlutou barvou dužniny, dvě odrůdy měly barvu dužniny fialovou. Odrůdy s fialovou barvou dužniny dosáhly průkazně vyššího obsahu CP proti odrůdám se žlutou dužninou (obr. 3). Odrůdy s fialovou dužninou obsahovaly v průměru proti odrůdám se žlutou dužninou o 58,1 % více celkových polyfenolů. U odrůd se žlutou barvou dužniny dosáhly nejvyššího obsahu CP odrůdy Karin (3,44 g kg^{-1} sušiny) a Impala (3,28 g kg^{-1} sušiny), které se průkazně lišily od odrůd Ditta (2,66 g kg^{-1} sušiny) a Saturna (2,46 g kg^{-1} sušiny). Rozdíl v obsahu CP mezi odrůdami s fialovou dužninou (Valfi, Violette) nebyl průkazný. Naše výsledky jsou plně v souladu s dříve publikovanými poznatky o průkazném vlivu odrůdy na obsah celkových polyfenolů, chlorogenové kyseliny a anthokyanů^{6,28–30}, i když v některých pracích byl tento vliv označen jako slabší³¹. Vyšší obsah celkových polyfenolů u odrůd s fialovou barvou dužniny souvisí s vysokým podílem anthokyanů, které u odrůd s bílou nebo žlutě zbarvenou dužninou nejsou přítomny.

Vliv hnojení

Významným faktorem ovlivňujícím kvalitativní parametry brambor je způsob jejich pěstování a hnojení. Konvenční a ekologický způsob pěstování způsobuje rozdíly v obsahu nitrátů³² (nižší u ekologicky pěstovaných brambor bez použití průmyslových hnojiv) a askorbové a chlorogenové kyseliny^{28,33} (vyšší u ekologicky pěstovaných brambor). Použití NPK hnojiva v dávce 120 kg ha^{-1} zvyšuje obsah sušiny a současně snižuje obsah fenolových sloučenin³⁴, avšak v některých experimentech nebyl zjištěn žádný vliv dusíku³¹. Rozdíly v obsahu CP mezi čtyřmi pokusnými variantami hnojení se pohybovaly v rozmezí



Obr. 3. Vliv odrůdy na obsah celkových polyfenolů (g kg^{-1} sušiny) na stanovišti Praha-Suchdol; $D_{\min 0,05} = 0,599$

Tabulka IV

Vliv variant hnojení na obsah celkových polyfenolů (g kg^{-1} sušiny), stanoviště Valečov

Varianta hnojení ^a	Odrůda	Celkové polyfenoly [g kg^{-1} sušiny]	Průměr varianty hnojení	% (varianta 2=100 %)
1	Karin	3,598	3,158	96,5
	Ditta	2,717		
2	Karin	3,623	3,272	100,0
	Ditta	2,922		
3	Karin	3,137	2,947	90,1
	Ditta	2,756		
4	Karin	3,136	3,045	93,1
	Ditta	2,954		

 $D_{\min 0,05} = 0,649$ (varianta hnojení), $D_{\min 0,05} = 0,279$ (odrůda)

^a Pozn.: Var. 1 – N 0 kg ha^{-1} , P_2O_5 0 kg ha^{-1} , K_2O 0 kg ha^{-1} , MgO 0 kg ha^{-1} – bez hnojení průmyslovými hnojivými, Var. 2 – N 100 kg ha^{-1} , P_2O_5 100 kg ha^{-1} , K_2O 130 kg ha^{-1} , MgO 50 kg ha^{-1} , Var. 3 – N 100 kg ha^{-1} , P_2O_5 100 kg ha^{-1} , K_2O 200 kg ha^{-1} , MgO 100 kg ha^{-1} , Var. 4 – N 180 kg ha^{-1} , P_2O_5 100 kg ha^{-1} , K_2O 130 kg ha^{-1} , MgO 50 kg ha^{-1}

9,9 %, ale nebyly statisticky průkazné (tab. IV). Nejvyšší obsah CP byl zjištěn u varianty č. 2 s běžnými dávkami živin N, P, K a Mg. Nejvýraznější trend poklesu obsahu CP byl zjištěn u varianty č. 3 se zvýšenou dávkou K a Mg proti ostatním variantám. Tento výsledek koresponduje s poznatkem³⁵, podle nichž použití draselných hnojiv pozitivně ovlivnilo obsah fenolů a barevné změny dužniny. Někteří autoři⁶ řadí K hnojení mezi faktory, které obsah CP ovlivňují v menší míře, avšak potvrzují³⁶, že K snižuje obsah tyrosinu a chlorogenové kyseliny. Nižší obsah polyfenolů v bramborových hlízách pěstovaných za vyšších dávek draslíku může přispívat k nižšímu enzymovému hnědnutí, i když hlavním faktorem ovlivňujícím hnědnutí je především aktivita fenylamoniaklyasy³⁷. Vyšší dávky draslí-

ku snižují také obsah redukujících sacharidů³⁸ významných při barevných změnách tepelně zpracovaných brambor.

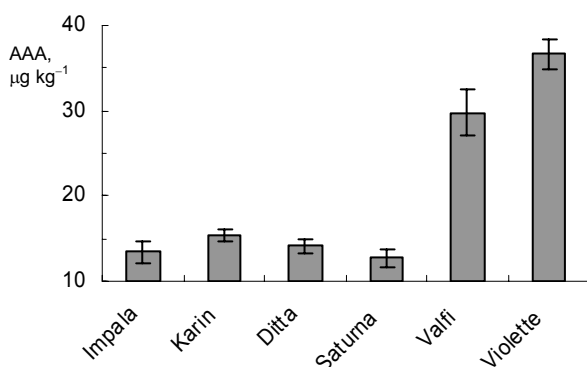
Antioxidační antiradikálová aktivita

Vliv odrůdy

Odrůdy s fialovou barvou dužniny Violette a Valfi vykázaly průkazně vyšší antioxidační aktivitu proti všem odrůdám se žlutou dužninou (obr. 4), což je v souladu s výsledky i dalších autorů¹². Nejvyšší AAA byla zjištěna u odrůdy Violette, u odrůdy Valfi byla o 18,6 % nižší a u odrůd se žlutou dužninou se pohyboval pokles AAA v rozmezí 65,0 až 57,9 %. Vyšší antioxidační antiradikálová aktivita u odrůd s fialově zbarvenou dužninou souvisí zřejmě s vyšším obsahem celkových polyfenolů ve srovnání s odrůdami se žlutě zbarvenou dužninou^{5,8,12}.

Závěr

Byly nalezeny významné rozdíly v obsahu celkových polyfenolů mezi odrůdami se žlutou dužninou Karin a Impala na jedné straně a odrůdami Ditta a Saturna na straně druhé. Významně vyšší obsah celkových polyfenolů je charakteristický pro odrůdy s fialově zbarvenou dužninou Valfi a Violette ve srovnání s odrůdami bíle a žlutě zbarvenými. Obsahu celkových polyfenolů odpovídá i antioxidační kapacita, která je nejvyšší u odrůd Violette a Valfi, zatímco u odrůd se žlutou barvou dužniny byla tato hodnota pouze v rozmezí $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{2}$ hodnoty odrůd s fialově zbarvenou dužninou. Drsnější klimatické podmínky stanoviště Stachy s vyšší nadmořskou výškou a vyšším úhrnem srážek měly za příčinu zřetelný trend k vyššímu obsahu celkových polyfenolových látek. Vyšší dávky draslíku resp. hořčiku v agrotechnických postupech naopak způsobily nižší akumulaci celkových polyfenolových látek.



Obr. 4. Vliv odrůdy na úroveň antioxidační aktivity ($\mu\text{g EAK kg}^{-1}$ sušiny) – stanoviště Praha-Suchdol; $D_{\min 0,05} = 3,489$; *EAK – ekvivalent askorbové kyseliny

Práce je řešena v rámci grantového projektu MZ ČR NAZV č. 1G46058 a Výzkumného záměru MŠMT č. 6046070901

LITERATURA

- Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 98, 373 (2004).
- Lachman J., Hamouz K., Orsák M., Pivec V.: Rostl. Vyr. 46, 231 (2000).
- Lachman J., Hamouz K., Orsák M.: Chem. Listy 99, 474 (2005).
- Lachman J., Hamouz K.: Plant Soil Environ. 51, 477 (2005).
- Brown C. R.: Am. J. Pot. Res. 82, 163 (2005).
- Friedman M.: J. Agric. Food Chem. 45, 1523 (1997).
- Niggeweg R., Michael A. J., Martin C.: Nature Biotechnol. 2, 746 (2004).
- Brown C. R., Culley D., Yang C. P., Durst R., Wrolstad R.: J. Am. Soc. Hortic. Sci. 130, 174 (2005).
- Hlušek J., Jůzl M., Čepl J., Lošák T.: Chem. Listy 99, 515 (2005).
- Kosieradzka I., Borucki W., Matysiak-Kata I., Szopa J., Sawosz E.: J. Anim. Feed Sci. 13, 87 (2004).
- Eichhorn S., Winterhalter P.: Food Res. Int. 38, 943 (2005).
- Reyes L. F., Miller J. C., Cisneros-Zevallos L.: Am. J. Pot. Res. 82, 271 (2005).
- Delgado E., Sulaiman M. I., Pawelzik E.: Pot. Res. 44, 207 (2001).
- Brown C. R.: Am. J. Pot. Res. 82, 163 (2005).
- Fossen T., Øvstedal D. O., Slimestad R., Andersen Ø. M.: Food Chem. 81, 433 (2003).
- Brown C. R., Wrolstad R., Durst R., Yang C. P., Clevidence B.: Am. J. Pot. Res. 80, 241 (2003).
- Lukaszewicz M., Matysiak-Kata I., Skala J., Fecka I., Cisowski W., Szopa J.: J. Agric. Food Chem. 52, 1526 (2004).
- Clifford M. N.: J. Sci. Food Agric. 79, 362 (1999).
- Percival G. C., Baird L.: J. Agric. Food Chem. 48, 2476 (2000).
- Yunoki K., Musa R., Kinoshita M., Tazaki H., Oda Y., Masao O.: Biosci., Biotechnol., Biochem. 68, 2619 (2004).
- Lewis C. E., Walker J. R. L., Lancaster J. E., Sutton K. H.: J. Sci. Food Agric. 79, 311 (1999).
- Laerke P. E., Christiansen J., Veierskov B.: Postharvest Biol. Technol. 26, 99 (2002).
- Reyes L. F., Miller J. C., Cisneros-Zevallos L.: Am. J. Pot. Res. 81, 187 (2004).
- Hajšlová J., Schulzová V., Slanina P., Janne K., Hellenas K. E., Andersson C.: Food Add. Contam. 22, 514 (2005).
- Kumar P., Pandey S. K., Singh S. V., Rawal S., Kumar D.: Ind. J. Agric. Sci. 74, 177 (2004).
- Lachman J., Hosnedl V., Pivec V., Orsák M.: Cereals for Human Health and Preventive Nutrition, Brno, 7–11 July 1998, Proc. Conf. (Vaculová K., Ehrenerbergová J., ed.), str. 118. Brno 1998.
- Molyneux P.: Songklanakarin J. Sci. Technol. 26, 211 (2004).
- Hamouz K., Lachman J., Vokál B., Pivec V.: Rostl. Vyr. 45, 293 (1999a).
- Pawelzik E., Delgado E., Poberezny J., Rogozińska I.: Abstr. 14th Triennial Conference of the EAPR, Sorrento, 2–7 May, 1999 (Assessorato Agricoltura Regione Campania ed.), str. 635. Sorrento 1999.
- Zgórska K., Frydecka-Mazurczyk A.: Biul. IHAR Jadwisin 213, 253 (2000).
- Lugasi A., Almeida D. P. F., Dworschak E.: Acta Alimentaria 28, 183 (1999).
- Hamouz K., Čepl J., Vokál B., Lachman J.: Rostl. Vyr. 45, 495 (1999b).
- Zarzecka K., Gugala M.: Plant Soil Environ. 49, 237 (2003).
- Mehta A., Singh S. P.: J. Food Sci. Technol. Mysore 41, 542 (2004).
- Kaldy M. S., Lynch D. R.: Am. Pot. J. 60, 375 (1983).
- Míča B., Vokál B.: Bramborářství 3, 3 (1995).
- Cantos E., Tudela J. A., Gil M. I., Espin J. C.: J. Agric. Food Chem. 50, 3015 (2002).
- Moinuddin U. S.: Commun. Soil Sci. Plant Anal. 35, 1047 (2004).

J. Lachman^a, K. Hamouz^b, J. Čepl^c, V. Pivec^a, M. Šulc^a, and P. Dvořák^b (^a Department of Chemistry, ^b Department of Plant Production, Czech University of Agriculture, Prague, Czech Republic, ^c Potato Research Institute, Havlíčkův Brod, Czech Republic): **The Effect of Selected Factors on Polyphenol Content and Antioxidant Activity in Potato Tubers**

The total polyphenol (TP) content in and antioxidant activity of potato tubers of four yellow-fleshed varieties and two purple-fleshed varieties from the 2004 harvest were assayed. The TP content was determined with the Folin-Ciocalteu reagent and antioxidant antiradical activity by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method. Significant differences in the TP content between the groups of yellow-fleshed varieties were found. Significant differences between yellow and purple-fleshed potatoes were also found in antioxidant activity both between yellow and purple-fleshed varieties and within purple-fleshed varieties. The higher potatoes-growing regions showed an apparent tendency to higher TP contents in analyzed varieties. In some varieties the effect of four variants of growing was assayed and a significant effect of high potassium doses (200 and 130 kg K₂O per hectare) on the decrease in TP was estimated.

STANOVENIE MALÓNDIALDEHYDU V BRAVČOVOM MÄSE S POUŽITÍM EXTRAKCIE NA TUHEJ FÁZE A HPLC

SLAVOMÍR MARCINČÁK, JOZEF SOKOL,
PETER TUREK, PETER POPELKA a JOZEF
NAGY

*Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
marcincak@centrum.sk*

Došlo 21.1.05, prepracované 18.7.05, prijaté 22.12.05.

Kľúčové slová: malóndialdehyd, oxidácia lipidov, 2,4-dinitrofenylhydrazín, HPLC

Úvod

Oxidácia tukov je autokatalytický proces prebiehajúci v potravinách a na biologických membránach buniek, ktorého výsledkom je výrazné zhoršenie kvality mäsa¹. Oxidačné žltnutie tukov začína krátko po zabití zvieratá, keď prívod krvi a metabolické procesy sú zastavené. Oxidácia tukov prebieha na dvoch rozličných častiach: triacylglyceroloch a fosfolipidoch. Povaha, podiel a stupeň nenasýtenosti mastných kyselín prítomných v tukoch alebo v potravinách indikujú citlivosť daných potravín k oxidácii^{2,3}. Všeobecne povedané, čím vyšší je podiel polyne nasýtených mastných kyselín (PNMK) v potravinách, tým viac je potravina citlivá na oxidačné procesy. Podľa obsahu PNMK sú jednotlivé mäsa náchylné na oxidáciu v tomto poradí: rybacie > hydínové > bravčové > hovädzie > jahňacie mäso⁴.

Reakciou kyslíka s PNMK vznikajú voľné radikály a hydroperoxydy mastných kyselín. Degradáciou hydroperoxidov vznikajú sekundárne produkty, ktorých prítomnosť vyvolá organoleptické zmeny s negatívnym dopadom na kvalitu mäsa a na jeho dĺžku skladovania. Z hľadiska konzumenta je však dôležité, že pri oxidácii tukov vznikajú látky, ktoré majú významné postavenie pri vzniku tzv. „civilizačných chorôb“. Výsledkom častej konzumácie oxidáciu poškodených tukov sú chronické formy rôznych chorôb, predovšetkým srdca a ciev (ateroskleróza, srdcová príhoda), poškodenia mozgu (Parkinsonova, Alzheimerova choroba), vznik rakoviny a tiež samotné starnutie buniek⁵.

Stanovenie tiobarbiturového (TBA) čísla je pre svoju jednoduchosť a rýchlosť stanovenia jednou z najfrekvencovanejších metód používaných na stanovenie oxidačných produktov v potravinách živočíšneho pôvodu. V súčasnosti je už známych veľa modifikácií stanovenia

TBA čísla, ktoré sa líšia úpravou vzorky, koncentráciou kyseliny, časom pôsobenia, výškou teploty, prítomnosťou alebo neprítomnosťou antioxidantov^{6–9}. Malóndialdehyd (MDA), hlavný produkt oxidácie PNMK, je najdôležitejšou TBA reakčnou zložkou⁸. TBA metóda je založená na spektrofotometrickej kvantifikácii ružového komplexu tvoreného reakciou MDA s dvomi molekulami kyseliny tiobarbiturovej. Komplex je detekovaný pri 530–538 nm. Reakcia kyseliny tiobarbiturovej za vzniku farebných komplexov však prebieha aj s inými zložkami ako MDA. Ide predovšetkým o ďalšie produkty oxidatívnej degradácie lipidov (alkenaly, alkendienaly, hydroxyalkenaly), sacharidy a ich pyrolytické produkty, bielkoviny, rastlinné pigmenty, koreniny a tiež katióny kovov. Tieto látky nadhodnocujú výsledok stanovenia a tým znižujú špecifickosť stanovenia TBA čísla¹⁰.

Z tohto dôvodu boli pre stanovenie voľného MDA vo vzorkách vyvinuté citlivejšie a špecifickejšie metódy HPLC, založené na derivatizácii s tiobarbiturovou kyselinou. Podľa Pilza a spol.¹¹ však MDA-TBA produkty sú tvorené aj z rôznych ďalších zložiek, v závislosti od reakčných podmienok. V takýchto podmienkach je využitie separácie na HPLC kolóne veľmi slabé. Fenaille a spol.¹² dodáva, že derivatizácia MDA s kyselinou tiobarbiturovou vyžaduje vyššie teploty (70 °C) a vysoké teploty zvyšujú tvorbu nadbytočného MDA aj napriek prítomnosti antioxidantov. Derivatizácia MDA musí byť vykonaná vhodným derivatizačným činidlom za takých podmienok, aby nedochádzalo k nadhodnoteniu výsledkov ďalšou tvorbou MDA počas derivatizácie. Derivatizácia MDA s 2,4-dinitrofenylhydrazínom (DNPH) produkuje DNPH deriváty s intenzívnou žltou farbou, ktoré sú rýchlo, jednoducho a hlavne kvantitatívne detekované s UV detektorom¹³.

Cieľom našej práce bolo vypracovať HPLC metódu na stanovenie MDA derivatizáciou s DNPH a extrakciou na tuhej fáze vo vzorkách bravčového mäsa. Výsledky HPLC stanovenia boli porovnané s výsledkami získanými metódou stanovenia TBA čísla.

Experimentálna časť

Přístroje

Na stanovenie TBA čísla bol použitý spektrofotometer Helios γ v 4,6 (Thermospectronic, Veľká Británia) s UV detekciou pri vlnovej dĺžke 532 nm.

HPLC stanovenie bolo vykonané na kvapalinovom chromatografe HP 1050 (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemecko) pozostávajúceho z vysokotlakovej pumpy, automatického dávkovača, variabilného UV-VIS detektora a integrátora (model HP 3396 II). Po derivatizácii MDA s DNPH bola vykonaná extrakcia na tuhej fáze (SPE) pomocou 3 ml Supelclean LC-18 SPE kolóniek (Supelco, USA) na vakuovom zariadení pre SPE kolónky (Whatman, Anglicko). Na HPLC separáciu MDA-DNPH komplexu bola použitá kolóna Nucleosil C₁₈ reverzná fáza (125 × 3 mm, veľkosť častíc 3 μ m) s mobilnou fázou ace-

tonitril: voda : kyselina octová, 39 : 61 : 0,2 (v/v/v). Bola použitá izokratická elúcia pri objemovej prietokovej rýchlosti 1 ml min^{-1} . Detekcia sa vykonávala pri vlnovej dĺžke 307 nm. Dávkovaný objem bol $20 \mu\text{l}$ pre jednotlivé stanovenie. Stanovenie bolo vykonávané pri laboratórnej teplote.

Chemikálie

Hexán; 1,1,3,3-tetrametoxypropán (TMP), butylhydroxytoluén (BHT, 2-terc-butyl-4-metylphenol) a kyselina 2-tio-barbiturová boli zakúpené od firmy Sigma (Nemecko). Kyselina trichlóroctová, kyselina octová, kyselina chlorovodíková a EDTA boli zakúpené od firmy Lachema Brno (Česká republika). 2,4-Dinitrofenylhydrazín (DNPH) bol zakúpený od firmy Fluka (Švajčiarsko) a acetonitril od firmy Merck (Nemecko). Všetky roztoky použité pre HPLC analýzu boli HPLC alebo analytickej čistoty.

Zásobný roztok MDA sme pripravili kyslou hydrolyzou TMP (cit.¹⁴). Do 10-ml odmernej banky so zátkou sme pridali $10 \mu\text{l}$ TMP a doplnili $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ HCl. Po 5 minútovej inkubácii vo vriacej vode sme banku ochladili pod tečúcou vodou. 1 ml z takto pripraveného roztoku MDA sme napipetovali do 100 ml odmernej banky a doplnili $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ HCl. Výsledný zásobný roztok MDA o koncentrácii $4,37 \mu\text{g ml}^{-1}$ bol skladovaný pri teplote $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1 týždňa. Zo zásobného roztoku MDA ($4,37 \mu\text{g ml}^{-1}$) sme ďalším riedením $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ HCl pripravili pracovné roztoky MDA o koncentracii 4,37; 17,48; 43,7; 174,8; 437 a 874 ng ml^{-1} . Derivatizácia a úprava štandardov prebiehala rovnako ako u vzoriek. Pracovné roztoky MDA boli pripravované každý deň čerstvé.

Vzorky

Na stanovenie sme použili bravčové stehno, ktoré bolo 24 h po jatočnom opracovaní zmrazené pri $-21 \text{ }^\circ\text{C}$ a skladované 1 mesiac. Zmrazené mäso sme posekali na sekačke zmrazeného mäsa a pomleli na mlynčeku ($\varnothing 4,5 \text{ mm}$). Vzorky sme zabalili do polyetylénových sáčkov a skladovali v chladničke pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$ počas 96 h. Prvú analýzu sme vykonali hneď po kúrovaní. Ďalšie stanovenia boli vykonané po 24, 48, 72 a 96 h skladovania. V každej skupine bolo vyšetovaných minimálne 6 vzoriek.

Extrakcia MDA

Extrakciu MDA zo vzoriek pre obidve analýzy sme vykonali podľa Graua a spol.⁷ Do 50-ml centrifugačnej skúmavky sme navážili $1,5 \text{ g}$ pomletej vzorky, pridali sme 1 ml 0,3% EDTA, mierne premiešali, pridali 5 ml 0,8% BHT v hexáne a obsah skúmavky opäť mierne premiešali. Tesne pred homogenizáciou sme pridali 8 ml ľadovo vychladenej 5% TCA a homogenizovali 30 s pri maximálnych otáčkach. Po homogenizácii sme nechali vzorku

10 min stáť a potom centrifugovali 5 min (3500 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Po centrifugácii sme odstránili vrchnú hexánovú vrstvu a vzorku prefiltrovali (Whatman 4). Prefiltrovanú vzorku sme v odmernej banke doplnili do 10 ml 5% TCA.

Stanovenie TBA čísla

Na stanovenie tiobarbiturového čísla bola použitá metóda opísaná Grauem a spol.⁷ K 3 ml vzorky sme do skúmavky pridali 2 ml 0,8% TBA. Vzorky a štandardné roztoky MDA sme inkubovali vo vodnom kúpeli 30 min pri teplote $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Po ochladení v ľadovom kúpeli a temperovaní vzoriek pri izbovej teplote po dobu 45 min, sme merali absorbanciu vzoriek na UV-spektrofotometri pri vlnovej dĺžke 532 nm.

HPLC stanovenie

Derivatizácia a SPE extrakcia

Derivatizačné činidlo pre HPLC analýzu sme pripravili rozpustením 31 mg DNPH v 2 mol l^{-1} HCl v 10-ml odmernej banke¹³. Na derivatizáciu vzorky sme k 2 ml vzorky, štandardu, alebo 5% TCA (slepá vzorka) v 12 ml skúmavke pridali $100 \mu\text{l}$ DNPH-reagentu (derivatizačné činidlo). Po miernom premiešaní sa zmes inkubovala 30 min pri izbovej teplote na tmavom mieste.

Trojmililitrové Supelclean LC-18 SPE-kolónky (extrakcia na tuhej fáze) boli aktivované premytím 2 ml acetonitrilu a 2 ml vody v extrakčnom vákuovom zariadení. Následne boli na kolónky nanesené vzorky a pomaly (2 ml min^{-1}) za vákuu prepustené cez kolónky. Po premytí kolóniek redistilovanou vodou (2 ml) bol MDA-DNPH komplex eluovaný 1 ml acetonitrilu. $20 \mu\text{l}$ eluátu sme použili na samotné HPLC stanovenie.

Identifikácia a kvantifikácia MDA

K identifikácii MDA-DNPH komplexu vo vzorke sme použili porovnanie retenčných časov rôznych koncentrácií štandardu a prítomného komplexu vo vzorke. Kvantitatívne vyhodnotenie výsledkov bolo vykonané pomocou kalibračnej krivky pripravenej so známymi koncentracií štandardných roztokov. Kalibračná krivka vykazovala lineárnu závislosť medzi plochou MDA-DNPH píkovo a koncentraciou štandardných roztokov v rozpätí od $4,37$ do 874 ng ml^{-1} ($r = 0,9989$).

Štatistické spracovanie výsledkov

Štatistické spracovanie výsledkov bolo vykonané štatistickým programom Graph Pad Prism verzia 3,0 (GraphPad Software, 1999). Výsledky sú vyjadrené ako aritmetický priemer (\bar{x}) a štandardná odchýlka (sd). Jednotlivé metódy stanovenia malónaldehydu boli štatisticky vyhodnotené Studentovým t -testom ($P < 0,05$). Bol tiež hodnotený variačný koeficient.

Výsledky a diskusia

Extrakcia MDA zo vzoriek

MDA sa veľmi ľahko viaže na $-SH$ a $-NH_2$ skupiny makromolekúl, napr. na proteíny a nukleové kyseliny^{11,15} a podobne ako pri stanovení TBA čísla k presnému stanoveniu je potrebné uvoľniť MDA z týchto väzieb. Metóda extrakcie MDA zo vzoriek výrazne ovplyvňuje výsledok stanovenia MDA. Draper a spol.⁶ udávajú, že vyššie hodnoty MDA získané extrakciou pomocou TCA zahriatím na bod varu dávajú dôkaz, že väčšina MDA v živočíšnych tkanivách je viazaná a musí byť uvoľnená kyslou hydrolyzou vyžadujúcou vyššie teploty (95 °C). Raharjo a spol.⁹ však udáva, že použitie vysokých teplôt napomáha ďalšej oxidácii PNMK, rozkladu hydroperoxidov a tak vedie k tvorbe nadbytočného MDA a ďalších TBA reakčných produktov. K tomuto názoru sa prikláňajú aj ďalší autori^{7,9}. Podľa nich na uvoľnenie MDA z väzieb a na extrakciu MDA zo vzorky je postačujúca kyslá hydrolyza (pH 1–3) bez použitia vysokých teplôt.

Studenú extrakciu MDA zo vzoriek sme vykonali podľa Graua a spol.⁷. MDA bol zo vzoriek extrahovaný ľadovo vychladenou 5% TCA. Táto metóda extrakcie vhodne brzdí oxidačné procesy a tým tvorbu nadbytočného MDA počas spracovania vzoriek. Pridanie antioxidantu (0,8% BHT v hexáne) a komplexotvorného činidla (0,3% EDTA) ihneď po navážení vzoriek eliminuje oxidačné procesy prítomných lipidových zložiek, uvoľnených k oxidácii po rozomletí vzorky. Použitie ľadovo vychladenej 5% TCA zabráni zvýšeniu teplôt vzorky počas homogenizácie a možnej oxidácii prítomných lipidových zložiek. Významná je tiež hexánová vrstva, ktorá počas homogenizácie bráni prístupu kyslíka ku vzorkám. V hexánovej vrstve, ktorá je po centrifugácii odstránená, sa rozpustia aj všetky lipidové zložky, ktoré sú tak oddelené a tým sa znižuje riziko vzniku nadbytočného MDA a tiež dôjde k odstráneniu určitej časti zložiek, ktoré vytvárajú interferujúce piky.

Derivatizácia a SPE extrakcia

Derivatizácia MDA s DNPH prebieha veľmi dobre aj pri izbových teplotách. Čas potrebný na derivatizáciu MDA je u viacerých autorov rozdielny. Pohybuje sa od 10 min (cit.¹¹) cez 30 min (cit.^{16–18}) až do 1 h (cit.¹²). Tridsaťminútová inkubácia sa v našich pokusoch ukázala ako dostačujúca na kvantitatívnu derivatizáciu MDA.

SPE pracuje na princípe kvapalinovo-kvapalinovej extrakcie a preto má väčšinu rovnakých princípov ako vysokoúčinná kvapalinová chromatografia. V poslednej dobe je SPE považovaná za jednu z najúčinnějších techník na rýchlu a selektívnu úpravu vzoriek¹⁹. Použitie kroku extrakcie na tuhej fáze pri úprave vzorky je účinným krokom zvýšenia citlivosti metódy, zníženia opotrebovania kolóny a zníženia času potrebného na analýzu vzorky¹⁶.

Na elúciu MDA-DNPH komplexu z SPE kolóniek autori^{8,16} vo svojich prácach odporúčajú použiť 600 μ l

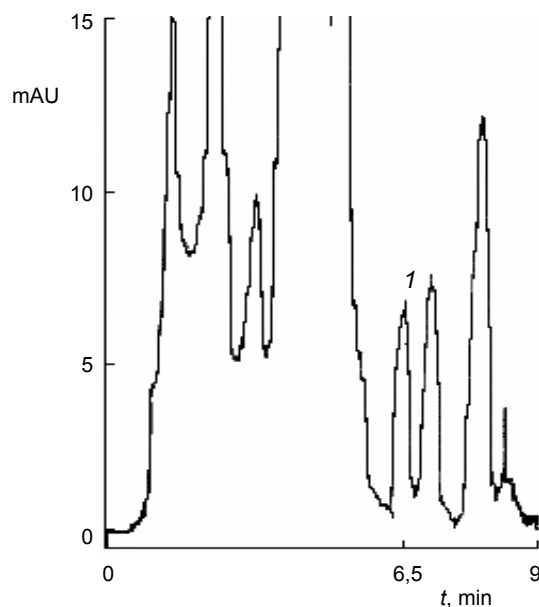
až 2 ml acetonitrilu. Účinnosť elúcie MDA-DNPH komplexu z SPE kolóniek sme sledovali stanovením množstva MDA po elúcii s 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; a 2,0 ml acetonitrilu. Pre maximálnu elúciu MDA-DNPH komplexu z SPE kolóniek je potrebný 1 ml acetonitrilu.

HPLC stanovenie

MDA-DNPH komplex bol stanovený izokratickou elúciou s použitím mobilnej fázy acetonitril : voda : kyselina octová (39 : 61 : 0,2) pri objemovej prietokovej rýchlosti 1 ml min^{-1} . Fotometrický UV-VIS detektor pri 307 nm detekoval MDA-DNPH komplex pri elučnom čase 6,5 min (obr. 1). Pomer mobilnej fázy 39 : 61 : 0,2 vhodne oddeľoval pík analytu od ostatných zložiek detekovaných pri danej vlnovej dĺžke.

Cordis a spol.¹⁷ udávajú, že podiel acetonitrilu má byť v rozmedzí 34–40 %. Vyššie ako aj nižšie percentuálne podiely vytvárajú artefakty, ktoré znižujú presnosť stanovenia. UV absorpčné maximum MDA-DNPH komplexu je v rozmedzí vlnových dĺžok 307–310 nm (cit.¹¹).

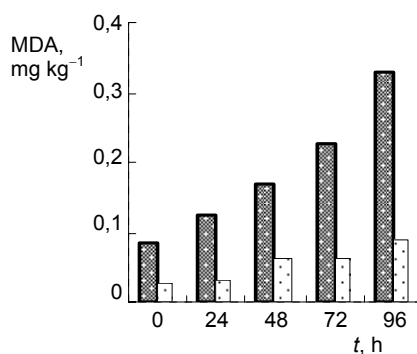
Výtťažnosť metódy (hodnotená z mäsových vzoriek fortifikovaných 116,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ MDA štandardu) bola 94,7 %. Opakovateľnosť opísanej HPLC metódy vyjadrenej ako relatívna štandardná odchýlka (RSD) u vzoriek fortifikovaných 116,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ MDA štandardu bola 1,8 %. Detekčný limit metódy bol 0,06 ng v 20 μ l použitých na analýzu. Kvantifikačný limit (LOQ) danej metódy bol 3,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ mäsovej vzorky.



Obr. 1. HPLC chromatogram malondialdehydu (MDA-DNPH) zo vzorky bravčového mäsa; 1 - MDA-DNPH

Porovnanie HPLC metódy s metódou stanovenia TBA čísla

V pokuse sme porovnali nami vypracovanú HPLC metódu so studenou extrakciou MDA zo vzoriek s použitím SPE kolóniek a klasickú TBA metódu stanovenia MDA. Pri porovnaní metód navzájom sme zistili výrazne rozdiely (obr. 2). S časom skladovania vzoriek rástol aj rozdiel medzi výsledkami jednotlivých metód. Najvýraznejšie rozdiely vo výsledkoch obidvoch metód boli po 24, 72 a 96 h skladovania vzoriek v chladničke pri 4 °C ($P < 0,05$). Výsledky získané HPLC metódou boli po 24 h v priemere 2,5, po 72 h 3,46 a po 96 h až 3,69 krát nižšie ako tie získané stanovením TBA metódou. Tieto rozdiely vo výsledkoch svedčia o vyššej presnosti MDA stanovenia HPLC metódou. Draper a spol.⁶ udáva, že pri stanovení MDA u tých istých vzoriek pečene TBA spektrofotometrickými metódami boli výsledky 2,11–4,5 násobne vyššie ako tie získané HPLC metódami detekujúcimi MDA-TBA komplex. Podľa nich rozdiely v hodnotení MDA získaného z rovnakých vzoriek spektrofotometrickými TBA metódami a HPLC metódami detekujúcimi TBA-MDA komplex potvrdzujú vo vzorkách prítomnosť iných zložiek ako MDA, ktoré tvoria s kyselinou tiobarbiturovou reakčné produkty s absorbným maximom pri 532 nm a tak nadhodnocujú výsledok stanovenia MDA. Podľa Pilza a spol.¹¹ jednou z hlavných príčin variability výsledkov hodnotenia MDA sú rozdielne spôsoby extrakcie MDA zo vzoriek. Produkcia nadbytočného MDA počas zahrievania vzoriek pri derivatizácii s kyselinou tiobarbiturovou môže byť zdrojom variability výsledkov¹².



Obr. 2. Porovnanie výsledkov stanovenia MDA vo vzorkách kurovaného bravčového mäsa skladovaného pri 4 °C; plné stĺpce – TBA metóda, prázdne stĺpce – HPLC metóda

Záver

Výsledky získané klasickou TBA metódou boli až 3,46 násobne vyššie ako výsledky získané HPLC stanove-

ním. To potvrdzuje názor, že počas spracovania a derivatizácie vzoriek pri stanovení tiobarbiturového čísla dochádza k tvorbe malondialdehydu, alebo TBA reakčných zložiek, ktoré nadhodnocujú výsledky stanovenia.

Vypracovaná HPLC metóda stanovenia malondialdehydu po derivatizácii 2,4-dinitrofenylhydrazínom a extrakcii MDA-DNPH komplexu na SPE-kolónkach je rýchlou, presnou a finančne nenáročnou metódou stanovenia rozkladných produktov oxidácie lipidov. To ju predurčuje na využitie pre stanovenie stupňa oxidačných procesov v potravinách živočíšneho pôvodu.

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantovej úlohy VEGA SR č. 1/2395/05.

LITERATÚRA

- Bystrický P., Pleva J., Máté D.: *Cesk. Hyg.* 38, 42 (1993).
- Bystrický P., Dičáková Z.: *Slov. Vet. J., Supplementum* 1, 23, 6 (1998).
- Wagner B. A., Buettner G. R., Burns C. P.: *Biochemistry* 33, 4449 (1994).
- Pearson A. M., Love J. D., Shorland F. B.: *Adv. Food Res.* 23, 1 (1977).
- Arouma O. I.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 199 (1998).
- Draper H. H., Squires E. J., Mahmoodi H., Wu J., Agarwal S., Hadley M.: *Free Radical Biol. Med.* 15, 353 (1993).
- Grau A., Guardiola F., Boatella M., Barroeta A., Codony R.: *J. Agric. Food Chem.* 48, 1155 (2000).
- Piette G., Raymond Y.: *Fleischwirtschaft Int.* 3, 36 (1999).
- Raharjo S., Sofos J. N.: *Meat Sci.* 35, 145 (1993).
- Lykkesfeldt J.: *Clin. Chem.* 47, 1725 (2001).
- Pilz J., Meinke I., Gleiter Ch. H.: *J. Chromatogr., B* 742, 315 (2000).
- Fenaille F., Mottier P., Turesky R.J., Ali S., Guy P.A.: *J. Chromatogr., A* 921, 237 (2001).
- Cordis G. A., Maulik N.: *J. Chromatogr.* 632, 97 (1993).
- Squires E. J.: *Poultry Sci.* 69, 1371 (1990).
- Esterbauer H., Schauer R. J., Zollner H.: *Free Radical Biol. Med.* 11, 81 (1991).
- Bakalova R., Mileva M., Kotsev Ch., Bardarov V., Ribarov S. T.: *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 22, 267 (2000).
- Cordis G. A., Das K. D., Riedel W.: *J. Chromatogr., A* 798, 117 (1998).
- Cordis G. A., Maulik N., Das D. K.: *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 1645 (1995).
- Ruiz-Gutierrez V., Perez-Camino M. C.: *J. Chromatogr., A* 885, 321 (2000).
- Marcinčák S., Sokol J., Turek P., Rožanska H., Dičáková Z., Máté D., Popelka P., Korim P.: *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 47, 491 (2003).

S. Marcinčák, J. Sokol, P. Turek, P. Popelka, and J. Nagy (*Department of Food Hygiene and Technology, University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic*): **Determination of Malondialdehyde in Pork Meat Using Solid Phase Extraction and HPLC**

An HPLC method of malondialdehyde (MDA) determination in pork meat was described. MDA was extracted from samples using ice-cold 5 % trichloroacetic acid. After derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), the MDA-DNPH compound was separated on SPE C₁₈

column and eluted with 1 ml of acetonitrile. The compound was determined on a Nucleosil C₁₈ reverse-phase column, with acetonitrile – water – acetic acid (39:61:0.2) as mobile phase and isocratic elution. Detection was performed using a UV-VIS detector at 307 nm, at a retention time of 6.5 min. The results were compared with the thiobarbituric acid (TBA) method applied to cut pork meat within 96 h of storage at 4 °C. The HPLC determination was more accurate than the TBA method, which gives higher values.

Česká společnost chemická

a

Ústav chemie a technologie sacharidů VŠCHT Praha

pořádají

konferenci „Polysacharidy II: Struktura a biologické účinky polysacharidů a jejich derivátů“

10.11.2006, 8,30 až 16,00 h na Novotného lávce 5, Praha 1

Program

1. Zahájení: Jana Čopíková
2. Hlavní přednášky:
 - Zdenka Hromádková: Biologicky aktivne polysacharidy z léčivých bylin a iných rastlín
 - Miroslav Novák: β-Glukan, historie a současnost
 - Grigorij Kogan: Antioxidačné, antimutagénne a antigenotoxické vlastnosti polysacharidov bunkových stien kvasiniek
 - Andriy Synytsya: Využití spektroskopických metod při určování struktury polysacharidů
3. Po hlavních přednáškách budou následovat krátká sdělení a posterová sekce.

Konferenční poplatek 500 Kč pro členy ČSCH a 600 Kč pro nečleny zahrnuje CD s plnými texty přednášek, občerstvení a organizační náklady. Abstrakta budou publikována v Chemických listech č. 9/2006. Je možné zajistit ubytování na kolejích na Jižním městě. Předpokládá se i zájem pasivních účastníků bez odborného příspěvku.

Uzávěrka přihlášek a zaslání abstraktů příspěvků je 30. června 2006.

Bližší informace na adrese <http://www.csch.cz>.

Kontaktní adresa: Česká společnost chemická, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1, tel.: 221 082 370, tel/fax: 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz, chem.spol@csvts.cz



BULLETIN

ASOCIACE ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

Ročník 37

Číslo 3



Ústřední komise
ÚKCHO
chemické olympiády

Český komitét
ČKCH
pro chemii



ČESKÁ SPOLEČNOST CHEMICKÉHO INŽENÝRSTVÍ
CZECH SOCIETY OF CHEMICAL ENGINEERING



Obsah Chemické listy 2006, číslo 5 a 6

ČÍSLO 5/2006

ÚVODNÍK	313
REFERÁTY	
Endokanabinoidy	314
Z. Fišar	
Arsen a jeho příjem rostlinami	323
P. Soudek, L. Vichová, Š. Valenová, R. Podlipná, J. Malá a T. Vaněk	
Konstrukce ampérometrických biosenzorů pro rychlé a jednoduché stanovení etanolu	330
M. Valach a E. Šturdík	
Kinetika chemického rozpouštění oxidů: Porovnání teorie a experimentu	337
A. Fedoročková a P. Raschman	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Porovnání vyparovacího procesu v neriadenom D.C. oblúku v klasickej spektrografii a riadenom D.C. oblúku v optickej spektrometrii pri analýze niektorých vybraných environmentálne relevantných prvkov	348
S. Ružičková, J. Bajuszová, M. Matherny a L. Koller	
Materiály pro tenké vrstvy infračervených zrcadel	357
J. Mohelníková	
Identifikace komplexů hliníku v uhlí metodou NMR tuhé fáze	363
P. Straka a Z. Klika	
NOMENKLATURA A TERMINOLOGIE	368
OPRAVA	368
RECENZE	369
KONFERENCE SIGMA-ALDRICH – SBORNÍK	371

ČÍSLO 6/2006

ÚVODNÍK	417
REFERÁTY	
Kyselina sorbová a její deriváty jako suroviny pro přípravu listových alkoholů	418
E. Leitmannová a L. Červený	
Anorganické kontaminanty v pôdnom ekosystéme	424
J. Makovníková, G. Barančíková, P. Dlapa a K. Dercová	
Bunková stena húb – výzva pre výskum nových antimykotik	433
M. Mazáň, K. Mazáňová a V. Farkaš	
Klastrová boranová analoga cyklopentadienylového aniontu a ferrocenu	440
B. Štíbr a B. Grüner	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Voltametrické stanovení alizarinové chromové černi PT s využitím kompozitních elektrod	449
S. Šebková	
Využití FTIR a multikomponentních metod při stanovení vlhkosti, popela a prchavé hořlaviny v černém uhlí	455
M. Ritz a K. Slavinská	
Stopové prvky v uhelných a neuhelných sedimentech severočeské pánve a zeminách rekultivovaných lokalit	462
M. Šafařová a M. Řehoř	
VÝUKA CHEMIE	467
RECENZE	468

ZÁKLADY TERMODYNAMIKY NEVRATNÝCH DĚJŮ

IVAN VAVRUCH

Route du Centre 6, CH-1723 Marly (Fribourg), Švýcarsko
s.vavruch@swissonline.ch

Klíčová slova: nevratné děje, klasická nerovnovážná termodynamika, racionální termodynamika

Obsah

1. Úvod
2. Klasická (lineární) nerovnovážná termodynamika
3. Racionální termodynamika
4. Pracovní postup racionální termodynamiky
5. Závěr

1. Úvod

Termodynamika je fenomenologická (popisná) teorie, která studuje chování makroskopických soustav vyměňujících s okolím teplo, práci a hmotu. Tak zvaná klasická termodynamika je postavena na dvou axiomech: na zákonu zachování energie, rozšířeném na disipativní soustavy, vyměňující s okolím teplo, a na principu maximalizace entropie. Mluvíme o prvním a druhém termodynamickém zákonu. Tyto axiomy jsou základem pro pochopení četných vztahů mezi experimentálními veličinami. Jejich použitelnost je však velmi omezená, protože klasická termodynamika zavádí absolutní entropii jen v rovnovážných stavech a entropická nerovnost se týká toliko dějů probíhajících mezi rovnovážnými stavy¹.

Pro klasickou rovnovážnou termodynamiku je velmi význačné, že používá rovnováhu jako primitivní, to jest nedefinovaný a prvotní pojem celé teorie. V jejím teoretickém rámci tedy nerovnovážné (nevratné) děje vlastně studovat „nemůžeme“. Termodynamika se proto začala soustavně zabývat obecnými (nerovnovážnými) ději až teprve v polovině 20. století. Připomínám zejména pionýrské práce uveřejněné Onsagerem, Eckartem, Meixnerem a Prigoginem^{2,3}. V letech 1968 a 1977 dostali Onsager a Prigogine Nobelovu cenu za chemii. Postupy vypracované těmito autory se obvykle nazývají klasická nerovnovážná termodynamika. Byly také uveřejněny postupy jiné, např. nerovnovážná termodynamika „bez entropie“ (cit.⁴), ale v této práci se omezíme na dva hlavní a úspěšné směry, na klasickou neboli lineární nerovnovážnou termodynamiku a na tzv. racionální termodynamiku. První z nich dovoluje popsat nerovnovážné stavy a děje v blízkosti rovnovážného stavu, druhý směr překonává tato omezení a otevírá cestu teorii obecných termodynamických systémů a procesů.

2. Klasická (lineární) nerovnovážná termodynamika

Základním principem klasické neboli lineární nerovnovážné termodynamiky je hypotéza lokální rovnováhy^{4–6}. Předpokládá se, že každý systém, který je mimo rovnováhu, závisí lokálně na stejných proměnných jako v rovnovážném stavu. To formálně vede k termodynamické struktuře, která je shodná se strukturou rovnovážné termodynamiky. Intenzivní proměnné jako absolutní teplota, tlak a chemické potenciály jsou definovány stejně jako v rovnováze a mají svůj obvyklý význam. Entropie se zavádí jen v „blízkosti rovnováhy“, kde platí lokální rovnováha. Je tam definována stejně přesně a jednoznačně jako v rovnováze a je funkcí stejných stavových proměnných. Vztahy mezi stavovými proměnnými platné v klasické termodynamice zůstávají v platnosti, ovšem za podmínky, že jsou pro každý okamžik formulovány lokálně.

V klasické nerovnovážné termodynamice chápeme lokální rovnováhu jako platnost Gibbsovy rovnice. To je výchozí postulát celé teorie a jeho platnost se přijímá apriorně, tedy bez odvození. Mluvíme proto o hypotéze lokální rovnováhy. Závažným nedostatkem tohoto přístupu je ovšem poznatek, že lokální rovnováha neplatí zcela obecně a na ní založená teorie může mít proto pouze aproximační charakter. Omezíme-li se pro jednoduchost na čistou látku, můžeme výchozí vztah klasické nerovnovážné termodynamiky vyjádřit Gibbsovou fundamentální rovnicí formulovanou lokálně pro libovolný časový okamžik⁵:

$$T\dot{s} = \dot{u} + P\dot{v} \quad (1)$$

V této rovnici značí T absolutní teplotu, s specifickou entropii, u specifickou vnitřní energii, P značí tlak a v specifický objem. Tečka označuje časovou derivaci stavové veličiny.

Z rovnice (1) se vychází při odvozování základního vztahu klasické teorie, který umožňuje explicitní výpočet rychlosti produkce entropie σ při nevratném procesu. Produkce entropie pak slouží k jeho charakterizaci^{4–6}. Opomíneme podrobnost odvození a uvedeme pouze, že se tento vztah obvykle vyjadřuje v termínech „sil“, které ženou uvažovaný nevratný proces a v termínech jejich odezev, tzv. „toků“. Výslednou relaci můžeme (obecně pro složku k) psát v jednoduché formě pro libovolný časový okamžik⁵:

$$\sigma = \sum_k J_k X_k \quad (2)$$

V této rovnici je J_k termodynamický tok, např. tepelný tok, difuze, rychlost chemické reakce atd., a X_k značí generalizovanou hnací sílu jako gradient teploty, gradienty chemických potenciálů, chemické afinity a podobně. Rovnice (2) je základním vztahem klasické nerovnovážné termody-

namiky a říká slovy, že rychlost produkce entropie σ je rovna součtu součinů toků a příslušných hnacích sil. V rovnováze, tedy pro vratné procesy, jsou všechny J_k a X_k rovny nule a produkce entropie σ je podle rovnice (2) nulová. Nevratné procesy jsou naopak charakterizovány pozitivní hodnotou této produkce, $\sigma > 0$.

Stavové rovnice se v klasické nerovnovážné termodynamice nazývají fenomenologické rovnice a mají charakter lineárních vztahů. Klasická nevrátaná termodynamika se proto také nazývá lineární termodynamikou. Fenomenologické rovnice se vytvářejí předpokladem, že toky závisí na hnacích silách lineárně. Kinetické koeficienty se zde nazývají fenomenologické koeficienty a postulují se pro ně platnost Onsagerových-Casimirových recipročních relací^{4–6}. Tyto vztahy požadují v podstatě, aby byly kombinovány toliko toky a hnací síly příbuzného charakteru a slouží k omezení fenomenologických vztahů. Tím jsme shrnuli základní výsledky klasické nerovnovážné termodynamiky⁵.

Teorie vycházející z hypotézy lokální rovnováhy je jednoduchá, osvědčila se v četných praktických situacích a používá se dodnes nejen v chemii a fyzice, ale také např. v chemickém inženýrství a v biochemii. Byla však často kritizována pro její aproximativní charakter a omezenou platnost. Nehodila se např. k popisu situací daleko od rovnovážného stavu, s nimiž se setkáváme u materiálů se složitou vnitřní strukturou, s výraznější pamětí, s plasticitou, hysterezem apod. Proto se usilovalo o její zdokonalení a rozšíření. To vedlo k vypracování dokonalejších postupů, zvláště také k postupnému vypracování souboru metod, které jejich autoři nazvali racionální termodynamikou.

3. Racionální termodynamika

Moderní verze makroskopicko-fenomenologické nerovnovážné termodynamiky zvané racionální termodynamika je nelineární termomechanika spojitých soustav. Liší se proto velmi podstatně od ostatních metod nerovnovážné termodynamiky. Byla zavedena v druhé polovině minulého století hlavně Truesdellem, Colemanem, Nolleem, Šilhavým a Müllerem^{7–11}. Je to matematická teorie, která staví na logické analýze a zcela opomíjí molekulární strukturu studovaných soustav. Neméně zajímavá a významná je však také fyzikální podstata racionální termodynamiky, a v této práci se budeme zabývat toliko tímto aspektem teorie.

Cílem racionální termodynamiky je v první řadě nalezení postupů sloužících k formulaci tzv. konstitutivních rovnic. To jsou matematické modely reálných soustav a konstitutivní vztahy slouží k co nejuvěrnějšímu popisu jejich charakteristik. Připomínám dále, že racionální termodynamika opouští hypotézu lokální rovnováhy, na níž stojí klasická nerovnovážná termodynamika a chápe lokální rovnováhu jako platnost Gibbsových vztahů v nerovnovážných situacích. Gibbsova rovnice se nepostuluje předem, nýbrž se odvodí.

Hlavní myšlenky teorie racionální termodynamiky jsou shrnuty v pracích^{4,12–20}. Pro rovnovážnou a klasickou

nerovnovážnou termodynamiku je charakteristické, že zavádějí své základní postuláty a pojmy, které obsahují např. termodynamické zákony, entropickou nerovnost, absolutní teplotu a entropii, v rovnovážných stavech nebo v „blízkosti rovnováhy“, kde platí lokální rovnováha. Klíčová úloha při tom připadá entropické neboli Clausiovo-Planckově nerovnosti, tedy druhému termodynamickému zákonu, který obvykle píšeme pro obecné děje ve formě^{12,13}:

$$S_f - S_i \geq \int \frac{dq}{T} \quad (3)$$

Zde je S_f entropie konečného stavu, S_i je entropie výchozího stavu, dq je množství tepla vyměněného s okolím při absolutní teplotě T , rovnítko platí pro děj rovnovážný (vratný) a znaménko nerovnosti pro děj nerovnovážný (nevratný). Racionální termodynamika navržená Colemanem a Nolleem^{14,15} je charakterizována především tím, že postulují platnost vztahu (3), který je základním termodynamickým kriteriem nevrátlosti, v plné šíři. To znamená, že přijímá také existenci absolutní teploty a entropie pro obecné (nerovnovážné) stavy a děje. Předpokládá se, že entropie závisí na týchž stavových proměnných jako v rovnováze a že vztah (3) platí pro libovolný proces popsaný konstitutivními rovnicemi. Entropická nerovnost (3) se přitom předpokládá ve tvaru tzv. Clausiovy-Duhemovy nerovnosti, která představuje relaci (3) upravenou pro spojitě soustavy. Její matematická forma ovšem závisí na povaze systému, pro který je určena. Tak např. pro čistou (jednosložkovou) a neuniformní tekutinu, v níž existují prostorové gradienty, můžeme psát Clausiovu-Duhemovu nerovnost v lokální formě^{17,18}

$$\sigma \equiv \rho \dot{s} + \operatorname{div}(\mathbf{q}/T) - Q/T \geq 0 \quad (4)$$

Zde σ je produkce entropie, ρ je hustota, \mathbf{q} je tepelný tok (vektor) a Q je teplo vyměněné radiací. Význam ostatních symbolů a označení je též jako v rovnici (1).

V racionální termodynamice připadá Clausiovo-Duhemově nerovnosti velmi důležitá úloha, neboť slouží k omezení, motivaci a konečně úpravě tvaru konstitutivních rovnic. Tento tzv. konstitutivní princip přípustnosti patří k základním postulátům racionální termodynamiky a požaduje^{17,18}, aby v systému popsaném konstitutivními rovnicemi platily nejen základní obecné postuláty teorie, to jest bilance hmoty, hybnosti, momentu hybnosti a energie, ale také entropická nerovnost, tedy nerovnost Clausiova-Duhemova.

Nerovnost (3) platící pro libovolné děje je velmi významným teoretickým i praktickým nástrojem, ale její fyzikální podstata objasněna nebyla. Její plné zdůvodnění přinesla teprve o třicet let později metoda českého matematika Šilhavého^{12–13,17–18}. Šilhavému se podařilo dokázat na základě přesné formulace druhého (a také prvního) termodynamického zákona existenci nerovnovážné absolutní teploty a nerovnovážné entropie. Obě veličiny jsou přesně definovány také v situacích daleko od rovnovážného stavu a splňují entropickou nerovnost, tedy druhý ter-

modynamický zákon, pro rovnovážné i nerovnovážné děje. Tím byly zdůvodněny základní postuláty, na nichž stává z logického i fyzikálního hlediska racionální termodynamika.

Je možno uzavřít, že racionální termodynamika je teorie obecných, rovnovážných i nerovnovážných, termokinetických systémů a dějů, a staví je na nový, jednotný základ. Ve verzi Šilhavého lze tuto teorii pokládat za skutečný termodynamický obraz reálných fyzikálních a chemických procesů. Dokud nebude v budoucnu otřesena platnost prvního a druhého termodynamického zákona a jejich logické důsledky, zůstanou výsledky této teorie nadále v platnosti^{12–13}. Tyto poznatky podstatně rozšiřují výsledky klasické rovnovážné termodynamiky a umožňují hlubší pohled na termodynamické vlastnosti studovaných systémů.

4. Pracovní postup racionální termodynamiky

K pochopení toho, co racionální termodynamika je a jak pracuje, velmi pomáhá, seznámíme-li se s pracovním postupem, který používá. Tento postup je v termodynamice velice nezvyklý a byl převzat převážně z mechaniky kontinua^{12,18}. Racionální termodynamika vychází z těchto čtyř skupin veličin a postulátů¹²:

- Veličiny popisující a charakterizující termokinetický systém. Vlastnosti spojitých soustav s pamětí jsou definovány konstitutivními nezávislými proměnnými lokálně a to nejen pro současnost, nýbrž pro jejich celou minulost. Racionální termodynamika k tomu používá konstitutivní funkcionály.
- Základní obecné zákony, platné v celé oblasti jevů, které zamýšlíme studovat. Především bilance hmoty, hybnosti a energie, dále první a druhý termodynamický zákon.
- Konstitutivní vztahy (rovnice), to jest matematické modely systémů a materiálové rovnice charakterizující reálné systémy.
- Konstitutivní postuláty neboli „principy“, shrnující naše dlouholeté zkušenosti s konstruováním konstitutivních rovnic. Jsou pro racionální termodynamiku velmi významné a speciálně konstitutivní princip přípustnosti slouží k omezení a úpravě konstitutivních rovnic.

Uvedené zákony a předpoklady kombinuje racionální termodynamika v následujícím pracovním postupu, který se vždy snaží zachovat. Nejprve zvolíme konstitutivní nezávislé proměnné. Jejich volba velmi závisí na povaze studovaného materiálu. V hydrodynamice to jsou obvykle pole hustoty, rychlosti a empirické teploty, zpravidla jako absolutní teplota T . Dále aplikujeme rovnice bilancí hmoty, hybnosti, jejího momentu, energie a odvodíme materiálové rovnice, tzv. konstitutivní rovnice. Tyto vztahy představují funkcionály, které přiřazují příslušným polím hodnoty odezvy v daném místě a okamžiku¹⁸. K navrhování konstitutivních rovnic použijeme konstitutivní „principy“ (pravidla). Např. konstitutivní princip objektivity po-

žaduje, aby studovaný materiál nezávisel na vztažné soustavě a tedy na pozorovateli. Konstitutivní princip symetrie žádá, aby konstitutivní rovnice byly v soulase s předpokládanou grupou symetrie. Podle konstitutivního principu determinismu jsou vlastnosti tekutin určeny poli hustoty, pohybu a teploty v celé tekutině, v minulosti až do současnosti. Vliv okolí a minulosti omezují konstitutivní principy diferenciální paměti a lokální akce. Konstitutivní princip equiprezenze zajišťuje, aby žádné z nezávisle proměnných nebyla dávana přednost¹⁸.

Dalším významným krokem je úprava konstitutivních rovnic na definitivní tvar. K tomu použijeme konstitutivní princip přípustnosti navržený Colemanem a Nolleem, který umožnil vybudovat racionální termodynamiku. Jak je uvedeno v předchozím odstavci, vyžaduje tento princip, aby při všech přípustných termokinetických procesech platila také entropická nerovnost, tzn. Clausiova-Duhemova nerovnost. V praxi postupujeme tak, že dosadíme konstitutivní rovnice přímo do Clausiovy-Duhemovy nerovnosti a po úpravách odvodíme důležitý vztah (nerovnost) pro explicitní výpočet produkce entropie, která charakterizuje uvažovaný nerovnovážný proces¹⁸.

Na závěr studujeme v uvažovaném systému podmínky rovnováhy.

Dosažením konstitutivních rovnic do bilancí dostaneme obvykle složitou soustavu parciálních diferenciálních rovnic, např. u tekutin pro hustotu, teplotu a rychlost. Jejich řešení za významných počátečních a okrajových podmínek vede k praktickým výsledkům. To už není přímým úkolem racionální termodynamiky, nýbrž jejích aplikací, např. termiky, chemického inženýrství, chemické kinetiky apod.

5. Závěr

Jsou analyzovány základní myšlenky dvou hlavních směrů nerovnovážné termodynamiky. Klasická (lineární) nerovnovážná termodynamika staví na hypotéze lokální rovnováhy a její termodynamická struktura odpovídá struktuře klasické rovnovážné termodynamiky. Racionální termodynamika představuje nový směr v termodynamice. Používá stavové funkcionály a konstitutivní postuláty k definici termokinetických systémů. Absolutní teplota a entropie v nerovnováze jsou odvozené veličiny a v podání Colemanově a Nollově se používají k omezení a motivaci konstitutivních rovnic (konstitutivní princip přípustnosti). Pracovní metoda je v termodynamice velice neobvyklá a je diskutována odděleně.

Autor děkuje doc. I. Samohýlovi za kritickou recenzi rukopisu a za cenné připomínky.

LITERATURA

- Callen H. B.: *Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics*, 2. vyd. Wiley, New York 1985.

2. Meixner J., Reik H. G.: *Thermodynamik der irreversiblen Prozesse. Handbuch der Physik III/2* (Flügge S., ed.). Springer, Berlin 1959.
3. Prigogine I.: *Introduction to Thermodynamics of Irreversible Processes*. Interscience, New York 1961.
4. Vavruch I.: Chem. Listy 96, 271 (2002); http://chemicke-listy.vscht.cz/old/abs_may_2002.html.
5. Jou D., Casas-Vázquez J., Lebon G.: *Extended Irreversible Thermodynamics*. Springer, Berlin 1993.
6. Lavenda B. H.: *Thermodynamics of Irreversible Processes*. Macmillan, London 1978.
7. Šilhavý M.: *The Mechanics and Thermodynamics of Continuous Media*. Springer, Berlin 1997.
8. Truesdell C.: *Rational Thermodynamics*, 2. vyd. Springer, New York 1984.
9. Truesdell C., Toupin R.: *The Classical Field Theories. Handbuch der Physik III/1* (Flügge S., ed.). Springer, Berlin 1960.
10. Noll W.: *The Foundations of Mechanics and Thermodynamics*, (selected papers). Springer, Berlin 1977.
11. Hutter K.: Acta Mechanica 27, 1 (1977).
12. Kratochvíl J., Šilhavý M.: Čs. Čas. Fyz. A31, 97 (1981).
13. Kratochvíl J., Šilhavý M.: J. Non-Equilib. Thermodyn. 7, 339 (1982).
14. Coleman B. D., Noll W.: Arch. Rational Mech. Anal. 13, 167 (1963).
15. Coleman B. D.: Arch. Rational Mech. Anal. 17, 1 (1964).
16. Müller I., Ruggeri T.: *Rational Extended Thermodynamics*. Springer, New York 1993.
17. Samohýl I.: *Thermodynamics of Irreversible Processes in Fluid Mixtures*. Teubner, Leipzig 1987.
18. Samohýl I.: *Nevratná termodynamika*. Skripta VŠCHT, Praha 1998.
19. Vavruch I.: Chem. Listy 97, 219 (2003).
20. Samohýl I.: *Racionální termodynamika chemicky reagujících směsí* (Rational Thermodynamics of Chemically Reacting Mixtures). Academia, Praha 1982.

I. Vavruch (Route du Centre 6, CH-1723 Marly, Switzerland): **Fundamentals of Irreversible thermodynamics**

The basic ideas of two main versions of nonequilibrium thermodynamics are analyzed. Classical nonequilibrium thermodynamics is based on the hypothesis of local equilibrium and its thermodynamic structure corresponds to that of classical equilibrium thermodynamics. Rational thermodynamics represents a novel trend in thermodynamics. It uses state functionals and constitutive postulates for the definition of thermokinetic systems. Absolute temperature and entropy at nonequilibrium are derived quantities and, in the Coleman-Noll approach, the constitutive principle of admissibility is used for the restriction and motivation of constitutive equations. The very unusual method in thermodynamics is discussed.

INTEGROVANÝ REGISTR ZNEČIŠŤOVÁNÍ NA INTERNETU

JAN MARŠÁK

*Oddělení integrované prevence a omezování znečištění,
Ministerstvo životního prostředí, Vršovická 65, 100 10
Praha 10
jan_marsak@env.cz*

Relevantní informace o znečišťujících látkách v rámci ČR

Úvod

Registry úniků a přenosů znečišťujících látek (Pollutant Release and Transfer Registers, PRTR) jsou seznamy nebo databáze znečišťujících látek, jejich úniků a přenosů. Myšlenka založení registru úniků a přenosů znečišťujících látek vznikla poprvé ve Spojených státech amerických po tragické nehodě v indickém Bhópálu v roce 1984. Kongres USA přijal zákon umožňující vznik registru (Toxic Release Inventory, TRI), který obsahuje údaje o zhruba 600 látkách a jejich únicích do všech složek životního prostředí.

Registry PRTR zahrnují informace o únicích do ovzduší, vody a půdy, stejně jako o přenosech látek v odpadech a odpadních vodách. Látky a jejich úniky (případně přenosy) jsou uváděny jednotlivě a jsou spojeny přímo s konkrétní provozovnou. Významnou charakteristikou systému PRTR je, že údaje o únicích a přenosech konkrétních znečišťujících látek z jednotlivých podniků jsou veřejné.

Veřejná přístupnost je široký termín, který implikuje nejenom fyzický přístup k informacím, ale rovněž prezentaci informací ve formě uživatelsky přátelské a srozumitelné. Otevřené registry přinášejí veřejnosti zásadní prospěch, neboť široká škála cílových skupin získává jinak obtížně dostupné údaje.

Česká republika má od roku 2005 zdarma přístupnou internetovou stránku, na které je možné najít relevantní informace o znečišťování životního prostředí konkrétními podniky a o znečišťujících látkách. Je to stránka Integrovaného registru znečišťování životního prostředí (zkráceně IRZ) – www.irz.cz.

IRZ jako veřejný informační systém

Integrovaný registr znečišťování životního prostředí je databáze údajů o vybraných látkách (72), jejich přenosech a emisích (zákon o integrované prevenci). Integrovaný registr znečišťování je Ministerstvem životního prostředí (MŽP) zřízen a spravován jako veřejně přístupný informační systém veřejné správy. Údaje ohlášené povinnými osobami (zejména průmyslové a zemědělské podniky) do

IRZ se zveřejňují na Internetu do 30. září běžného roku za předchozí kalendářní rok (za rok 2004 se údaje zveřejní do 30. září 2005). Mimo to je MŽP povinno každoročně publikovat v listinné nebo elektronické podobě informace vybrané a zpracované informace na základě ohlášených údajů.

Významnou skutečností je rovněž nutnost z údajů ohlášených do IRZ vypracovat zprávu, kterou jsou členské státy povinny zasílat Evropské komisi (EK) a Evropské agentuře pro životní prostředí (EEA). Informace předané členskými zeměmi jsou následně zavedeny do Evropského registru emisí znečišťujících látek (EPER) a zveřejněny na stránkách <http://www.eper.cec.eu.int/>.

Vývoj stránek integrovaného registru znečišťování

První verze internetových stránek IRZ byla spuštěna v červnu 2004. Rok 2004 byl prvním rokem, za který se měla ohlašovat data. Z toho vyplývalo i zaměření stránek. Převážně byly orientovány na potenciální ohlašovatele do IRZ. Rok 2005 byl následně věnován přestavbě stránek do podoby odpovídající nárokům zákona o integrované prevenci a mezinárodních dokumentů (zejména Protokolu o registrech úniků a přenosů znečišťujících látek). V současné podobě stránka nabízí uživatelsky přátelskou formou vyčerpávající souhrn informací o IRZ.

Popis stránek

MŽP zvolilo jako základní východisko při tvorbě nových webových stránek IRZ – střízlivost, rychlou dostupnost požadovaných informací a jasně uspořádanou logickou strukturu. Uživatelé stránek neobtěžují žádné grafické prvky, které by mohly negativně ovlivňovat práci se stránkami, ani žádné další rušivé nebo příliš výrazné elementy.

Úvodní stránka je uspořádána do tří sloupců. Levý sloupec je vyhrazen pro ovládací menu. Pravý sloupec slouží k zobrazení tzv. rychlých a užitečných odkazů. Prostřední hlavní sloupec pak obsahuje nejnovější aktuality. K dispozici je i další menu umístěné v horní části stránky, které obsahuje některé položky menu v levém sloupci stránky. Existence dvou menu uživatele webu nijak neomezuje, protože obě menu jsou vždy přístupná bez ohledu na právě zobrazenou stránku. Web obsahuje dva nástroje pro vyhledávání. Jeden prohledává přímo data o znečišťování dodaná ohlašovately a druhým nástrojem lze prohledávat obsah webových stránek samotných. Na titulní stránce je rovněž umístěna krátká informace o IRZ, která vysvětluje problematiku IRZ. Celou strukturu stránek představuje tabulka I a grafickou podobu úvodní stránky obrázek 1.


 hledat...

O IRZ Pro veřejnost Pro ohlašovatele Pro ověřovatele Služby Mapa stránek

Úvodní stránka

Vyhledávání v IRZ

- » O IRZ
- » Vyhledávání v IRZ
- » Ohlašované látky
- » Ohlašování
- » Dokumenty
- » Semináře k IRZ
- » Registry znečišťování
- » Otázky a odpovědi
- » Důležité pojmy
- » Odkazy
- » Kontakty

Vítejte na stránkách integrovaného registru znečišťování životního prostředí

Integrovaný registr znečišťování životního prostředí (IRZ) je zřízen a spravován Ministerstvem životního prostředí (<http://www.env.cz>) jako veřejný informační systém veřejné správy. Provozovatelem IRZ je CENIA, Česká informační agentura životního prostředí (<http://www.cenia.cz>). IRZ je databází údajů o emisích a přenosech vybraných znečišťujících látek, které jsou ohlašovány za jednotlivé provozovny na základě splnění stanovených kritérií. Zveřejnění údajů za předchozí kalendářní rok prostřednictvím internetu probíhá vždy k 30.9. běžného roku.

Aktuality

16.2. 2006 (Ministerstvo životního prostředí)

Dne 4.2.2006 bylo v Ústředním věstníku Evropské unie publikováno nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 166/2006 ze dne 18.ledna 2006, kterým se zřizuje evropský registr úniků a přenosů znečišťujících látek a kterým se mění směrnice Rady 91/689/EHS a 96/61/ES. Takzvaný Evropský PRTR (nebo E-PRTR) nahradí v současnosti fungující Evropský registr emisí znečišťujících látek (EPER). EPER byl zřízen rozhodnutím Komise 2000/479/ES.

Přijetí nařízení o E-PRTR bude mít významný dopad i na český Integrovaný registr znečišťování (IRZ). Změní se struktura IRZ, některé sledované údaje (zejména počet evidovaných látek stoupne) a okruh povinných osob. Poprvé budou povinné osoby hlásit data podle nového evropského nařízení za rok 2007 v roce 2008.

- Nové nařízení o založení Evropského registru úniků a přenosů znečišťujících látek v českém jazyce si můžete přečíst [zde](#)
- Rychlé odpovědi na otázky k IRZ Vám poskytneme publikace "100 otázek a odpovědí", kterou najdete [zde](#)
- Druhý díl Příručky pro ohlašování do IRZ je ke stažení ve formátu pdf k dispozici [zde](#).
- Pokud máte otázku k integrovanému registru znečišťování obraťte se na [helpdesk](#).
- Podívejte se na stránky [Evropského registru emisí znečišťujících látek](#).

Obr. 1. Úvodní stránka prezentace IRZ na Internetu

Tabulka I

Struktura webové stránky integrovaného registru znečišťování

Hlavní (levé) menu	Popis
O IRZ	informace o IRZ, právních předpisech a projektu IRZ
Vyhledávání v IRZ	vyhledávání v databázi IRZ
Ohlašované látky	podrobné informace o látkách obsažených v IRZ
Ohlašování	informace o ohlašovacím procesu
Dokumenty	zprávy, příručky, návody a dokumenty vztahující se k IRZ
Registry znečišťování	informace o EPER a E-PRTR
Otázky a odpovědi	strukturované odpovědi na otázky k IRZ
Důležité pojmy	definice pojmů důležitých pro oblast IRZ
Odkazy	strukturované odkazy na webové stránky
Kontakty	kontakty na MŽP, CENIA, CO, helpdesk atd
<i>Horní menu</i>	
Pro veřejnost	informace důležité pro veřejnost
Pro ohlašovatele	informace důležité pro ohlašovatele
Pro ověřovatele	informace důležité pro ověřovatele
Služby	informace o poskytovaných službách
Mapa stránek	prehledná mapa stránek

Vyhledávání v údajích ohlášených do IRZ

Nejvíce používanou funkcí na nových stránkách IRZ je vyhledávání v ohlášených údajích. Tento aspekt IRZ je pro veřejnost naprosto zásadní. Uživatelé stránek mohou získávat informace o vypouštění znečišťujících látek konkrétními podniky. Nástroj pro vyhledávání v údajích IRZ je klíčovou předností celé internetové prezentace IRZ. Na

stránkách IRZ je umožněno (prostřednictvím dotazovacího formuláře) uživateli vyhledávat podle následujících parametrů:

- druh emise nebo přenosu,
- název organizace (provozovny) nebo IČ,
- látka,
- ohlašovací rok,

Tabulka II
Přehled stránek registrů znečišťujících látek na Internetu

Země	Webová stránka
Německo	http://www.eper.de
Rakousko	http://www.umweltbundesamt.at/eper.html
Velká Británie	http://www.environment-agency.gov.uk/business/444255/446867/255244/
Itálie	http://www.eper.sinanet.apat.it/
Skotsko	http://www.sepa.org.uk/spri/index.htm
Norsko	http://www.sft.no/bmi/main/english.asp
Švédsko	http://www.naturvardsverket.se/prtr/
Finsko	http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=123863&lan=FI
Španělsko	http://www.eper-es.com/
Nizozemí	http://www.emissieregistratie.nl/
Slovensko	http://www.lifeenv.gov.sk/minis/ipkz/
Maďarsko	http://www.kvvm.hu/szakmai/eper/
Austrálie	http://www.npi.gov.au
Kanada	http://www.ec.gc.ca/pdb/npri
Spojené státy americké	http://www.epa.gov/tri/
Japonsko	http://www.env.go.jp/en/topic/prtr.html
Irsko	http://www.epa.ie/OfficeofEnvironmentalEnforcement/LicenceEnforcement/AnnualEnvironmentalReport/EuropeanPollutantEmissionRegisterEPER/

- kategorie činností podle zákona o integrované prevenci,
- NOSE-P kódů,
- OKEČ,
- lokalita – kraj nebo obec,
- pomocí mapové aplikace.

Odpovědí na dotaz je strukturovaný výpis, který umožňuje přechody mezi různými druhy informací.

Mapové služby portálu veřejné správy nabízejí mimo jiné i možnost zobrazování údajů z integrovaného registru znečišťování. Z mapových úloh lze vyčíst informace o ohlašovatelích do IRZ (organizaci/provozovně), charakteru emise nebo přenosu, ohlášené látky a množství látky ohlášené za rok 2004. Mapové služby portálu veřejné správy lze najít na <http://geportal.cenia.cz/mapmaker/cenia/portal/>.

Informace o látkách

Kromě možnosti vyhledávat v ohlášených údajích obsahují stránky IRZ další informace využitelné odbornou i širokou veřejností. Jako příklad lze uvést přehledně sestavené listy k jednotlivým látkám, které se v IRZ evidují. Ke každé látce je uvedeno:

- vzorec a číslo Chemical Abstract Service,
- ohlašovací prahy,
- chemický název a další obvykle používané názvy,
- vlastnosti dané látky,

- oblasti použití,
- zdroje emisí,
- vliv na životní prostředí,
- vliv na lidské zdraví,
- důvody zařazení do IRZ,
- věty o riziku a bezpečnosti (R a S věty).

V této souvislosti je nesporně zajímavé, že ve spolupráci s Ústavem chemie životního prostředí Vysoké školy chemicko-technologické v Praze byla v roce 2005 vypracována detailní studie o látkách v IRZ, která bude využita k dalšímu rozšíření znalostní báze webu IRZ.

Závěr

Uživatelé jistě rovněž ocení možnost stahovat velkou většinu dokumentů (příručky, letáky, právní předpisy, odborné texty, návody, zahraniční materiály) zdarma ve formátu pdf. K dispozici je i možnost kontaktovat Ministerstvo životního prostředí a objednat si publikace vydané k problematice IRZ. Dotazy, náměty či připomínky k IRZ řeší služba helpdesk.

Zveřejnění údajů z IRZ bylo přelomovým okamžikem pro přístup veřejnosti k informacím o znečišťování životního prostředí. Návštěvnost webových stránek www.irz.cz je velmi vysoká a indikuje, že úsilí MŽP vložené do celé první fáze implementace IRZ mělo význam. Technická úroveň internetové prezentace IRZ je i ve srovnání s prezentacemi zahraničních registrů (viz tabulka II) na výborné úrovni a poskytuje vyčerpávající množství informací.

PŘESTOUPÍ IF CHEMICKÝCH LISTŮ MAGICKOU HRANICI 0,5?

RENÉ KIZEK

*Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
kizek@sci.muni.cz*

Tak jako většina lidí, kteří se pohybují v oblasti výzkumu, sledují změny impaktových faktorů („burzovního listku“) časopisů, a rozhodují se, kam pošlu výsledek svého, většinou, několikaletého intenzivního snažení. Když byly v polovině června tohoto roku zveřejněny impaktové faktory za rok 2005, směřovala moje pozornost také na časopis Chemické listy. Měl jsem opravdu velkou radost, že se redaktorům tohoto časopisu nejen daří udržet hodnotu impaktového faktoru, ale dokonce každým rokem tento faktor vzrůstá.

Podle Web of Science¹ bylo v letech 2003 a 2004 publikováno v Chemických listech celkem 164 článků, které byly zahrnuty do výpočtu impaktového faktoru. Tyto články byly 73× citovány v jiných člancích, z toho kolem 40 % tvoří citace v člancích uveřejněných v Chemických listech a 60 % citace v jiných časopisech. Velmi potěšitelným faktem je, že právě autoři Chemických listů se na svoje práce odkazují i v jiných časopisech. Díky tomu se na Chemické listy a také na práce v nich uveřejněné upozorní a jsou citovány i dalšími cizími autory.

Impaktový faktor Chemických listů dosáhl za rok 2005 hodnoty **0,445**, což je nárůst o 22 % v porovnání s rokem 2004 (viz²). Toto razantní zvýšení je překvapivé, protože za rok 2003 měl IF hodnotu 0,345 a za rok 2004 0,348. Zdálo se tedy, že se blíží limita někde okolo 0,35.

Nyní se však na dosah magická hodnota 0,5. Ta by se mohla podařit, pokud se všichni autoři Chemických listů budou odkazovat na Chemické listy i jinde. Je sice velmi nepravděpodobné, že v Chemických listech budou zveřejňovány nejlepší práce českých a slovenských autorů, ale zcela jistě zde mohou být diskutovány právě nové výsledky a výzkumné trendy pro širší odbornou veřejnost. Velmi zajímavou možností jsou i speciální čísla připravená vyzvaným editorem. Takovým báječným příkladem je proteomické číslo³.

Nezbývá než popřát Chemickým listům mnoho štěstí pro překročení magické hranice IF 0,5.

LITERATURA

1. Kizek R., Adam V.: Chem. Listy 100, 290 (2006).
2. Kizek R.: Chem. Listy 99, 615 (2005).
3. Chmelik J.: Chem. Listy 99, 883 (2005).

R. Kizek (*Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Will the Impact Factor of the Chemické Listy Exceed the Magic Limit of 0.5 ?**

In years 2003 and 2004, altogether 164 articles were published in Chemické Listy. The impact factor of the journal reached the value 0.445 in 2005, which is a 22% increase in comparison with 2004. Possible changes in the impact factor in the near future are discussed.

Vážení přispěvatelé do našeho časopisu, dovoluujeme si Vás upozornit na důležitou změnu v Instrukcích pro autory, která se týká souhrnů. Od této chvíle přijímáme pouze příspěvky, které jsou opatřeny podrobnějším, *strukturovaným* anglickým souhrnem. Požadavky na tento souhrn, jeho struktura a rozsah jsou uvedeny na obvyklé adrese:
<http://chemicke-listy.vscht.cz/cz/index.html>, kapitola 6.

Ze života společnosti

Jan Kučera nositelem George Hevesy Medal Award 2006

Medaili George Hevesyho* jako současné nejvyšší mezinárodní ocenění vynikajících výsledků dosažených v jaderné analytické chemii a jaderné chemii získal letos, z devíti nominovaných kandidátů, český jaderný chemik docent Ing. Jan Kučera, CSc., vedoucí vědecký pracovník Ústavu jaderné fyziky AV ČR v Řeži. Vyznamenání bylo založeno a je sponzorováno časopisem *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* v roce 1968, kdy bylo poprvé uděleno za mimořádné zásluhy o rozvoj aktivizační analýzy a radiochemických separačních metod americkému profesoru W. Wayne Meinkemu. Během takřka čtyř desítek let od jeho prvního udělení se stal kolega Kučera v pořadí jeho 28. nositelem. Výběr z nominovaných kandidátů provádí International Committee on Activation Analysis/Modern Trends in Activation Analysis (ICAA/MTAA). Medaili a diplom za mimořádný příspěvek k rozvoji v oblasti radioanalytické a jaderné chemie převzal Jan Kučera 4. dubna t.r. z rukou prezidenta ICAA/MTAA profesora A. Chatta (Dalhousie University) při zahájení 7th International Conference on Methods and Applications of Radioanalytical Chemistry (MARC VII) v Kailua-Kona na Havaji.

Doc. Jan Kučera je žákem české jaderné chemické školy založené a vybudované na Fakultě jaderné a fyzikálně inženýrské (FJFI) ČVUT profesorem Vladimírem Majerem**, kde po studiu jaderné chemie působil do nástupu základní vojenské služby jako asistent na katedře jaderné chemie. Poté od roku 1971 se v laboratoři Československého uranového průmyslu v Příbrami věnoval stanovení uranu, thoria a dalších prvků v rudách a dalších materiálech metodou instrumentální neutronové aktivizační analýzy (INAA). V roce 1973 nastoupil do oddělení aktivizační analýzy v Ústavu jaderného výzkumu (ÚJV) Československé komise pro atomovou energii v Řeži, které v letech 1977 až 1993 vedl. V privatizovaném ÚJV došlo k podstatnému omezení jaderné chemického výzkumu, což vedlo k odchodu této skupiny do Českého ekologického ústavu, který však zanedlouho skupina byla nucena opustit (podle mne ke škodě tohoto ústavu). Skupina NAA byla díky věcnému rozhodnutí Ústavu jaderné fyziky AV ČR v Řeži od roku 1994 zařazena v oddělení jaderné spektroskopie, kde úspěšně působí dosud. Zařazení tohoto týmu, aplikujícího v instrumentálních metodických variantách poznatky a metody jaderné spektroskopie, právě do tohoto oddělení



Prof. Amares Chatt (vpravo) předává Medaili G. Hevesyho Janu Kučerovi

svědčí o jeho organickém začlenění. Není asi náhodou, že před čtyřmi desítkami let v tomto oddělení byly zahájeny první kroky na metodickém vývoji tehdy nové metody INAA na bázi Ge(Li) detektorů záření gama.

Po příchodu do ÚJV se Jan Kučera soustředil na výzkum a vývoj metodických variant reaktorové neutronové aktivizační analýzy (INAA, ENAA, RNAA) s cílem optimalizovat stanovení prvků zvláště ve stopových a ultrastopových koncentracích v matricích z oblasti biologie, medicíny a životního prostředí. Jeho radiochemické separační postupy se vyznačují, ve srovnání s většinou dříve publikovaných postupů, vysokou selektivitou, vysokými chemickými (stanovenými) výtěžky a jsou rovněž operačně jednodušší a rychlejší, což kromě elegance umožňuje jejich využití i při analytických aplikacích krátkodobých radionuklidů. Mezi těmito postupy ke stanovení řady esenciálních a toxických prvků nacházíme i metody ke stanovení stopových a ultrastopových koncentrací řady těch prvků, jejichž stanovení jinými analytickými metodami je nesnadné, jako např. F, Si, V, I, Re, Pt a Tl.

Tyto práce umožnily řešení řady projektů v oblastech medicíny, toxikologie a životního prostředí. Nelze nepřipomenout rovněž jeho aktivní účast při certifikaci a přípravě řady referenčních materiálů prvkového složení v řadě národních a mezinárodních institucí, např. US NIST, IAEA, EC IRMM aj. Kromě uvedené účasti v certifikačních procesech, jeho nález odchylek v hodnotách koncentrací manganu a vanadu v NIST SRM-1648 Urban Particulate Matter vedl k recertifikaci obsahu těchto

* G. Hevesy (1885–1966) nositel Nobelovy ceny za chemii (1943), jaderný chemik^{1–3}.

** Prof. Ing. Dr. Vladimír Majer, DrSc. (1903–1998) po úspěšné dráze v oblasti mikrochemie a polarografie se po krátkém pobytu u prof. G. Hevesyho v Bohrově Ústavu teoretické fyziky v Kodani v roce 1937 soustředil na radiochemii a jadernou chemii⁴.

prvků užitím jeho stanovených hodnot, což svědčí o prestiži laboratoře. Je autorem více než 140 recenzovaných publikací a 7 kapitol v monografiích, výzkumných zpráv a četných přednášek na domácích a mezinárodních vědeckých konferencích. Je členem Spektroskopické společnosti J. M. Marci, kde vede komisi referenčních materiálů a standardů a American Society for Testing and Materials – Task Group on Nuclear Methods of Chemical Analysis. Za zásluhy o rozvoj jaderných analytických metod mu Spektroskopická společnost J. M. Marci udělila v roce 2002 *Medaili Jana Marka Marci z Kronlandu* a jeho pedagogickou činnost ocenila FJFI ČVUT v Praze udělením *Stříbrné medaile FJFI*.

V oblasti pedagogické působí docent Kučera na FJFI ČVUT v Praze řadu let, přednáší, vede diplomanty a doktorandy, je členem komisí pro obhajoby diplomových prací a dizertací v oboru jaderné chemie. Na této fakultě se v roce 2003 habilitoval prací Radiochemická separace v neutronové aktivační analýze biologických materiálů. Na pracovišti v Ústavu jaderné fyziky AV ČR v Řeži se věnu-

je dalšímu vzdělávání odborníků z rozvojových zemí v NAA a RNAA vyslaných IAEA. Jako expert IAEA přispěl k rozvoji radioanalytických pracovišť např. v Alžíru, Koreji, Tunisu, Lybii, Syrii, Etiopii, Bangladeši aj.

Při blahopřání kolegovi Janu Kučerovi k významnému mezinárodnímu ocenění jeho cílevědomé profesionální aktivity v oblasti jaderné chemie a radioanalýzy nemohu opomenout jeho úspěch v úsilí o zachování týmu aktivační analýzy v letech 1992 až 1994, kdy řada našich odborně zdatných radioanalytických pracovišť zanikla.

Miloslav Vobecký

LITERATURA

1. Majer V.: Chem. Listy 69, 893 (1975).
2. Vobecký M.: Radiochem. Radioanal. Lett. 21, 7 (1975).
3. Vobecký M.: Čs. čas. fyz., A34, 535 (1984).
4. Cabicar J.: Chem. Listy 67, 328 (1973).

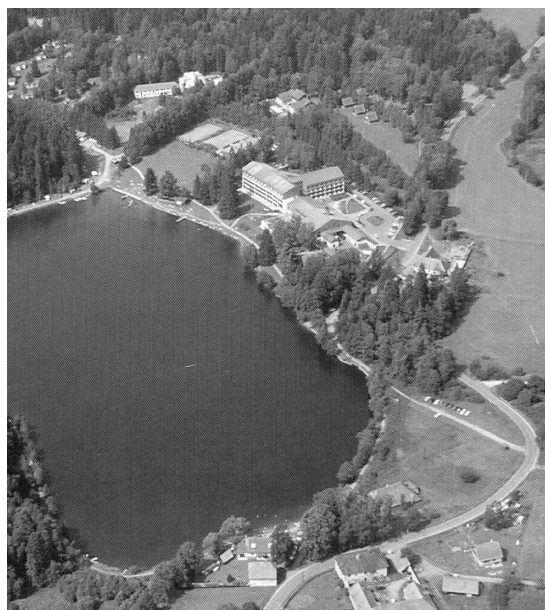
Odborná setkání

Konference APROCHEM 2006

Letošní již 15. konference aplikované a procesní chemie APROCHEM'06 přinesla hned několik novinek. Byla sice uspořádána na již tradičním místě v Hotelu „Devět skal“ Milovy-Sněžné, ale v novém jarním termínu od 24. do 26. dubna 2006, kdy se nekoná tolik odborných akcí. To se projevilo tím, že ačkoliv od předcházející konference uplynulo jen půl roku, sjel se na Vysočinu možná rekordní počet účastníků za poslední roky, kteří referovali o aktualitách z petrochemie, organické, anorganické a palivářské technologie, o rozvoji chemického průmyslu, technologii zpracování plynu a polymerů. Přednášky byly dále věnovány procesnímu inženýrství, chemické legislativě, bezpečnosti v chemii a otázkám ochrany prostředí.

V letošním roce byly dále s podporou Svazu chemického průmyslu ČR poprvé oceněny pěkné přednášky, prezentované mladými účastníky konference. Ocenění byli:

1. Ing. David Kubička, PhD., VÚANCH Ústí n.L., pracoviště Litvínov (*Katalytické přeměny naftenu v ropných frakcích*)
2. Ing. Jiří Kopečný, PhD., Environ Praha, (*Metatéze olefinů*)
3. Ing. Jana Kredatusová, VŠCHT Praha, (*Využití exfoliované adsorpce pro přípravu nanokompozitů*)



Na konferenci Aprocchem také poprvé navázalo 1. Symposium „Odpadové fórum 2006“, uskutečněné na stejném místě ve dnech 26.–27.4.2006. Předpokládá se, že příští, 16. Konference Aprocchem bude v dubnu 2007.

Jaromír Lederer, předseda ČSPCH



28. Mezinárodní slovenský a český kalorimetrický seminář 2006

Ve dnech 22. – 26.5. 2006 pořádaly Společná laboratoř chemie pevných látek Univerzity Pardubice a ÚMCH AV ČR, Katedra obecné a anorganické chemie Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice a Odborná skupina chemické termodynamiky ČSCH společně s Ústavem ekologie lesa SAV ve Zvolenu 28. Mezinárodní slovenský a český kalorimetrický seminář.

Toto setkání pracovníků z oboru termické analýzy a kalorimetrie se letos konalo na Slovensku v horském hotelu Poľana u Hriňové, v překrásném prostředí Chráněné krajinné oblasti Poľana, která byla UNESCO vyhlášena biosférickou rezervací.

Organizační výbor (Ing. E. Černošková, CSc., SLCHPL; doc. Ing. Z. Černošek, CSc., doc. RNDr. J. Holubová, Ph.D., KOAnCh FCHT; prof. Ing. Jindřich Leitner, DrSc., Ing. Vladimír Pekárek, CSc., OSChT ČSCH; Ing. M. Kuklová, CSc., Ing. J. Kukla, CSc., ÚEL SAV Zvolen) připravil setkání 70 odborníků nejen z vysokých škol a ústavů akademie věd, ale také např. z elektřinářských a důlních společností. Samozřejmostí je i účast zástupců firem nabízejících potřebnou experimentální techniku.

Pětidenní jednání bylo rozděleno do tematických okruhů: termodynamika a termická analýza, biologické materiály, nekrytalické materiály a stavební materiály. Protože spolupředatelem semináře byl Ústav ekologie lesa SAV ze Zvolena, byl seminář zahájen velmi zajímavou plenární přednáškou „Lesní ekosystémy Vysokých Tater versus člověk“.

V následující odborné části bylo předneseno 48 přednášek, jejichž společným jmenovatelem bylo využití nejrůznějších kalorimetrických, termomechanických a termoelektrických metod v celé řadě vědních a technických oborů. Témata přednášek se pohybovala od termických vlastností skel a kinetiky krystalizace podchlazených tavenin přes tepelné vlastnosti stavebních materiálů až po akumulaci energie v rostlinách a tepelné bilance hospodářských zvířat. Přednášky doplnili zástupci předních světových firem v oboru kalorimetrie představením a ukázkami nejnovejších přístrojů a technik.

Semináře se v nemalé míře aktivně účastní i studenti doktorských studijních programů. Velkým přínosem pro všechny účastníky je bohatá neformální diskuse po celou dobu semináře.

Kolegové z Ústavu ekologie lesa SAV zajistili pro účastníky prohlídku Zvolenského zámku s nádhernou kolekcí gotického a renesančního umění.

Příští rok se 29. Mezinárodní český a slovenský kalorimetrický seminář bude konat v Liblicích u Prahy.

za kolektiv autorů Eva Černošková
SLCHPL ÚMCH AVČR a Univerzity Pardubice



ACHEMA 2006

ACHEMA 2006, největší mezinárodní akce v oblasti chemického inženýrství, ochrany životního prostředí a biotechnologií, konaná ve Frankfurtu nad Mohanem byla jedním velkým úspěchem jak pro vystavovatele, tak pro obecnost. Zástupci nejrůznějších oblastí průmyslu vyjádřili uspokojení nad výtečnou kvalitou diskusních setkání a kontaktů na výstavě samé i v rámci přidružených akcí a aktivit. Od samého zahájení bylo zřejmé, že vystavovatelé i návštěvníci budou schopni navázat nové a účinné obchodní kontakty a zúčastnit se mnoha diskusí a přednášek k jejich plnému uspokojení.

ACHEMA 2006 byla letos opět větší a mezinárodnější, než předchozí výstavy. Více než 3880 vystavovatelů z 50 zemí letos přispělo k překonání rekordu z roku 2003 (3819 vystavovatelů ze 48 zemí). Vystavovatelé předvedli velmi rozsáhlý soubor řešení, vybavení, technologické expertízy a služeb pro chemický, petrochemický, farmaceutický a potravinářský průmysl a příbuzné sektory materiálového inženýrství na 135,514 m² čisté výstavní plochy od 15. do 19. května 2006.

Přes 180 000 profesionálů z 98 zemí našlo na výstavě ACHEMA opět více informací o nejnovějším vývoji a trendech v oblasti svého zájmu. Jak naznačil Alfred Oberholz, předseda pořadající společnosti DECHEMA, je mezinárodní význam výstavy a přidružených symposií a akcí naprosto výjimečný. Po letech byla Achema pořádána v situaci expandující ekonomiky, což se projevilo i na jejím ekonomickém úspěchu. Účastníci oceňovali zejména možnost přímých diskusí a kvalifikovaných setkání. Lehce nižší počet účastníků než posledně (-4,4 %) neznamenal problém, protože zejména zahraniční účastníci se zúčastni-



Foto: Dechema / Helmut Stettin

li akcí mnohem déle než v roce 2003. Pozoruhodné je, že často bylo více než 50 % kontaktů v rámci akce na „mezinárodní“ úrovni. Změna byla i v tom (a všichni to přijali s povděkem), že výstava nebyla již otevřena v sobotu. Výstavu sledovalo 632 akreditovaných novinářů.

Z analýzy názorů účastníků vyplynulo, že poprvé bylo na výstavě 30 % návštěvníků ze zemí mimo Německa, což představovalo nárůst o 8 %, ve srovnání s rokem 2003. Zahraničním delegacím vévodily početné skupiny z Japonska, Indie, Číny a středního Východu.

Také počet zahraničních vystavovatelů se změnil (44,4 % pro tento rok ve srovnání s 37,7 % v roce 2000 a 40,9 % v roce 2003). Celkově počet zapojených firem stoupl o 50 %. Gerhard Kreysa, ředitel společnosti DE-CHEMA, která ACHEMU organizovala, prohlásil doslova: „ACHEMA vstoupila na novou úroveň a zpevnila svoji pověst přední světové výstavy pro celý procesní průmysl“. Českou republiku reprezentovalo 20 vystavovatelů (17 v roce 2003 a 18 v roce 2000), což podalo jen kusý pohled na českou chemii, technologie a chemické inženýrství. Hlavní zástupci těchto odvětví na výstavě citelně chyběli. Koordinaci české části výstavy a propagaci ČR napomáhali pracovníci MPO ČR a Svazu chemického průmyslu, kteří měli společný stánek.

Největší počet vystavovatelů přišlo z Německa (2157), Itálie (266 vystavovatelů), Velké Británie (204 vystavovatelů), Švýcarska (177 vystavovatelů), USA (173 vystavovatelů), Francie (137 vystavovatelů) a Holandska (104 vystavovatelů). Asijský region byl také mocně posílen (Čína +185 %, Jižní Korea +143 % a Indie +61 %).

Na mezinárodním Kongresu ACHEMA zaznělo 925 příspěvků, čímž byl opět ustaven další rekord akce. Většina příspěvků byla v angličtině, mezinárodní *lingua franca* chemiků a inženýrů. Hlavními tématy byly technologie mikroprocesorů, nanotechnologie, procesní automatizace, paliva z biomasy, membránové technologie, technologie vody, materiály pro palivové články, nové procesní technologie se „zelenými rozpouštědly“ a pod.

Příští setkání série, ACHEMA 2009, „29. International Exhibition-Congress on Chemical Engineering, Environmental Protection and Biotechnology“, se koná opět ve Frankfurtu nad Mohanem v termínu 11. – 15. května 2009.

Materiály z výstavy a kongresu jsou k dispozici v sekretariátu ČSCH.

Pavel Drašar a Zdeněk Bělohlav

VI. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků



SIGMA-ALDRICH

Sedm let není mnoho, ale je to hodně tam, kde o něco jde. Když se zrodil v hlavě vedení pražské centrály firmy Sigma Aldrich nápad spojit „příjemné s užitečným“, shromáždit výběr mladých talentovaných vědců z oborů chemie, biologie, biomedicína atd. a propagovat mezi nejširší veřejností produkci a služby firmy, nikdo netušil, jak významná akce bude iniciována. Akce je dnes známa všem odborníkům v zemi a slouží jim k jejich spokojenosti a k užítku věci. Společnost Sigma-Aldrich se prezentuje na veřejnosti nejen jako obchodník; pracovníci firmy učí, přednáší, píše odborné články atd. atd., a co víc, již šest let organizují toto setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků pracovním zvaném „Amerika“, podle jednoho z prvních míst konání, hotelu „Amerika“ nedaleko Velkého Meziříčí.

Amerika se za 6 svých pokračování stala prestižním setkáním toho nejlepšího, co mohou kolegové z nejmladší úspěšné skupiny přírodovědců nabídnout. Stala se prestižní kvůli výběru účastníků, kvůli úsilí, které účastníci i organizátoři věnují uspořádání a průběhu akce, ale i společenské reflexi.

Když mi před nedávnem na schůzi v Bruselu vážení kolegové ze západnějších krajín doporučovali, ať i u nás uspořádáme konferenci mladých chemiků, mohl jsem odpovědět, že takové pořádáme již téměř třicet let, že byly velmi úspěšné a že jim jejich konání mohou doporučit též. Když jsem ale doplnil, že pražská společnost Sigma Aldrich již šest let pořádá spolu s Českou společností chemickou a Českou společností pro biochemii a molekulární biologii takovou akci s výběrem účastníků z několikanásobku přihlášených, akce má sborník otištěný v „impaktovaném“ časopise a nejlepší účastníci jsou vybráni porotou a odměněni firmou SA grantem, na místní poměry, v kulantní výši (2 x 50 tis. Kč), akci osobně podporuje předseda České akademie věd, dalších doporučení ze strany zkušenějších kolegů jsem se už nedočkal.

Snad mohu na závěr vyjádřit skromné přání, aby organizátorům vydržel dech i zdroje a aby se tato akce, která obtížně najde obdoby svou kvalitou i ve světě, pokračovala dále v neztenčené míře. Přeji také všem zúčastněným mladým kolegům hodně úspěchů v jejich vědecké práci, která je zjevně jejich koníčkem. Těm, kteří mají ještě větší kuráž, opakují své doporučení, aby se přihlásili i do soutěže o cenu Alfreda Badera či Josefa Košťíře, prestižní ceny udělované ČSCH a ČSBMB.

*Pavel Drašar,
místopředseda České společnosti chemické*

Akce v ČR a v zahraničí

rubriku kompiluje Lukáš Drašar, drasarl@centrum.cz

Rubrika nabyla takového rozsahu, že ji není možno publikovat v klasické tištěné podobě. Je k dispozici na webu na URL <http://www.konference.wz.cz/> a <http://www.csch.cz/akce9909.htm>. Pokud má některý čtenář

potíže s vyhledáváním na webu, může se o pomoc obrátit na sekretariát ČSCH. Tato rubrika nabyla již tak významného rozsahu, že ji po dohodě přebírají i některé zahraniční chemické společnosti.

Zprávy

Projekt Spolana Dioxiny – ve Spolaně začala sanace

Zástupci společností zodpovědných za projekt Spolana Dioxiny, SITA CZ a.s. (původně SITA Bohemia a.s.) se svým technickým partnerem, společností BCD CZ, a.s. oznámili, že sanace nejvíce kontaminovaných částí Spolany, konkrétně se jedná o budovy A1420 a A1030 a přilehlé zeminy, byla dne 11.5.2006 zahájena.

Během tiskové konference a návštěvy areálu 24. ledna tohoto roku, které se zúčastnil i premiér Jiří Paroubek, zástupci společností zodpovědných za tento projekt podrobně seznámili všechny přítomné s jednotlivými fázemi projektu.

Grahame Hamilton, ředitel společnosti BCD CZ a.s. u příležitosti lednového „press briefing“ řekl: „Provoz BCD ve Spolaně je největším budovaným projektem svého druhu ve světě. Od chvíle, kdy jsme získali zakázku na odstranění staré ekologické zátěže, jsme provedli řadu náročných testů v rámci pilotního projektu, který byl realizován během roku 2003. Budování infrastruktury v areálu závodu a dodávka příslušného technologického zařízení začala již v létě 2005. Nyní, když je instalace zařízení dokončena, testujeme vybavení tak, abychom dekontaminační fázi mohli spustit v květnu letošního roku.“

K sanaci se vyjádřil rovněž pan Jean-Louis Chausse, generální ředitel společnosti SUEZ Environment, která je mateřskou společností firmy SITA CZ, a.s.: „Projekt Spolana Dioxiny řadí Českou republiku jako evropský příklad v oboru sanačních prací. Podobně jako mnohé evropské země, Česká republika čelí obrovskému problému likvidace odkazu těžkého průmyslu. Zvláště kontaminovaná zemina, která byla zanechána v původním stavu, znamená dlouhodobě hrozbu pro životní prostředí a ohrožuje zdraví těch, kteří žijí a pracují v její blízkosti. Tento projekt je pro nás důležitým projektem a současně výzvou, protože během 18 měsíců budeme upravovat 35 000 tun odpadu. Začátek tohoto procesu znamená zároveň začátek celé nové éry.“

První etapa – výstavba a instalace zařízení – byla ukončena začátkem února tohoto roku a poté následovalo správní řízení k získání rozhodnutí MěÚ Neratovice – stavebního úřadu o prozatímním užívání stavby ke zkušebnímu provozu.

V rámci zkušebního provozu bylo během března a dubna tohoto roku prozkoušeno celé zařízení s nekontaminovaným materiálem takovým způsobem, aby mohl být zahájen technologický proces dekontaminace – odstranění nebezpečného odpadu (vlastní sanace).

Samotná sanace proběhne ve dvou fázích. V první fázi budou pomocí průmyslových vysavačů a hydraulických nástrojů odstraněny vnitřky budovy společně s omítkami a prachem. Během těchto prací bude zapečetěná budova sloužit jako dodatečná bariéra proti úniku prachu. Teprve po odstranění vysoce kontaminovaných materiálů bude přistoupeno ke druhé fázi sanace, která bude zahrnovat demolici budov.

Celý provoz tohoto projektu je dokonale zabezpečen proti negativnímu dopadu na okolní životní prostředí. Po celou dobu realizace budou detailně monitorovány jednotlivé složky životního prostředí: ovzduší, odpady, voda a také hluk.

Všechny výstupy z technologických zařízení budou pečlivě kontrolovány tak, aby splnily veškeré požadavky legislativy a platných rozhodnutí z veřejnoprávních řízení. Na průběh realizace projektu bude rovněž dohlížet Městský úřad Neratovice, Krajský úřad Středočeského kraje a orgány státní správy (KHS, ČIŽP, IBP).

Hodnoty koncentrace kontaminace zjištěné v areálu Spolany patří k nejvyšším hodnotám, které kdy byly ve světě naměřeny v lokalitách, kde probíhá sanace oblastí zasažených dioxiny. Celý sanační projekt bude dokončen v prosinci 2007. Celkem bude zpracováno více než 35 000 tun vysoce kontaminovaného materiálu (PCDD/F a OCP znečištění) tak, aby úroveň kontaminace nepřesahovala hodnoty určené Krajským úřadem Středočeského kraje (např. 0,2 nanogramů na gram PCDD/F pro zeminy). Mezi zpracovávané materiály se řadí zbytky odpadů a produkty z dřívější výroby, původní výrobní závod a vybavení, objekt budovy provozu a více než 23 000 tun zeminy (očekává se, že tento odpad bude obsahovat zdivo, chemikálie, kovové části kontaminovaného závodu, prach a zeminu).

Během celého procesu sanace bude samozřejmě na prvním místě ochrana zdraví a dodržování bezpečnosti. Veškeré demoliční práce, převoz vybavení a odpadu, drčení materiálu a výkop zeminy budou prováděny v oddělené budově s podtlakovými systémy, které zabrání rozšíření kontaminace do přilehlých území areálu a obytných čtvrtí v této oblasti. V době nejintenzivnější práce bude v procesu zaměstnáno přes 160 lidí a to v nepřetržitém provozu, který zajistí nepřetržitě fungování technologických celků.

Díky této sanaci se Spolana zbaví jednoho ze zbytků ze své ničivé minulosti a nastoupí cestu čistější a zdravější budoucnosti.

Ing. Petra Sokoloff
SITA CZ a.s.
Španělská 10/1073
120 00 Praha 2
Tel: +420 222 922 611
petra.sokoloff@bedcz.cz



Merck spol. s r. o. slaví 15. výročí

Merck spol. s r. o., přední chemická a farmaceutická společnost v České republice, letos slaví patnáct let od svého založení.

Merck spol. s r. o. byla založena v roce 1991 jako dceřiná společnost firmy Merck KGaA se sídlem v německém Darmstadtu. Byla tak zároveň jednou z prvních zahraničních firem u nás. Firma má vedoucí postavení ve všech oblastech trhu, kam dodává své výrobky a služby, a to jak v segmentu farmaceutických, tak laboratorních produktů. „Naše produkty zvyšují kvalitu života,“ říká generální ředitel společnosti Dr. Claus-Dieter Bodecker. „Každá plochá obrazovka nebo podobné elektronické zařízení využívá naše tekuté krystaly, každá vědecká anebo analytická laboratoř používá naše přípravky. Merck má silné postavení v oblasti vývoje léčiv pro léčbu diabetes, kardiovaskulárních a onkologických onemocnění.“ Na dotaz ohledně hlavních oblastí zaměření firmy reaguje Bodecker jasně: „Orientace na zákazníka, orientace na zaměstnance a orientace na výsledky.“ Merck spol. s r. o. přispívá k rozvoji české společnosti nabídkou nejen

kvalitních produktů a služeb, ale také stabilních pracovních míst v rámci rozvíjející se organizace.

Firma např. v úzké spolupráci s Českou společností chemickou každoročně organizuje Soutěž o cenu firmy Merck, která oceňuje výjimečné práce nejnadanějších českých studentů v oboru analytické chemie.

V souvislosti s oslavou 15 let působení na českém trhu firma zvolila maskota výročí, kterým bude malý lvíček. Je nejen charakteristickým českým symbolem, ale představuje též hodnoty jako síla, sebevědomí a stabilita. A tak jako se ze lvíčete postupně stane lev, stejně roste i firma Merck spol. s r. o.

Merck spol. s r. o.

Ing. Hana Musilova

Tel: +420 323 619 242, +420 737 273 974

hana.musilova@merck.cz

Mmd Public Relations Czech Republic

Tomáš Fiala

Tel.: +420 224 251 555

fiala@mmd.cz

Noví členové ČSCH

Adam Vojtěch, studující PřF MU Brno

Baloun Jiří, studující Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity Brno

Blašík Ondřej, studující Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity Brno

Blahožová Hana, Technická univerzita – VŠB Ostrava

Daňhel Aleš, studující PřF UK Praha

Drábová Lucie, Ing., VŠCHT Praha

Dvořák Lukáš, studující PřF UP Olomouc

Čapek Libor, Ing., Ph.D., Univerzita Pardubice

Fryzková Michaela, Mgr., studující PedF UK Praha

Honziček Jiří, Ing., studující VŠCHT Praha

Hromas Josef, Ing., AROMA Praha a.s.

Chaloupková Radka, Mgr., studující PřF MU Brno

Jech Martin, Mgr., studující VŠCHT Praha

Ježková Veronika, studující UTB Zlín

Jurášek Michal, studující VŠCHT Praha

Knob Radim, studující PřF UP Olomouc

Kraus Lukáš, Ing., studující Technická univerzita – VŠB Ostrava

Lacina Ondřej, Ing., VŠCHT Praha

Laciok Aleš, Mgr., Ústav jaderného výzkumu Řež

Lamač Martin, Mgr., studující PřF UK Praha

Lána Radim, Ing., studující VUT Brno

Lang Kamil, Ing., Ústav anorganické chemie AV ČR Řež

Mařarová Miroslava, RNDr., PřF UP Olomouc

Matějka Vlastimil, Ing., Ph.D., Technická univerzita – VŠB Ostrava

Mrkvička Vladimír, Ing., Ph.D., UTB Zlín

Opluštil Stanislav, Bc., PřF UP Olomouc

Peleška Jan, studující VUT Brno

Pisková Dana, Mgr., studující PřF UK Praha

Pišťková Helena, Ing., Milevsko

Robešová Lada, Ing., Ph.D., Univerzita Pardubice

Schůrek Jakub, Ing., studující VŠCHT Praha

Soukupová Jana, Mgr., PřF UP Olomouc

Srna Václav, Ing., AROMA a.s. Praha

Stejskal David MUDr., CSc., nemocnice Šternberk

Svobodová Alena, Ing., Ústav lék. chemie a biochemie LF UP Olomouc

Šimáček Adam, studující PřF UP Olomouc

Štěpánková Kamila, studující PřF UP Olomouc

Šupálková Veronika, Ing., studující Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity Brno

Ungrmanová Lenka, Ing., MERCK, spol. s r. o. Říčany

Urválková Eva, Bc., PřF UK Praha

Václavík Lukáš, Ing., studující VŠCHT Praha

Valenta Petr, studující VŠCHT Praha

Válek Lukáš Ing., studující Univerzity Pardubice

Víteček Jan, Mgr., studující Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity Brno

Vlasák František, studující VŠCHT Praha

Vopička Ondřej, studující VŠCHT Praha

Vyskočil Vlastimil, Mgr., studující PřF UK Praha

Zdařilová Adéla, Ing., Ústav lék. chemie a biochemie LF UP Olomouc

Zítka Ondřej, studující PřF MU Brno

Členská oznámení a služby

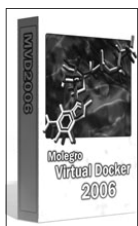
Docenti jmenovaní od 1.11.2005 do 4.5.2006

- Doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.
pro obor analytická chemie, UP Olomouc
- Doc. RNDr. Svatopluk Civiš, CSc.
pro obor analytická chemie, UK Praha/AV ČR
- Doc. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.
pro obor analytická chemie, UK Praha
- Doc. RNDr. Petr Hodek, CSc.
pro obor biochemie, UK Praha
- Doc. Ing. Marie Hrušková, CSc.
pro obor technologie potravin, VŠCHT Praha
- Doc. Ing. Luděk Joska, CSc.
pro obor metalurgie, VŠCHT Praha
- Doc. RNDr. Hana Kulveitová, Ph.D.
pro obor chemická metalurgie, VŠB-TU Ostrava
- Doc. Ing. Vladimír Majer, CSc.
pro obor fyzikální chemie, VŠCHT Praha/Francie
- Doc. Ing. Petr Němec, Ph.D.
pro obor anorganická chemie, Univerzita Pardubice
- Doc. RNDr. František Novák, CSc.
pro obor biochemie, UK Praha
- Doc. Ing. Martin Obadal, Ph.D.
pro obor technologie makromolekulárních látek, UTB Zlín
- Doc. Ing. Lucie Obalová, Ph.D.
pro obor chemická metalurgie, VŠB-TU Ostrava
- Doc. Dr. Dipl.-Min. Willi Pabst
pro obor chemie a technologie anorganických materiálů, VŠCHT Praha
- Doc. Dr. Ing. Jan Poustka
pro obor chemie a analýza potravin, VŠCHT Praha
- Doc. MUDr. Martina Řezáčová, Ph.D.
pro obor lékařská chemie a biochemie, UK Praha
- Doc. Ing. Petr Sysel, CSc.
pro obor makromolekulární chemie, VŠCHT Praha
- Doc. Ing. Dr. Jaromír Vinklárek
pro obor anorganická chemie, Univerzita Pardubice
- Doc. Mgr. Jitka Vostálová, Ph.D.
pro obor lékařská chemie a biochemie, UP Olomouc
- Doc. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D.
pro obor fyzikální chemie, UP Olomouc

Profesoři jmenovaní s účinností od 2. května 2006

- Prof. Ing. Jana Dobrovská, CSc.
pro obor chemická metalurgie, na návrh Vědecké rady Vysoké školy báňské – Technické univerzity Ostrava
- Prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc.
pro obor biochemie, na návrh Vědecké rady Vysoké školy chemicko-technologické v Praze
- Prof. Ing. Radim Hrdina, CSc.
pro obor technologie organických látek, na návrh Vědecké rady Univerzity Pardubice
- Prof. MUDr. Antonín Jabor, CSc.
pro obor lékařská chemie a biochemie, na návrh Vědecké rady Univerzity Karlovy v Praze
- Prof. RNDr. Martin Katora, CSc.
pro obor organická chemie, na návrh Vědecké rady Univerzity Karlovy v Praze
- Prof. Ing. Pavel Lhoták, CSc.
pro obor organická chemie, na návrh Vědecké rady Vysoké školy chemicko-technologické v Praze
- Prof. Dr. Ing. Martina Macková
pro obor mikrobiologie, na návrh Vědecké rady Vysoké školy chemicko-technologické v Praze
- Prof. RNDr. Robert Ponec, DrSc.
pro obor organická chemie, na návrh Vědecké rady Univerzity Karlovy v Praze
- Prof. MUDr. Richard Průša, CSc.
pro obor lékařská chemie a biochemie, na návrh Vědecké rady Univerzity Karlovy v Praze
- Prof. RNDr. Jiří Příhoda, CSc.
pro obor anorganická chemie, na návrh Vědecké rady Univerzity Palackého v Olomouci
- Prof. RNDr. Antonín Vlček, CSc.
pro obor anorganická chemie, na návrh Vědecké rady Univerzity Karlovy v Praze
- Prof. RNDr. Petr Voňka, CSc.
pro obor fyzikální chemie, na návrh Vědecké rady Vysoké školy chemicko-technologické v Praze

Bulletin představuje



Molegro Virtual Docker

Společnost Molegro (Aarhus, Dánsko) vydala v květnu t.r. nový programový balík „Molegro Virtual Docker 2006“, integrovaný systém pro predikování interakcí mezi proteinem a ligandem. Molegro Virtual Docker zvažuje všechny aspekty interakce (docking process) od přípravy molekul až po určení potenciálních vazebných míst cílového proteinu včetně predikce vazebných módů ligandu. Molegro Virtual Docker nabízí práci s vysoce kvalitním systémem založeným na nových optimalizačních technikách, kombinovaných se zkušenostmi uživatele tak, že se zaměřuje na použitelnost a produktivitu. Molegro Virtual Docker pracuje pod systémy Windows, Linux a Mac OS X.

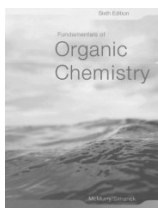
K dispozici je podrobná recenze srovnávající Molegro Virtual Docker s ostatními, podobnými systémy Thomsen R., Christensen M. H., *J. Med. Chem.* 49, 3315 (2006); <http://dx.doi.org/10.1021/jm051197e>.

K novým funkcím programu patří m.j.: podpora skriptování (batch job execution), tzv. „Pose Organizer“ byl přeorganizován tak, že zvládne velké množství dat a další. Zájemci si mohou stáhnout zdarma zkušební verzi na adrese: <http://www.molegro.com> or contact:

Molegro je dánská firma založená v roce 2005, která se zaměřuje na vývoj nástrojů pro „high-performance drug discovery solutions“, které pomohou zkrátit periodu vývoje nových léků. Cílem pracovníků společnosti je poskytnout odborníkům vědecké nástroje nejvyšší úrovně, jak pokud se týče algoritmů, tak intuitivního grafického rozhraní uživatele.

René Thomsen

Recenze



John E. McMurry, Eric E. Simanek:

Fundamentals of Organic Chemistry

Vydal Thomson Brooks/Cole v roce 2006, 6. vydání, pevná vazba, 640 stran, cena

USD 143, příp. cca 40 liber.

ISBN: 0495125903, v USA 0495012033

Když jsem se zeptal na výstavě Pittcon 2003 Johna B. Fenna, emeritního profesora chemie na Virginia Commonwealth University, Richmond (jenž sdílel Nobelovu cenu za chemii za rok 2002), jaký je jeho pocit ze současné výuky chemie, odpověděl velmi nadšeně, že učitelé dělají převelikou chybu, když si myslí, že student na univerzitě musí studovat z knih, které mají tisíce stránek. Chyba působí, že studenti mají o obor menší zájem pro

množství dat, které jednoduše nemohou prakticky zatrávit. Šesté vydání slavného „McMurry“ je cosi, co pana profesora jenom potěší, ale i cosi, co by potěšilo nestora české chemické pedagogiky, prof. Pacáka. Na nějakých 600 stranách s mnoha obrazy a schémata, 3D-modely nám autoři přinášejí lehký a čerstvý pohled na dobrý základ organické chemie s mnoha důležitými konotacemi k naukám o živé přírodě, průmyslu a životnímu prostředí.

Pánové John E. McMurry z Cornell University a Eric E. Simanek z Texas A&M University vykonali kus užitečné práce tím, že umožnili na platformě uznávané McMurryho knihy solidní pohled na základy organické chemie. Jako cokoliv, vše má i své stinné stránky. Tato učebnice malinko pokulhává, pokud se týče chiralit a jejich aspektů. Nicméně, lze ji doporučit jako střídmý zdroj informací pro studenty organické chemie.

Pavel Drašar

Zákony, které ovlivní život chemiků

305/2006 Sb. Nařízení vlády, kterým se mění nařízení vlády č. 194/2001 Sb., kterým se stanoví technické požadavky na aerosolové rozprašovače

301/2006 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 343/1997 Sb., kterou se stanoví způsob předepisování léčivých přípravků, náležitosti lékařských předpisů a pra-

vidla jejich používání, ve znění pozdějších předpisů

293/2006 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění vyhlášky č. 187/2005 Sb.

284/2006 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 221/2004 Sb.,

kerou se stanoví seznamy nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejichž uvádění na trh je zakázáno nebo jejichž uvádění na trh, do oběhu nebo používání je omezeno, ve znění pozdějších předpisů

264/2006 Sb. Zákon, kterým se mění některé zákony v souvislosti s přijetím zákoníku práce

263/2006 Sb. Usnesení Poslanecké sněmovny k zákoníku práce, přijatému Parlamentem dne 21. dubna 2006 a vrácenému prezidentem republiky dne 10. května 2006

262/2006 Sb. Zákon zákoník práce

260/2006 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingrediencí na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku (vyhláška o kosmetických prostředcích), ve znění pozdějších předpisů

256/2006 Sb. Vyhláška o podrobnostech systému prevence závažných havárií

255/2006 Sb. Vyhláška o rozsahu a způsobu zpracování hlášení o závažné havárii a konečné zprávy o vzniku a dopadech závažné havárie

254/2006 Sb. Nařízení vlády o kontrole nebezpečných látek

231/2006 Sb. Vyhláška, kterou se stanoví vzor písemného pověření kontrolního pracovníka k provádění kontroly výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách a souvisejících činností

227/2006 Sb. Zákon o výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách a souvisejících činnostech a o změně některých souvisejících zákonů

221/2006 Sb. Zákon o vymáhání práv z průmyslového vlastnictví a o změně zákonů na ochranu průmyslového vlastnictví (zákon o vymáhání práv z průmyslového vlastnictví)

220/2006 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 255/2003 Sb., kterou se stanoví správná lékárenská praxe, bližší podmínky přípravy a úpravy léčivých přípravků, výdeje a zacházení s léčivými přípravky ve zdravotnických zařízeních a bližší podmínky provozu lékáren a dalších provozovatelů vydávajících léčivé přípravky

219/2006 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 49/1993 Sb., o technických a věcných požadavcích na vybavení zdravotnických zařízení, ve znění pozdějších předpisů

216/2006 Sb. Zákon, kterým se mění zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, a některé další zákon

215/2006 Sb. Zákon, kterým se mění zákon č. 321/2004 Sb.,

o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o vinohradnictví a vinařství), ve znění pozdějších předpisů, a zákon č. 634/2004 Sb., o správních poplatcích, ve znění pozdějších předpisů

179/2006 Sb. Zákon o ověřování a uznávání výsledků dalšího vzdělávání a o změně některých zákonů (zákon o uznávání výsledků dalšího vzdělávání)

157/2006 Sb. Zákon, kterým se mění zákon č. 19/1993 Sb., o orgánech státní správy České republiky v oblasti puncovníctví a zkoušení drahých kovů, ve znění zákona č. 309/2002 Sb., a zákon č. 539/1992 Sb., o puncovníctví a zkoušení drahých kovů (puncovní zákon), ve znění pozdějších předpisů

124/2006 Sb. Vyhláška, kterou se zrušuje vyhláška č. 95/2006 Sb., kterou se stanoví seznam odpadů, na které se vztahuje postup podle § 55 odst. 2 zákona č. 185/2001 Sb.

123/2006 Sb. Vyhláška o evidenci a dokumentaci návykových látek a přípravků

104/2006 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 26/2001 Sb., o hygienických požadavcích na kosmetické prostředky, o náležitostech žádosti o neuvedení ingrediencí na obalu kosmetického prostředku a o požadavcích na vzdělání a praxi fyzické osoby odpovědné za výrobu kosmetického prostředku (vyhláška o kosmetických prostředcích), ve znění pozdějších předpisů

86/2006 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty

78/2006 Sb. Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 221/2004 Sb., kterou se stanoví seznamy nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejichž uvádění na trh je zakázáno nebo jejichž uvádění na trh, do oběhu nebo používání je omezeno, ve znění vyhlášky č. 109/2005 Sb.

74/2006 Sb. Zákon, kterým se mění zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a zákon č. 79/1997 Sb., o léčivech a o změnách a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů

59/2006 Sb. Zákon o prevenci závažných havárií způsobených vybranými nebezpečnými chemickými látkami nebo chemickými přípravky a o změně zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a zákona č. 320/2002 Sb., o změně a zrušení některých zákonů v souvislosti s ukončením činnosti okresních úřadů, ve znění pozdějších předpisů, (zákon o prevenci závažných havárií)

Aprílový klub

Generika, tzv. starší léky

V článku „Výrobci léků si stěžují“ (autor Robert Zelenka, Noviny 24hodin z 31. března 2006) jsem našel velmi originální vysvětlení pojmu generikum. Prý se jedná: „... o starší a méně účinné preparáty...“. Pokud bych chtěl napravit logiku nevzdělaného autora, tak generika vznikají přece až po originálu, takže by se spíše hodilo nazvat je „mladší léky“. Co Vy na to, farmakochemici?

Bohumil Kratochvíl

Novinka z deníku Express

Deník Express dne 10.5.2006 nás seznámil s novinkou, že: „Hydrogenated oils are one of the worst (in fact deadliest) things for you, and here's why: when oils are hydrogenated, Hydrogen gas is pumped into them hydrogenated oils stick to the insides of your heart valves“.

pad

Osobní zprávy


**Prof. Ing. Jan Hlaváč, DrSc.
oslavil 80 let**

Prof. Jan Hlaváč, dlouholetý pracovník a nyní emeritní profesor VŠCHT Praha, oslavil dne 16. 7. 2006 životní jubileum. Patří k těm, kdo do vysokého věku nepřestali odborně pracovat a dodnes je s ním pravidelně setkáváme jako s členem zkušebních a odborných

komisí, oponentem a recenzentem, v posledních letech je členem Správní rady VŠCHT. Jeho jméno je spjato s přeměnou původně tradičního oboru v moderní disciplínu, jež se stále více zaměřuje na chemický výzkum spojený s vývojem nových anorganických materiálů pro progresivní aplikace (biomateriály, radioaktivní odpady, skla pro nové technické aplikace atp.).

Pochází z jihomoravského Kyjova. Jeho studium na místním reálném gymnáziu bylo přerušeno totálním nasazením v uhelných dolech, ale hned po válce bylo dokončeno maturitou s následným přihlášením ke studiu na tehdejší VŠCHTI v Praze. Po ukončení studia pracoval krátce ve sklářském průmyslovém výzkumu a v letech 1951–1954 absolvoval vědeckou aspiranturu. Pak nastupuje jako vědecký pracovník na Katedru technologie silikátů, v r. 1958 přechází na pedagogickou funkci odborného asistenta, v r. 1962 se habilituje a v r. 1965 je jmenován docentem pro obor Technologie silikátů. V r. 1969 získává hodnost DrSc., v r. 1982 je jmenován profesorem a pro léta 1991 až 1997 zvolen vedoucím katedry, přejmenované mezitím na Ústav skla a keramiky.

Po celých 40 let přednášel základní předmět oboru, pro který napsal rozsáhlou monografii *Základy technologie silikátů* (vyšla v SNTL v r. 1981, druhé vydání 1988, upravená anglická verze v nakl. Elsevier 1983). Kniha slouží dodnes jako základní učebnice oboru a je důležitá nejen pro studenty, ale pro všechny, kdo se o tento obor zajímají nebo v něm pracují.

Během celé doby svého působení na VŠCHT se prof. Hlaváč věnoval intenzivně práci vědecko-výzkumné, v níž dominovala jako obecnější témata mechanismy a kinetika reakcí pevných látek, fázové rovnováhy v oxidových systémech, interakce povrchů křemičitých skel s vodnými roztoky aj.

Původně se zabýval hlavně sklářskou tematikou, ale v letech 1954–1958 byl členem výzkumné skupiny pověřené výzkumem oxidové keramiky. Souběžně studoval kinetiku tvorby spinelu z oxidů hořečnatého a hlinitého, zejména z hlediska reaktivity Al_2O_3 . Po r. 1958 se vrátil ke sklářským tématům: sledoval se svými spolupracovníky a studenty rozpouštění pevných látek v taveninách, difuzní jevy v taveninách, krystalizaci a viskozitu skel, kinetiku vypařování těkavých složek z roztavených skel aj. Na zá-

kladě dat z literatury a vlastních experimentů byl vypracován s J. Matějem nový model (kinetický popis) koroze skel vodnými roztoky (1963), následovaný pak řadou modifikovaných modelů publikovaných dalšími autory ve světové literatuře. Pozornost byla věnována také metodám hodnocení a možnostem zvýšení chemické odolnosti skel chemickou úpravou jejich povrchů. V 80. a 90. letech se podílel na výzkumu skel pro imobilizaci radioaktivních odpadů, po devadesátém roce také ve spolupráci s Pacific Northwest National Laboratory, Richland, USA. V posledním období se zabýval se spolupracovníky bioaktivními skly a sklokeramikou pro kostní náhrady v humánní medicíně, hlavně z hlediska interakce povrchů těchto skel s krevní tekutinou.

Prof. Hlaváč je členem ČSCH od r. 1967, v letech 1968–1985 byl dlouhou řadu let členem orgánů IUPAC (asociovaný a titulární člen komise II.3, člen anorganické divize), koordinoval také jeden z mezinárodních projektů uvedené komise. V letech sedmdesátých a osmdesátých byl celostátním koordinátorem základního výzkumu v oboru skla v rámci SPZV ČSAV.

Kromě výše zmíněné monografie publikoval prof. Hlaváč stovku prací v domácí i zahraniční literatuře, s četnými citačními ohlasy v SCI. Za dlouholetou činnost se mu dostalo řady ocenění, obdržel např. cenu České matice technické a SNTL (1982), medaile F. Štolby (1986), E. Votočka (1992), Min. školství ČR (1993), J. Hlávky (1996). Po celou dobu působení na VŠCHT v Praze vedl k výzkumné práci velký počet diplomantů a několik desítek postgraduálních studentů, kteří se vesměs velmi dobře uplatnili v praxi u nás i v zahraničí.

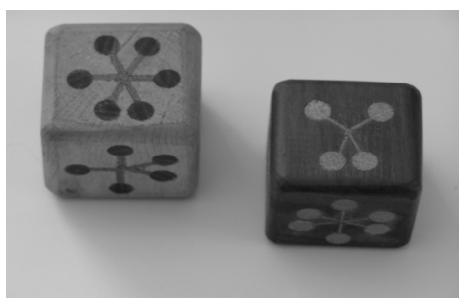
Z výše uvedeného přehledu je zřejmé, že se prof. Hlaváč podílel na výchově několika generací chemiků v oblasti anorganických nekovových materiálů. Bez nadsázky je možné konstatovat, že patří k zakladatelům vědecké školy, vycházející při popisu vlastností a výrobních procesů skla a keramiky z fyzikální chemie a chemického inženýrství. Navíc své diplomanty a doktorandy připravil nejen po stránce odborné, ale byl jim v odborném i každodenním životě příkladem a připravil je tak i po stránce lidské.

Za všechny jeho posluchače i spolupracovníky mu přejeme vše nejlepší, dobrou muziku i víno a těšíme se na další diskuse s ním nejen o sklu a keramice.

*Aleš Helebrant
a Ústav skla a keramiky VŠCHT Praha*

Prof. Jenšovský osmdesátníkem

Letos, 15. června, oslavil osmdesáté narozeniny významný anorganický chemik a někdejší hospodář Československé společnosti chemické, prof. RNDr. Lubor Jenšovský. Střední a starší generace si ho pamatuje zejména



jako nadšeného stereochemika a stavitele strukturních modelů. Mnohé z nich zdobí vysokoškolská pracoviště, akademické ústavy a firmy v tuzemsku i v zahraničí a dodnes se používají k výuce.

Ne každému je však v pokročilém věku přáno, aby se mohl nadále věnovat oboru a stýkat se s kolegy. Borek měl smůlu, že ho v roce 2002 postihla náhlá příhoda mozková. Od té doby tahá za sebou levou nohu, láhve otvírá pouze pravou rukou a cestu do Prahy ze svého Újezda nad Lesy již neriskuje. Tělesná aktivita a proslulá kutilská zručnost se tak omezila na práci na zahradě – viz likvidace pařezu stoleté hrušně (foto) – a v dílně na výrobu dřevěných hraček kostek s intarzovanými koordinačními polyedry (na ty je zvláště pyšný).

Jeho proslulá paměť však zůstala nezasazena, takže i dnes je Borek schopen z paměti přednést prolog génia střední školy od Jaroslava Žáka (48 veršů), který se naučil ve svých 16 letech.

Protože dnešní věda se nedá dělat bez internetu a ten Borek zatím doma nemá, vyřešil to typicky po svém – chemii dal v ale. Nedopsaná pro Chemické listy zůstala „Jaderná stabilita očima chemika“ i připravované „Polymorfni přeměny krystalických látek“. Po chystaném druhém modelu proteinu zbyl fragment chlorofylu a několik tisíc kulí, z nichž Borek vyrobil, pokud měly configura-

ci sp², kuchyňské podložky pro své příznivkyně.

Jeho současné spojení s chemií tvoří kvartální Chemické listy a naše víkendové disputace s chemickou i nechemickou (je slávista) tematikou při mých pravidelných návštěvách v Újezdě, s tradičním pohoštěním hanáckým koláčem. Ten Borek nepeče, ale kupuje přes ulici. Chemii v kuchyni přednáší místním seniorům. K posledním experimentům v tomto oboru lze počítat fridátové nudle na bázi cmundy do rajské polévky.

Pro důchodce je těžké držet krok s moderní výpočetní a komunikační technikou, ale Borek se počítači věnuje každodenně. Z výsledků stojí za zmínku tabulka rodokmenu Jenšovských – oba synové jsou desátá generace – a grafický přehled evropských panovníků (a papežů) od počátku našeho letopočtu. Počítačové problémy, pokud nevznikají mezi klávesnicí a židlí, řeší oba synové: Šimon (hardware) a Jonáš (software).

Literárně se Borek vyzíval na stránkách „Újezdského zpravodaje“, kde opravoval televizní „moudrosti“, bránil češtinu před módními vlivy a v rubrice „kalendárium“ zmiňoval většinou stoletiny umělců a sportovců. Pro neshody s redakcí se po sedmdesáti příspěvcích se Zpravodajem před rokem rozešel.

Borkova babička z otcovy strany byla neteří Josefa Mánesa a útlá knížka jejích vzpomínek byla podnětem ke spolupráci s Národní galerií, když byla pořádána výstava věnovaná malířské rodině Mánesů. Borek na tiskové konferenci i v relacích v rozhlasu a televizi vyvracel domněnku, že je Mánesovým potomkem. Potěšilo ho ale, že byl přijat jeho názor, že portrét Antonína Mánesa není autoportrét, ale dílo jeho bratra Václava, stejně jako názor, že slavná Mánesova „Josefína“ není podobiznou konkrétní ženy, ale vidinou krásy jeho dcerky. Výlet do kunsthistorie přivedl Borku k problému „Zuzany v lázni“, obrazu, který v Haškově „Švejkovi“ zdobí byt feldkuráta Katze. Tento údajně biblický motiv ztvárnili Rubens, Tintoretto, Van Dyck a Santerre, leč bádání i v posledních českých biblicích bylo bezvýsledné. A tak se nevěřící Borek proklestil až k bibli Lutherově, kde v deváté knize apokryfů je příběh Zuzany a Daniela vyličen.

Co k tomu dodat? Jako aktivní chemik byl prof. Jenšovský mnohými vážen a nemnohými znevažován. Borek si však z toho mnoho nedělal a rád v této souvislosti citoval svého nejmilejšího učitele Dr. Bohumila Součka: „jsme lidi chytří a jsou lidi pitomí“.

K důstojné oslavě Borkových osmdesátinám se v Újezdě sešla početná „stáj“ jeho žáků a to byl pro odpočívajícího pedagoga ten nekrásnější dárek.

Podle Borkových slov je toto psaní prenekrologem, ale já si myslím, že to zní příliš pesimisticky. Hodně zdraví do dalších let, Borku !

Bohumil Kratochvíl

 Výročí a jubilea

Jubilanti ve 4. čtvrtletí 2006**85 let**

- František Průša**, (26.10.), Státní výzkumný ústav materiálu Praha
Prof. Ing. Dr. Jozef Tomko, DrSc., (12.12.), čestný člen ČSCH, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského Bratislava
RNDr. PhMr. Zdeněk Jung, CSc., (18.12.), Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha

80 let

- Doc. RNDr. Eva Fischerová, CSc.**, (19.10.), Agrotechnika Brno
Ing. Jiří Hruška, (4.11.), Ústav dosimetrie záření AV ČR Praha
Prof. RNDr. Antonín Tockstein, DrSc., (9.11.), čestný člen ČSCH, Univerzita Pardubice
Prof. Ing. Dr. Zdyněk Ksandr, CSc. (15.11.), VŠCHT Praha
Ing. Milan Pražák, CSc., (30.11.), VŠCHT Praha
RNDr. Emil Svátek, CSc., (15.12.), Výzkumný ústav pro farmacii a biochemii Praha

75 let

- Prof. RNDr. Antonín Berka, DrSc.**, (8.11.), PřF UK Praha
Prof. RNDr. Vladimír Dadák, DrSc., (9.11.), MU, Katedra biochemie Brno
Doc. Ing. Jan Štětina, Csc., (1.12.), Vojenská akademie Brno
Prof. RNDr. Miloš Procházka, CSc., (3.12.), PřF UK Praha
Doc. Ing. Kateřina Orlíková, CSc., (17.12.), VŠB Ostrava
Ing. Milan Marhol, CSc., (20.12.), ÚJV Řež u Prahy

70 let

- Doc. Ing. Jaroslav Matouš, CSc.**, (23.10.), VŠCHT Praha
Ing. Štěpán Florián, CSc., (24.10.), Ústav polymerov SAV Bratislava Slovensko
Ing. Marta Šolcová, (25.10.), VÚNH Praha
Doc. Ing. Zdeněk Vymazal, DrSc., (31.10.), VŠCHT Praha

- Ing. Karel Pětioký**, (6.11.), VÚCHZ Praha
Ing. Antonín Galatík, CSc., (27.12.), SVŠT Otrokovice

65 let

- Doc. Ing. Karel Komárek, CSc.**, (3.10.), Univerzita Pardubice
Doc. Ing. Kamil Wichterle, CSc., (11.10.), TUO – VŠB Ostrava
Ing. Ivo Masřík, CSc., (27.10.), Městská inspekce požární ochrany Praha
RNDr. Josef Hanzlík, CSc., (1.11.), MŠMT ČR Praha
Ing. Karel Tobola, (15.11.), Pragochema s.r.o. Praha
Ing. František Budský, (20.11.), ÚJV Řež u Prahy
Doc. RNDr. Jaromír Mindl, CSc., (12.12.), Univerzita Pardubice
Prof. RNDr. Petr Boček, DrSc., (25.12.), UIANCH AV ČR Brno
Doc. RNDr. Jiří Hostomský, CSc., (29.12.), ÚACH AV ČR Řež u Prahy
Ing. Ignác Hoza, CSc., (30.12.), VVŠ PVK Vyškov
RNDr. Rudolf Přibíl, (31.12.), PřF UK Praha

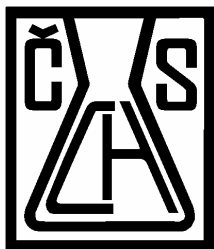
60 let

- Doc. RNDr. Nina Škottová, CSc.**, (6.10.), poslankyně evropského parlamentu
Doc. Ing. Jitka Šrámková, CSc., (24.10.), Univerzita Pardubice
RNDr. Milada Doležalová, CSc., (30.10.), SÚKL, Praha
Dic. Ing. Alexandr Čegan, CSc., (23.12.), Univerzita Pardubice

*Blahopřejeme***Zemřelí členové Společnosti**

- Doc. Ing. Jiří Teplý, CSc.**, ÚJV Řež u Prahy, zemřel 16. dubna 2006 ve věku nedožitých 78 let
Ing. Dr. Jiří Hruška, ÚDZ AV ČR Praha, zemřel 25. dubna 2006 ve věku nedožitých 80 let

Čest jejich památce



Česká společnost chemická
Sekretariát a redakce Chemických listů
Novotného lávka 5
116 68 Praha 1
tel./fax: 222 220 184, redakce tel. 222 221 778
e-mail: chem.spol@csvts.cz
<http://www.csch.cz>

Proč se stát členem České společnosti chemické

Zapojení v České společnosti chemické, členu Asociace českých chemických společností, přináší individuálním chemikům kromě vlastního členství v největší a nejstarší profesní organizaci chemiků:

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCH,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění...
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCH,
- možnost dostávat 4× ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů,
- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- možnost objednání „osobního balíku předplatného“ Chemických listů a časopisů konsorcia EUChemSoc,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě, informace o dění v evropských chemických strukturách
- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu Eurchem, platného v celé EU,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.),
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCH,
- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- vedle individuálního členství je možné kolektivní členství firem,
- a řadu dalších služeb.

Jak se stát členem ČSCH

Členská přihláška je k dispozici na internetových stránkách ČSCH nebo na sekretariátu ČSCH. Členství je přístupné pro všechny zájemce o chemii a přijetí nového člena doporučí dva členové ČSCH (doporučení je možné nahradit odborných životopisem), členství nabývá platnosti po schválení hlavním výborem ČSCH.

Výši členských příspěvků a možné slevy schvaluje na návrh předsednictva hlavní výbor ČSCH.

Asociace českých chemických společností
a Asociácia slovenských chemických
a farmaceutických spoločností
ve spolupráci se společností
Spolek pro chemickou a hutní výrobu a.s.

a
Univerzitou J. E. Purkyně v Ústí nad Labem
pořádají

58. Sjezd chemických společností

4.–8. září 2006, Ústí nad Labem

Odborný program proběhne v následujících sekcích:

1. Analytická a fyzikální chemie
2. Anorganická a materiálová chemie
3. Organická a farmaceutická chemie
4. Petrochemie a polymery
5. Výuka, informatika a historie chemie
6. Chemie životního prostředí
7. Chemie potravin a biotechnologie
8. Průmyslová chemie – CHEMPROGRESS

Plenární příspěvky dosud potvrdili následující přednášející:
C. Näther (Heyrovského-Ilkovičova-Nernstova přednáška)
J. Moravcová (Šantavého přednáška)

Přednášky k 80. narozeninám doc. K. Bláhy:
J. Vičar, P. Maloň, M. Flegel

VIP přednášky:
P. Zuman, F. Tureček, V. Větvicka, V. Křen, V. M. Král,
J. B. Šmidrkal

Hlavní přednášky v příslušných sekcích:
M. Navrátil, D. Berek, S. Schmidt, P. Kutschy, P. Szolcsányi,
K. Jesenak, K. Florián, P. Silny, M. Remko.

Temíny:

Druhý oběžník na webu	18.3.2006
Registrace za standardní poplatek	15.5.2006
Zaslání abstraktu pro sborník	15.5.2006

Kontakt pro zaregistrované účastníky: info@orgit.cz
Adresa pro písemný styk: Česká společnost chemická,
Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1
Další informace na adrese: <http://www.sci.ujep.cz/sjezd>



Sjezd se koná v Ústí nad Labem, významném středisku českého chemického průmyslu v roce, kdy Spolek pro chemickou a hutní výrobu, a.s., oslaví 150. výročí svého založení. Koná se také v roce, kdy Česká společnost chemická vydává stý ročník časopisu „Chemické listy“. A v neposlední řadě je konání sjezdu v Ústí n. L. i reflexí toho, že na Univerzitě Jana Evangelisty Purkyně byla nově zřízena Přírodovědecká fakulta, teprve druhá v Čechách, a byla tak posílena i pozice chemických oborů v regionu.

Účastnický poplatek se skládá z následujících položek (fakturovaných separátně):

- vlastní registrační poplatek, zahrnující veškeré organizační náklady, doprovodné akce a sborník sjezdu – 8. číslo Chemických listů,
- ubytování dle individuální objednávky. Ubytování je zajištěno na kolejích UJEP – jedná se o jednolůžkové pokoje s vlastním sociálním zařízením, cena za noc je 230 CZK,
- stravné dle individuálních objednávek, cena oběda či večeře je 75 CZK, snídaně je zahrnuta v ceně ubytování a nevyúčtovává se.

Registrační poplatek pro člena některé ze společností asociace je 2600 CZK v řádném termínu, 3200 CZK za pozdní registraci (řádným termínem se rozumí přihlášení do 15.5.2006). Registrační poplatek pro nečleny je 3100 CZK v řádném termínu a 3500 CZK po termínu. Studentům bude poskytnuta sleva cca 700 CZK z tohoto registračního poplatku (poplatek činí 1900 CZK v řádném termínu a 2500 CZK po termínu). Studentský poplatek je podmíněn členstvím v některé ze společností asociace.



Important dates

Preregistration September 30, 2007

If you want to be sure to get further information

Early registration October 31, 2007

Recommended if you intend to present oral presentation and be considered as a key lecturer. Please, send a short abstract.

Notification of Acceptance January 31, 2007

Regular registration February 28, 2007

Abstract submission February 28, 2007

Two pages abstract for the conference proceedings

Early hotel registration - details will be announced in the 1st circular

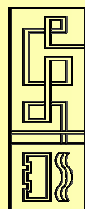
Contacts

Prof. Ivan Hudec
Faculty of Chemical and Food Technology
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia
phone 421 2 5932 5446
Fax 421 2 5292 3198
Email ivan.hudec@stuba.sk
website www.chtf.stuba.sk

Prof Ivan Chodák
Polymer Institute, Slovak Academy of Sciences
842 36 Bratislava, Slovakia
phone 421 2 5477 1603
Fax 421 2 5477 5923
email upolchiv@savba.sk

Secretary
Katarína Csomorová
Polymer Institute, Slovak Academy of Sciences
842 36 Bratislava, Slovakia
phone: 421 2 5477 1603
Fax: 421 2 5477 5923
email upolkata@savba.sk

Polymer Institute
Slovak Academy of Sciences
Mrs. Katarína Csomorová
PMA 2007
842 36 Bratislava
Slovakia



Polymer Institute
Slovak Academy of Sciences



in cooperating with
Matador Púchov



International Conference
Polymeric Materials in Automotive
PMA 2007
Bratislava, Slovak Republic



15 - 17 May, 2007

First Announcement and Call
for Papers

Central Europe, particularly Slovakia, has become a manufacturing hub for automotive interiors. Slovakia has recently experienced a significant flow of direct investment from abroad. This tendency seems to be continuing as a result of well educated and highly skilled labor force and ideal central location serving as a gateway to Eastern Europe. The dominant investors in Slovakia in automotive industry, namely Volkswagen, PSA, and recently Kia Hyundai, attracted a number of other companies – suppliers of plastics and rubber parts being a significant part of them – building up their new facilities in the country.

Reflecting this development, for the second time Slovakia will host for three days the participants of the International Conference on Polymeric Materials in Automotive (ICPMA). The conference is targeted on various aspects related to plastics and rubber in the automotive industry, with the aim to exchange the innovative approaches towards new polymer products increasingly having a decisive influence on the design and appearance of new generation of automobiles. Developing goals such as aesthetic appeal and comfort, safety and lightweight construction, as well as quality and cost are affected directly by the material concept and the corresponding processing and product technology.

International scientific conference on rubber, Slovak Rubber Conference, is organized every year by the Rubber Research Institute of Matador Púchov. In 2007 this traditional event will be a part of the second International Conference on Polymeric Materials in Automotive.

Organizing Committee

Chairman Ivan Hudec (organization)
Ivan Chodák (scientific committee)

Scope:

Advances in development of plastics nad rubber-based materials for application in automotive industry.

Topics:

- Materials Based on Plastics for Exterior and Interior (taylor-made modification, reinforced plastics and rubber, nanocomposites)
- Surface Materials and Technologies
- Adhesives, Seals
- Polymeric Foams in Automotive
- Flammability and Flame Retardancy of Materials
- Materials and Procedures for Advanced Tyre Design
- Recycling of Plastics and Rubber Materials from Cars
- Advances in Testing of Polymeric Materials for Automotive (new test methods)

Scientific programme

Limited number of plenary lectures will be presented by invited speakers. Two parallel sessions are planned, one of these will be devoted to rubber products in cars. In each session few key lectures and a number of contributed lectures will be presented by either invited speakers or by registered participants. A poster session is planned to provide a vast opportunity for poster presentation and appropriate discussion.

Call for Papers

Scientists are invited to submit contributions presented as contributed lectures or posters. Few key lectures will be selected from this first bid.

General information

All necessary information on the accommodation (will be booked on request by organizing committee in selected hotels of various categories in Bratislava), travel, invited lectures, registration details (the registration fee is expected to be 390 Euro maximum, with discount for students, early registration, etc.) will be announced in the 1st circular issued in october 2006.

Preliminary Registration Form

Title

Surname.....

First name.....

Affiliation.....

Postal address.....

.....

.....

Phone.....

Fax.....

Email.....

I am interested in attending the PMA 2007, please send further information

I intend to give a presentation as a

poster contributed lecture

Tentative Title.....

.....

.....

.....



OBSAH

ÚVODNÍK	477
REFERÁTY	
Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability pěny piva	478
H. Čížková, P. Dostálek, J. Fiala a I. Kolouchová	
Role L-fenylalaninamoniumlyasy při obranné reakci rostlin	486
Š. Adámková, L. Luhová, M. Petřivalský a P. Peč	
Antifungální proteiny rostlin – klasifikace, charakteristika, možnosti využití	495
V. Heřmanová, J. Bárta a V. Čurn	
Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenozí rostlin	501
M. Hraška, S. Rakouský a V. Čurn	
Asimilace dusičnanového, amonného a amidického dusíku u zemědělských plodin	508
J. Zehnálek, V. Adam a R. Kizek	
LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY	
Závislost výnosu a kvality semene lupiny úzkolisté (<i>Lupinus angustifolius</i>, L.) na hnojení sloučeninami dusíku	515
T. Lošák	
Suplementácia ozimnej pšenice selénom	519
L. Ducsay, O. Ložek, L. Varga a T. Lošák	
Vliv vybraných faktorů na obsah polyfenolů a antioxidační aktivitu hlíz brambor	522
J. Lachman, K. Hamouz, J. Čepl, V. Pivec, M. Šulc a P. Dvořák	
Stanovenie malondialdehydu v bravčovom mäse s použitím extrakcie na tuhej fáze a HPLC	528
S. Marcincák, J. Sokol, P. Turek, P. Popelka a J. Nagy	

CONTENTS

EDITORIAL	477
REVIEW ARTICLES	
Importance of Proteins from the Viewpoint of Stability of the Beer Foam	478
H. Čížková, P. Dostálek, J. Fiala, and I. Kolouchová	
Characterization of Enzyme Phenylalanine Ammonia-lyase and Its Role in Activation of Defensive Mechanisms in Plants	486
Š. Adámková, L. Luhová, M. Petřivalský, and P. Peč	
Antifungal Plant Proteins – Classification, Characterization and Potential Applications	495
V. Heřmanová, J. Bárta, and V. Čurn	
Protease Inhibitors, Mode of Action and Perspectives for Plant Transgenesis Biosynthesis of Insect Pheromones	501
M. Hraška, S. Rakouský, and V. Čurn	
Assimilation of Nitrate, Ammonium and Amide Nitrogen by Agricultural Crops	508
J. Zehnálek, V. Adam, and R. Kizek	
LABORATORY EQUIPMENT AND METHODS	
Fertilisation of Narrow-Leaf Lupine with Nitrogen Compounds and its Effect on Yields and Quality of Seeds	515
T. Lošák	
Effects of Winter Wheat Supplementation with Selenium	519
L. Ducsay, O. Ložek, L. Varga, and T. Lošák	
The Effect of Selected Factors on Polyphenol Content and Antioxidant Activity in Potato Tubers	522
J. Lachman, K. Hamouz, J. Čepl, V. Pivec, M. Šulc, and P. Dvořák	
Determination of Malondialdehyde in Pork Meat Using Solid Phase Extraction and HPLC	528
S. Marcincák, J. Sokol, P. Turek, P. Popelka, and J. Nagy	

BULLETIN ČESKÝCH CHEMICKÝCH SPOLEČNOSTÍ

BULLETIN OF THE CZECH CHEMICAL SOCIETIES

Základy termodynamiky nevratných dějů I. Vavruch	535	Fundamentals of Irreversible Thermodynamics I. Vavruch	535
Integrovaný registr znečišťování na Internetu J. Maršák	539	Integrated Registry of Chemical Pollution on Internet J. Maršák	539
Přestoupí IF Chemických listů magickou hranici 0,5? R. Kizek	542	Will the Impact Factor of the Chemické Listy Exceed the Magic Limit of 0,5? R. Kizek	542
Ze života chemických společností	543	From the Chemical Societies	543
Odborná setkání	544	Meetings and Conferences	544
Akce v ČR a v zahraničí	546	Meetings Calendar	546
Zprávy	547	News	547
Noví členové ČSCH	548	New Members	548
Členská oznámení a služby	549	Member Services and Announcements	549
Bulletin představuje	550	Bulletin Presents	550
Recenze	550	Book reviews	550
Zákony, které ovlivní život chemiků	550	Laws that could Influence Life of Chemists	550
Aprílový klub	551	Club of Jokes	551
Osobní zprávy	552	Personal News	552
Výročí a jubilea	554	Anniversaries and Jubilees	554

CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 100 (2006), čís./no. 7 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 130, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 116 • 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. Heftlejš, P. Holý, J. Horák, P. Chuchvalec, J. Podešva, P. Rauch, J. Volke; Bulletin: I. Valterová; Webové stránky: R. Liboska, P. Zámstný • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTORI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA), V. Větvička (USA), L. Opletal (Hradec Králové) • 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, simanek@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: <http://chemicke-listy.vscht.cz> • TISK: Česká Tiskárny, s.r.o., Ráby 14, 533 52 Staré Hradiště; SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2004 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 147 Kč, roční plně předplatné 2006 (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 2006 (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 28.6.2006.