



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE

Sborník souhrnů a plných textů konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2019

4. dubna 2019

**Konferenční centrum VŠCHT Praha, kolej Sázava
areál vysokoškolských kolejí Praha 4 – Kunratice**

Editor: Olga Mařátková

Praha 2019

Pořádající instituce:

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Sponzoři, spolupracující společnosti a hosté:

Budějovický Budvar, n.p.

EPS biotechnology s.r.o.

Pivovar Protivín a.s.

Pivovar Továrna

Státní zemědělská a potravinářská inspekce

Přípravný a organizační výbor:

doc. Ing. Irena Kolouchová, Ph.D.

doc. Ing. Olga Maňátková, Ph.D.

Publikace neprošla jazykovou ani odbornou úpravou. Za obsah příspěvků odpovídají autoři.

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019

ISBN 978-80-7592-048-5

Obsah

Program konference	4
<u>Bulír T.:</u> Vliv vysokotlakého ošetření na kvalitativní parametry piva	8
<u>Dopita K.:</u> Biosorpce technologicky významných látek v průběhu kvašení a zrání piva	9
<u>Fanta P.:</u> Možnosti eradikace biofilmu z titanové slitiny Ti-6Al-4V netermálním plazmatem	10
<u>Michailidu J.:</u> Nové přístupy k produkci nanočástic kovů za využití rostlinných extraktů	16
<u>Gašparínová Z.:</u> Antibiofilmové účinky anorganické soli COSANu v kombinaci s antibiotiky	23
<u>Lazarová M.:</u> Identifikace a studium markerů piv zrajících ve dřevě	29
<u>Kašparová P.:</u> Možnosti studia virulence patogenních mikroorganismů	30
<u>Simonová D.:</u> Inhibice tvorby biofilmu biologicky aktivními látkami	36
<u>Voldřichová K.:</u> Oxidační stabilita nefiltrovaného piva ošetřeného paskalizací	45

Program konference

1. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL B+C		
9:00 - 9:05	Zahájení konference	
9:05 - 9:25	<u>Paulíček V.</u> Představení společnosti EPS biotechnology, s.r.o.	
9:25 - 9:35	<u>Kinčl T.</u> Svrchně kvašená piva v minipivovaru VŠCHT Praha	
9:35 - 9:45	<u>Potočár T., Brányik T.</u> : Separace biomasy řasy <i>Chlorella vulgaris</i> pomocí interakce s polystyrenovými částicemi	
9:45 - 9:55	<u>Michailidu J., Čejková A.</u> Antimikrobiální aktivita biosyntetizovaných nanočástic kovů	
9:55 - 10:05	<u>Kašparová P., Maťátková O.</u> Možnosti studia virulence mikroorganismů	
10:05 - 10:45	přestávka	
2. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL B+C		
10:45 - 10:55	<u>Bierhanzl D., Dostálek P., Sýs J., Novotná M., Slabý M.</u> Určení původu látek způsobující zanášení membrán během filtrace piva	
10:55 - 11:05	<u>Bulíř T., Jelínek L.</u> Vliv vysokotlakého ošetření na kvalitativní parametry piva	
11:05 - 11:15	<u>Dopita K., Jelínek L.</u> Biosorpce technologicky významných látek v průběhu kvašení a zrání piva	
11:15 - 11:25	<u>Graman T., Jelínek L.</u> Simulace výroby studeně chmelených piv v laboratorních extraktorech	
11:25 - 11:35	<u>Klazar L., Dostálek P., Dienstbier M., Gabriel P.</u> Prekurzory koloidní stability piva a jejich význam	
11:35 - 11:45	<u>Lazarová M., Karabín M., Nešpor J.</u> Identifikace a studium markerů piv zrajících ve dřevě	
11:45 - 11:55	<u>Voldřichová K., Dostálek P., Štulíková K.</u> Oxidační stabilita nefiltrovaného piva ošetřeného paskalizací	
11:55 - 12:55	přestávka	

3. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL A	
10:45 - 10:55	<u>Brázdová L.</u> , Kameník Z., Kadlčík S., Janata J., Masák J.: Charakterizace produktů bakteriálních kmenů kódujících biosyntézu alkyprolinových derivátů
10:55 - 11:05	<u>Burková V.</u> , Raschmannová H., Branská B. Studium mechanismů tolerance solventogenních klostridií k butanolu
11:05 - 11:15	<u>Fanta P.</u> , Paldrychová M., Vaňková E.: Možnosti eradikace biofilmu z titanové slitiny Ti-6Al-4V netermálním plazmatem
11:15 - 11:25	<u>Dobešová P.</u> , Vasylikivska M., Patáková P. Vývoj metod pro studium efluxu u bakterií rodu <i>Clostridium</i>
11:25 - 11:35	<u>Fořtová L.</u> , Drahokoupil M., Branská B. Fermentační výroba butanolu ze zemědělských odpadů
11:35 - 11:45	<u>Gašparínová Z.</u> , Lokočová K., Vaňková E.: Antibiofilmové účinky anorganické sloučeniny COSANu v kombinaci s antibiotiky
11:45 - 11:55	<u>Hejdrová Š.</u> , Koukalová M., Čejková A. Mikrobiální biosyntéza nanočástic kovů
11:55 - 12:55	přestávka

4. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL B+C	
12:55 - 13:05	<u>Hutár D.</u> , Gharwalová L., Kolouchová I. Vliv vegetačního období na obsah antioxidantů ve <i>Vitis vinifera</i>
13:05 - 13:15	<u>Jacová V.</u> , Koukalová M., Čejková A. Studium toxicity grafenových materiálů vůči mikroorganismům
13:15 - 13:25	<u>Kačírek L.</u> , Vlčková V., Halecký M. Čištění odpadní vody se zbytkovými koncentracemi organických polutantů
13:25 - 13:35	<u>Kováčiková S.</u> , Brányiková I., Lucáková S., Brányik T. Separace jednobuněčných řas <i>Chlorella vulgaris</i> pomocí elektroflokulace
13:35 - 13:45	<u>Kultová A.</u> , Dostálková A., Rumlová M.: Role motivů zinkových prstů při vbalování genomové RNA Mason-Pfizerova opičího viru
13:45 - 13:55	<u>Lode V.</u> , Kronusová O, Kaštánek P. Buněčné kultury konopí setého jako potenciální zdroj bioaktivních látek
13:55 - 14:05	<u>Marková A.</u> , Gharwalová L., Kolouchová I. Vliv vegetačního období na zastoupení endofytní mikrobioty <i>Vitis vinifera</i>

5. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL A: studenti MSP	
12:55 - 13:05	<u>Novák O.</u> , Chalupa J., Halecký M.: Biofiltrace odpadních plynů za termofilního režimu provozu ve dvoufázových reaktorech
13:05 - 13:15	<u>Pekárek L.</u> , Dostálková A., Kaufman F., Rumlová M., Chen G., Yang L.: Searching for interaction motifs on selected segments of genomic RNA for Dengue C protein binding
13:15 - 13:25	<u>Simonová D.</u> , Lokočová K., Maťátková O.: Inhibice tvorby biofilmu polyvalentními glykomimetiky
13:25 - 13:35	<u>Strečanská P.</u> , Čadková A., Brányik T.: Biosorpce fluorochinolonů na řasovou biomasu
13:35 - 13:45	<u>Valentíková K.</u> , Gharwalová L., Kolouchová I.: Faktory ovlivňující obsah výživově prospěšných látek ve vínech
13:45 - 13:55	<u>Vojtko J.</u> , Drahokoupil M., Patáková P.: Porovnanie produkcie butanolu u rodičovského kmeňa <i>Clostridium beijerinckii</i> a jeho mutantov

SOUHRNY A PLNÉ TEXTY PŘÍSPĚVKŮ

Vliv vysokotlakého ošetření na kvalitativní parametry piva

T. Bulíř, L. Jelínek

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Vysokotlaká pasterace se v posledních letech stává stále populárnější metodou stabilizace produktů v potravinářském průmyslu. Určité ambice v sobě nese i v případě průmyslu pivovarského, kde je považována za slibnou technologii s potenciálem nahradit dosud hojně využívanou tepelnou pasteraci, a navíc by mohla významnou měrou zvýšit trvanlivost nefiltrovaných pív. Tato práce byla zaměřena na vliv paskalizace na stabilitu pивní pěny, obsah hořkosti a barvu ošetřených pív v rámci několikátýdenního skladování. Nakonec byl studován povrch kvasničných buněk izolovaných z nefiltrovaných paskalizovaných pív za pomoci elektronové mikroskopie. Bylo prokázáno, že piva stabilizovaná tlakem 550 MPa mají mnohem vyšší stabilitu pивní pěny, zřejmě z důvodu inaktivace kvasničné proteasy A. Při sledování morfologie povrchu kvasinek ošetřených tlakem byl objeven výrazný destrukční vliv tlaku 550 MPa. Analýza hořkosti a barvy tlakem ošetřených pív ukázala pouze minimální dopad na tyto sledované parametry. Pouze v případě světlého ležáku došlo tlakem 550 MPa k mírnému nárůstu barvy.

Biosorpce technologicky významných látek v průběhu kvašení a zrání piva

K. Dopita, L. Jelínek

Ústav Biotechnologie, VŠCHT Praha

Biosorpce je v posledních letech předmětem rozsáhlého výzkumu, díky slibným výsledkům v oblasti environmentálních biotechnologií. Svou roli hraje i v pivovarství, zejména v procesu kvašení a zrání piva, kde je řada technologicky významných látek vázána na buněčný povrch kvasinek. Tato práce byla zaměřena na výzkum biosorpce hořkých látek, zejména iso- α -hořkých kyselin, a xanthohumolu (chmelového polyfenolu s mnoha zdravotními účinky) na kvasinky *Saccharomyces pastorianus* a *Saccharomyces cerevisiae*. V experimentální části bylo zjištěno, že biosorpce zmíněných látek je rychlý proces trvající nejvýše 30 minut do ustanovení biosorpční rovnováhy, přičemž po tuto dobu nedochází k bioakumulaci. Iso- α -hořké kyseliny se sorbují na buněčné stěny kvasinek pomocí slabé vazebné interakce, a to přes postranní karbonyl v poloze 1““. Kvasinky *S. cerevisiae* jsou prokazatelně účinnějšími sorbenty než kvasinky *S. pastorianus*. Přítomnost barevných látek sladu účinně brání biosorpci iso- α -hořkých kyselin a xanthohumolu.

Možnosti eradikace biofilmu z titanové slitiny Ti-6Al-4V netermálním plazmatem

P. Fanta, M. Paldrychová, E. Vaňková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Bakterie *Serratia marcescens* a *Pseudomonas aeruginosa* se řadí mezi významné oportunní a nozokomiální patogeny, způsobující řadu infekcí, zejména u pacientů s oslabenou imunitou. Zvláště problematická je případná kolonizace kloubních i jiných náhrad tvořených slitinou Ti-6Al-4V biofilmem těchto bakterií. Následné infekce jsou běžnými antibiotiky obtížně léčitelné, a proto jsou vyvíjeny nové alternativní metody, jako například aplikace netermálního plazmatu (NTP). Jedná se o ionizovaný plyn, generovaný elektrickým výbojem o vysokém napětí za atmosférického tlaku a při pokojové teplotě. NTP může ovlivnit také AHL-dependentní QS systémy oportunně patogenních bakterií, které se na virulenci a potažmo tvorbě biofilmu přímo či nepřímo podílejí.

1. QS systémy a tvorba biofilmu bakterie *P. aeruginosa*

Systém QS tvoří hlavní regulační síť *P. aeruginosa* zodpovědnou za regulaci exprese virulencních faktorů, čímž ovlivňuje samotnou patogenitu této bakterie. Síť systému QS je uspořádána do několika vrstev a zahrnuje 4 systémy: LasIR, RhlIR, PQS a IQS, vzájemně propojené mezi sebou různými cestami, díky čemuž regulují expresi různých cílových genů. Každý z těchto systémů je regulován specifickými signálními molekulami, které působí jako autoinduktory (Lee a Zhang, 2015). Zároveň však v tomto složitém uspořádání může docházet k interferencím, které mohou tvorbu virulencních faktorů naopak oslabit, čehož lze potenciálně využít např. při eradikaci biofilmu *P. aeruginosa* (Kahlon, 2016).

Dosud nebyl identifikován žádný QS-specifický regulon kontrolující tvorbu biofilmu bakterie *P. aeruginosa* (Bjarnsholt a Givskov, 2007), ale některá propojení již popsána byla. Např. produkce lektinu, adhezinu určujícího schopnost *P. aeruginosa* adherovat k nejrůznějším povrchům je spjata se systémem PQS (Farrow a kol., 2008). Během počáteční fáze vývoje biofilmu dochází k vysoké produkci signální molekuly LasIR QS systému, *N*-(3-oxo-dodekanoyl) homoserin laktonu (Favre-Bonté a kol., 2003). Systémy LasIR a RhlIR řídí rovněž biosyntézu některých exopolysacharidů (konkrétně Psl a Pel) obsažených v matrici biofilmu (Gilbert a kol., 2009, Sakuragi a Kolter, 2007, Ueda a Wood, 2009). Systém RhlIR se

uplatňuje také během řízení produkce rhamnolipidů, biosurfaktantů jejichž funkce spočívá zejména v tvorbě vodních kanálků, kterými je biofilm protkaný. Tyto kanálky slouží jako cirkulační systém pro efektivní dodávku nutrientů, a zároveň odvod odpadních látek (Davey a kol., 2003, Pamp a Tolker-Nielsen, 2007). Čtvrtý QS systém, v rámci něhož dochází k biosyntéze 2-(2-hydroxyfenyl)-thiazol-4-karbaldehydu, doplňuje předchozí systémy tím, že v případě výskytu mutace v systému LasIR nahrazuje jeho centrální úlohu (Lee a kol., 2013).

P. aeruginosa může kromě jiného tvořit biofilm na implantátech používaných v ortopedii vyráběných nejčastěji z titanové slitiny Ti-6Al-4V (Cole a kol., 2014, Geetha a kol., 2009, Pandey a kol., 2000, Trautner a Darouiche, 2004). Dle Campoccia a kol. (2006) jsou oportunními patogeny izolovanými z těchto implantátů především grampozitivní bakterie. *P. aeruginosa* poté jako zástupce bakterií gramnegativních představuje 8 % ze všech izolovaných mikroorganismů způsobujících infekce spojené se přítomností biofilmu na implantátech.

2. QS systémy a tvorba biofilmu bakterie *S. marcescens*

QS systém *S. marcescens* ovlivňuje expresi genů *swrI/R* a *sprI/R* zejména prostřednictvím *N*-butyryl homoserin laktonu a *N*-hexanoyl-homoserin laktonu (Van Houdt a kol., 2007). Tyto *N*-acyl-homoserinové laktony (AHL) ovlivňují produkci serralyzinu, hemolysinu, prodigiosinu, serrawettinu a tvorbu vysoce porézního vláknitého biofilmu (Labbate a kol., 2004).

Pro patogenitu *S. marcescens* je důležitá zejména produkce exolipidů prodigiosinu a serrawettinu. Biosurfaktant serrawettin usnadňuje *S. marcescens* kromě jiného kolonizaci nejrozličnějších povrchů (Li a kol., 2005). Iniclace tvorby biofilmu *S. marcescens* vyžaduje přítomnost fimbrií typu I, figurujících jako adheziny, které jsou významnými virulencními faktory, neboť zprostředkovávají interakci s povrchy (Jonson a kol., 2005). Děje zahrnující adhezi, či tvorbu trojrozměrné struktury biofilmu, jsou prokazatelně závislé na regulaci pomocí QS systémů (Rice a kol., 2005).

3. Netermální plazma

NTP představuje novou alternativu k léčbě mikrobiálních infekcí. Ačkoliv je existence NTP známa již delší dobu, jeho využití se doposud omezovalo zejména na sterilaci inertních povrchů. Nedávno však bylo prokázáno, že NTP lze aplikovat přímo na živoucí buňky a tkáně (Kalghatgi a kol., 2011).

Plazma je obecně definováno jako neutrální ionizovaný plyn, skládající se z částic, které spolu neustále interagují. Tyto reaktivní částice vznikají z neutrálních atomů a molekul po

kolizi s elektrony či fotony o vysoké energii. Možností, jak dodat neutrálnímu plynu dostatečnou energii pro vznik plazmatu je několik (Conrads a Schmidt, 2000). Charakteristickým znakem NTP je, že teplota lehkých částic (elektronů) je po dodání energie výrazně vyšší než teplota ostatních, těžších částic. Tento typ plazmatu je typicky tvořen pomocí klouzavého obloukového výboje nebo korónového výboje (Moreau a kol., 2008).

Nově studované techniky využívající NTP při atmosférickém tlaku jsou velmi slibné a poskytují mnohé výhody. Největší z nich je schopnost využití teplot nižších než 50 °C, což je vhodné zejména v případě aplikace termolabilních látek (Moisan a kol., 2002, Moreau a kol., 2008).

3.1 Mechanismus účinku NTP na gramnegativní bakterie

Jelikož se při generaci NTP jako ionizovaný plyn často používá vzduch, vznikají především reaktivní formy kyslíku a dusíku, které mohou poškodit bakteriální DNA, způsobit nevratné změny v nativní struktuře enzymů, vyvolat oxidativní stres a peroxidaci membránových lipidů (Alkawareek, 2014).

Zmíněných vlastností NTP lze využít např. ve stomatologii nebo k preventivnímu ošetření endotracheálních tubusů používaných v medicíně pro zajištění průchodnosti dýchacích cest. Toto ošetření znesnadňuje adhezi bakterií *P. aeruginosa* (Cha a Park, 2014, Triandafillu 2003). V roce 2013 byla prokázána srovnatelná míra eradikace biofilmu tohoto mikroorganismu jako při použití chlorhexidinu (Matthes a kol.).

Ve studii Ziuzina a kol. (2015) byla prostřednictvím NTP oslabena virulence této bakterie deaktivací faktorů virulence pyocyaninu a elastázy B, přičemž tvorba biofilmu ovlivněna nebyla. Tato skutečnost může být vysvětlena studií Flynn a kol. (2016), ve které byl prokázán vliv NTP na signální molekuly o struktuře AHL. Tyto molekuly nebyly schopné po expozici NTP vyvolat patřičnou QS odpověď u reportérového kmene *P. aeruginosa*. Rovněž ve studii Paldrychová a kol. (2019) bylo popsáno ovlivnění AHL-dependentních QS systémů bakterie *P. aeruginosa*, avšak k ovlivnění tvorby biofilmu klinických izolátů nedošlo. U řady klinických izolátů může být totiž funkce AHL-dependentního QS systému LasIR nahrazena IQS systémem, čímž může být tvorba některých faktorů virulence (biofilm) zachována (Lee a kol., 2013, Lee a Zhang, 2015).

Zatímco byly QS systémy bakterie *P. aeruginosa*, tvorba virulenčních faktorů a účinky působení NTP na ně popsány celou řadou studií (Hentzer a kol., 2003, Jakobsen a kol., 2012, Ziuzina a kol., 2015, Flynn a kol., 2016, Flynn a Gilmore, 2018), tak v případě neméně

významného oportunního patogenu bakterie *S. marcescens*, výzkum zaostává.

4 Závěr

Možností aplikace NTP interferujícího s QS systémy oportunně patogenních gramnegativních bakterií, se otevírá nový přístup k léčbě infekčních chorob. Přestože již byly popsány mechanismy, kterými NTP působí na gramnegativní bakterie, naráží stávající přístup na některá omezení spočívající především v nedostatečném popisu QS systémů např. u *S. marcescens* a v komplexnosti a propojenosti QS systémů (zejména u bakterie *P. aeruginosa*), které kontrolují produkci faktorů virulence (zejména tvorbu biofilmu). Proto by bylo do budoucna vhodné obrátit pozornost vědeckých skupin na možnost využití kombinatorických terapií, např. s využitím již v klinické praxi používaných antibiotik. Informace o možném aditivním účinku NTP a antibiotik na QS systémy gramnegativních bakterií, a následnou tvorbu biofilmu či jiných faktorů virulence, jsou zatím velice omezené.

Poděkování

Tato práce byla realizována za podpory Grantové agentury České republiky, projekt 17-15936S.

5 Literatura

- Alkawareek, M.Y., Gorman, S.P., Graham, W.G., Gilmore, B.F.** (2014) Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *International Journal of Antimicrobial Agents* 43(2), 154-160.
- Bjarnsholt, T., Givskov, M.** (2007) Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362(1483), 1213-1222.
- Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C.R.** (2006) The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials* 27(11), 2331-2339.
- Cole, S.J., Records, A.R., Orr, M.W., Linden, S.B., Lee, V.T.** (2014) Catheter-associated urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms. *Infection and immunity* 82(5), 2048-2058.
- Conrads, H., Schmidt, M.** (2000) Plasma generation and plasma sources. *Plasma Sources Science and Technology* 9(4), 441.
- Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A.** (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* 185(3), 1027-1036.
- Farrow, J.M., Sund, Z.M., Ellison, M.L., Wade, D.S., Coleman, J.P., Pesci, E.C.** (2008) PqsE functions independently of PqsR-*Pseudomonas* quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. *Journal of bacteriology* 190(21), 7043-7051.

- Favre-Bonté, S., Köhler, T., Van Delden, C.** (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 52(4), 598-604.
- Flynn, P.B., Busetti, A., Wielogorska, E., Chevallier, O.P., Elliott, C.T., Lavery, G., Gorman, S.P., Graham, W.G., Gilmore, B.F.** (2016) Non-thermal Plasma Exposure Rapidly Attenuates Bacterial AHL-Dependent Quorum Sensing and Virulence. *Scientific reports* 6.
- Flynn, P.B., Gilmore, B.F.** (2018) Understanding plasma biofilm interactions for controlling infection and virulence. *Journal of Physics D: Applied Physics* 51(26), 263001.
- Geetha, M., Singh, A.K., Asokamani, R., Gogia, A.K.** (2009) Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review. *Progress in materials science* 54(3), 397-425.
- Gilbert, K.B., Kim, T.H., Gupta, R., Greenberg, E.P., Schuster, M.** (2009) Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Molecular microbiology* 73(6), 1072-1085.
- Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P.** (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO journal* 22(15), 3803-3815.
- Cha, S., Park, Y.-S.** (2014) Plasma in dentistry. *Clinical Plasma Medicine* 2(1), 4-10.
- Jakobsen, T.H., van Gennip, M., Phipps, R.K., Shanmugham, M.S., Christensen, L.D., Alhede, M., Skindersoe, M.E., Rasmussen, T.B., Friedrich, K., Uthe, F.** (2012) Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(5), 2314-2325.
- Jonson, A.-B., Normark, S., Rhen, M.** (2005) Fimbriae, pili, flagella and bacterial virulence (Concepts in bacterial virulence), 67-89, Karger Publishers.
- Kahlon, R.S.** (2016) *Pseudomonas: molecular and applied biology*, Springer.
- Kalghatgi, S., Kelly, C.M., Cerchar, E., Torabi, B., Alekseev, O., Fridman, A., Friedman, G., Azizkhan-Clifford, J.** (2011) Effects of non-thermal plasma on mammalian cells. *PloS one* 6(1), e16270.
- Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., Kjelleberg, S.** (2004) Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of bacteriology* 186(3), 692-698.
- Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P., Zhang, L.-H.** (2013) A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature chemical biology* 9(5), 339-343.
- Lee, J., Zhang, L.** (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell* 6(1), 26-41.
- Li, H., Tanikawa, T., Sato, Y., Nakagawa, Y., Matsuyama, T.** (2005) *Serratia marcescens* Gene Required for Surfactant Serrawettin W1 Production Encodes Putative Aminolipid Synthetase Belonging to Nonribosomal Peptide Synthetase Family. *Microbiology and Immunology* 49(4), 303-310.
- Matthes, R., Koban, I., Bender, C., Masur, K., Kindel, E., Weltmann, K.D., Kocher, T., Kramer, A., Hübner, N.O.** (2013) Antimicrobial efficacy of an atmospheric pressure plasma jet against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Plasma Processes and Polymers* 10(2), 161-166.
- Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M.-C., Pelletier, J., Philip, N., Saoudi, B.** (2002) Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure and applied chemistry* 74(3), 349-358.
- Moreau, M., Orange, N., Feuilloy, M.** (2008) Non-thermal plasma technologies: new tools for bio-decontamination. *Biotechnology Advances* 26(6), 610-617.
- Paldrychová, M., Vaňková, E., Scholtz, V., Julák, J., Sembolová, E., Mat'átková, O., Masák, J.** (2019) Effect of non-thermal plasma on AHL-dependent QS systems and biofilm

formation in *Pseudomonas aeruginosa*: Difference between non-hospital and clinical isolates. *AIP Advances* 9(5), 055117.

Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T. (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 189(6), 2531-2539.

Pandey, R., Berendt, A., Athanasou, N., Group, O.C.S. (2000) Histological and microbiological findings in non-infected and infected revision arthroplasty tissues. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 120(10), 570-574.

Rice, S., Koh, K., Queck, S., Labbate, M., Lam, K., Kjelleberg, S. (2005) Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *Journal of bacteriology* 187(10), 3477-3485.

Sakuragi, Y., Kolter, R. (2007) Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 189(14), 5383-5386.

Trautner, B.W., Darouiche, R.O. (2004) Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Archives of internal medicine* 164(8), 842-850.

Triandafillu, K., Balazs, D., Aronsson, B.-O., Descouts, P., Quoc, P.T., van Delden, C., Mathieu, H., Harms, H. (2003) Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to untreated and oxygen-plasma treated poly (vinyl chloride)(PVC) from endotracheal intubation devices. *Biomaterials* 24(8), 1507-1518.

Ueda, A., Wood, T.K. (2009) Connecting Quorum Sensing, c-di-GMP, Pel Polysaccharide, and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* through Tyrosine Phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS pathogens* 5(6), e1000483.

Van Houdt, R., Givskov, M., Michiels, C.W. (2007) Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS microbiology reviews* 31(4), 407-424.

Ziuzina, D., Boehm, D., Patil, S., Cullen, P., Bourke, P. (2015) Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors, e0138209.

Nové přístupy k produkci nanočástic kovů za využití rostlinných extraktů

J. Michailidu, A. Čejková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Velký rozmach nanotechnologií a stále se rozšiřující možnosti potenciálního využití nanočástic kovů v různých odvětvích zapříčinily, že volba konkrétní metody jejich produkce získává na důležitosti, jeliko specifické negativní aspekty těchto metod a z nich plynoucí důsledky mohou mít mnohonásobně větší rozsah. V posledních desetiletích tedy v rámci vědecké obce existuje velká snaha nalézt udržitelnější a levnější metody, jak nanočástice kovů připravovat. Z těchto nových metod získaly velkou pozornost hlavně metody využívající biologické činitele (mikrobiální kultury či lyzáty, rostlinné tkáně, nebo například extrakty). V tomto článku je pozornost věnována hlavně produkci nanočástic stříbra, a to prostřednictvím rostlinných extraktů.

1. Úvod

Obecně uznávaný úzus definuje, že mezi nanočástice řadíme všechny částice, pro které platí, že alespoň jeden jejich rozměr se pohybuje pod hranicí 100 nm. Nanočástice mají právě díky svým rozměrům celou řadu velmi zajímavých charakteristik, typicky zásadně odlišných od daného materiálu v makroměřítku. Nanočástice se vyznačují výjimečnými vlastnostmi, mezi něž řadíme především vysoký poměr povrchu k objemu, porozitu nebo povrchový náboj (a jeho hustotu). Díky tomuto nanočástice vykazují aktivitu, jež mají velký potenciál využití v širokém spektru lidského zkoumání i konání od elektroniky, přes potravinářství a medicínu, až k biotechnologiím (Thakkar et al., 2010).

Tato zvyšující se poptávka po nanočásticích však napomohla odhalit potenciální problém – fyzikálně-chemické cesty výroby kovových nanočástic totiž v mnoha případech zahrnují využití extrémních podmínek, což je energeticky a tedy i finančně náročné. Dalším negativním faktorem fyzikálně-chemických způsobů produkce je také potenciál vzniku toxických produktů

a další ekologické zátěže. Počátek zkoumání možných biotechnologických metod syntézy kovových nanočástic na sebe tedy nenechal dlouho čekat (Schröfel et al., 2014).

V poledních třiceti letech tak bylo objeveno mnoho různých cest, co se biologické syntézy nanočástic kovů týče; použity byly v tomto směru bakterie, kvasinky, houby, aktinomycety i rostliny. Výzkumy byla prokázána úspěšnost tohoto způsobu produkce jak při použití živých kultur nebo tkání, tak při použití bezbuněčných lyzátů či extraktů (Das et al., 2017; Thakkar et al., 2010)(Das et al., 2017; Thakkar et al., 2010). V této práci bude pozornost věnována hlavně využití rostlinných tkání či extraktů.

2. Nanočástice kovů

Nanoobjekty jsou definovány Mezinárodní asociací pro normalizaci (International Organization for Standardization – ISO) jako “objekty, jejichž jeden, dva nebo tři rozměry se pohybují v rámci nanoměřítko (~1-100 nm)” (ISO, 2014). Co se produkce nanočástic kovů týče, existují dvě kategorie, do kterých se dané postupy dají zařadit: “bottom up” procesy zaměřující se na konstrukci nanočástic prakticky atom po atomu, přes klastry až po samotné nanočástice a “top-down” procesy využívající redukcí většího množství surového materiálu, z něhož jsou nanočástice odštěpovány pomocí fyzikálních či chemických metod (Schröfel et al., 2014). Problematickým aspektem fyzikálních procesů, jako jsou například mletí nebo pyrolýza, jsou, jak již bylo řečeno, energetická a tedy i finanční náročnost – produkce nanočástic tímto způsobem je pomalá a je zde potřeba navodit a udržet extrémní teplotu a tlak (Li et al., 2011). Chemické procesy zpravidla probíhající v kapalném prostředí, jsou efektivnější, co se ekonomického hlediska týče; mezi jejich nevýhody však bezpochyby patří kontaminace produktu prekurzorovými chemikáliemi, či využití toxických rozpouštědel a vznik ekotoxických vedlejších produktů (Kim et al., 2007; Mallick et al., 2004; Tan et al., 2003).

Je zde tedy zřetelná poptávka po vývoji levnějších metod, jež nevytvářejí nadměrnou zátěž pro životní prostředí. V tomto směru se velmi nadějně jeví právě biotechnologické přístupy, které využívají mikrobiální či rostlinné kultury a lyzáty, přičemž v dalších kapitolách bude přiblížena hlavně syntéza za pomoci rostlinných extraktů (Thakkar et al., 2010). Mezi nejvýznamnější výhody těchto biologických přístupů oproti těm fyzikálně-chemickým bezpochyby patří schopnost biologických molekul katalyzovat reakce vedoucí ke vzniku nanočástic za standardních tlakových a teplotních podmínek. Naopak negativním aspektem je nutnost následné purifikace nanočástic v kontextu některých specifických aplikací (Schröfel et al., 2014).

2.1 Nanočástice stříbra

Kovové stříbro je lidstvem doložitelně využíváno již zhruba 7000 let; historicky bylo používáno nejen pro výrobu kuchyňského náčiní a mincí ale také pro svou antibakteriální aktivitu. První písemné zmínky se objevují již v díle Herodota, jenž ve svém díle zmiňuje využívání stříbrných nádob pro uchovávání a přenášení vody. Stříbro bylo ve starověku používáno také k uchovávání jídla například Egypťany nebo Římany (Alexander, 2009). Dochovaly se také pozdější zmínky o využívání stříbra pro léčbu popálenin – přístup, který je platný podnes (Klasen, 2000). V první polovině 20. století bylo koloidní stříbro ve vyšších vrstvách I přes nedokonalou znalost toxikologických vlastností dokonce využíváno přímo orálně, což mohlo vést k argyrii, poruchám trávicího traktu a v krajních případech i smrti (Alexander, 2009).

Snaha o využití nanočástic s takto historicky zjevnými antibakteriálními vlastnostmi na sebe tedy nenechala dlouho čekat a v současné době se jejich produkce odhaduje ročně na zhruba 320 tun, jež jsou využity převážně v medicínských zobrazovacích technikách, biosenzorech a mimo jiné také v potravinářství. V době zvyšující se prevalence mikrobiální rezistence jsou nanočástice s biocidní aktivitou proti takovýmto mikroorganismům výraznou pomocí – jejich aktivita byla v tomto směru prokázána již proti mnoha lidským patogenům ze skupiny gramnegativních i grampozitivních bakterií, z nichž jmenujme například *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* či *Pseudomonas aeruginosa* (Chaloupka et al., 2010; Chernousova and Eppler, 2013; Siddiqi et al., 2018; Syafiuddin et al., 2017).

3. Biosyntéza nanočástic kovů

Velká expanze možných využití nanočástic kovů, způsobená jejich unikátními vlastnostmi, způsobila nárůst poptávky a tedy i zvýšené nároky na udržitelnost daných produkčních metod. Různé fyzikální a chemické procesy, jenž jsou v současnosti pro syntézu nanočástic kovů využívány, jsou bohužel náročné z ekologického i finančního hlediska (Gan et al., 2012; Makarov et al., 2014; Narayanan and Sakthivel, 2010; Roco, 2003; Zhang et al., 2008). Zvyšující se obavy o zachovu životního prostředí tedy dovedly vědce k usilovné snaze o nalezení ekologicky a ekonomicky výhodnějších postupů produkce kovových nanočástic; jedná se v tomto případě většinou o tzv. “zelené” metody, tedy biotechnologické postupy využívající mikrobiální buňky/lyzáty nebo rostlinné tkáně a extrakty (Adil et al., 2015).

V posledním desetiletí byla prokázána úspěšná biosyntéza nanočástic kovů za použití mnoha biologických systémů – rostlin, řas, bakterií, kvasinek, plísní a dokonce i lidských buněk

(Anshup et al., 2005; Kowshik et al., 2002; Lengke et al., 2007; Parveen et al., 2016; Rautaray et al., 2003). V rámci těchto metod jsou pro redukci kovových iontů a stabilizaci vznikajících nanočástic obecně využívány biomolekuly, jako jsou proteiny, aminokyseliny, vitamíny, polysacharidy, polyfenoly, terpenoidy a organické kyseliny (např. kyselina citronová) (Adil et al., 2015)(Adil et al., 2015).

Velkým posunem v tomto směru bylo zjištění posledních let, že biosyntetizovat nanočástice kovů za pomoci rostlin lze i in vitro – metody využívající rostlinné extrakty se v současnosti těší velkému zájmu vědecké obce. Tento přístup totiž dovoluje větší kontrolu nad velikostí a tvarem produkovaných nanočástic prostřednictvím změny reakčních podmínek (pH, teplota apod.) a také umožňuje snadnější konečnou purifikaci. Tato metoda produkce nanočástic kovů je mimo to i značně rychlejší, jelikož redukční reakce začínají v homogenizovaném kapalném prostředí prakticky okamžitě po smíchání reakčních činidel (rostlinný extrakt a roztok příslušné kovové soli) (Iravani, 2011).

3.1 Biosyntéza nanočástic stříbra

V rámci biosyntézy nanočástic stříbra bylo již vykonáno mnoho studií na téma mikrobiální produkce. Tyto metody však představují při průmyslové aplikaci značné obtíže, co se týče nutnosti udržení sterility procesu a také udržování kultivačních podmínek vhodných pro daný mikroorganismus. Využití rostlinných extraktů se v tomto směru jeví jako vhodnější varianta (Kalishwaralal et al., 2010). Zkoumání možné přípravy stříbrných nanočástic na sebe tak nenechalo dlouho čekat. Syntéza nanočástic stříbra o průměru 50-100 nm byla prokázána například za využití vodního extraktu *Alternanthera dentate*; celkový čas reakce zde byl pouhých 10 minut a produkované nanočástice vykázaly antibakteriální aktivitu proti *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Enterococcus faecalis* (Kumar and Yadav). Nanočástice syntetizované pomocí extraktu *Boerhaavia diffusa* prokázaly aktivitu proti *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* a *Flavobacterium branchophilum*. XRD a TEM analýza potvrdila přítomnost nanočástic o průměru 25 nm sférického tvaru (Nakkala et al., 2014).

Při honbě za ekologičtějšími cestami syntézy nanočástic stříbra bylo samozřejmě zkoumáno také využití redukčních schopností odpadů z potravinářské výroby. V tomto kontextu byla s úspěchem využita například kůra pomeranče (*Citrus sinensis*). Nanočástice vzniklé tímto způsobem byly sférické a měly průměr 3-12 nm, přičemž nejzastoupenější byly nanočástice s průměrem 6 nm (Veeraaputhiran, 2013). Dále byly nanočástice stříbra krystalické

struktury syntetizovány pomocí vodného extraktu *Origanum vulgare*; byla také prokázána jejich antimikrobiální účinnost proti několika prokaryotním i eukaryotním mikroorganismům – *Shigella sonnei*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternate*, *Paecilomyces variotii*, *Phialophora alba* a dalším (Shaik et al., 2018). Při využití extraktu *Pulicaria glutinosa* bylo zjištěno, že zvýšením teploty inkubace na 90 °C byla zvýšena velikost nanočástic stříbra a také rychlost jejich vzniku. Společně s tím stoupala také rozpustnost vznikajících nanočástic a jejich antimikrobiální aktivita (Khan et al., 2013, 2014).

4. Závěr

Stále se rozšiřující seznam potenciálních využití kovových nanočástic s sebou nese také příslib obrovské poptávky, která se již dnes odhaduje na více než stovky tun nanočástic ročně. Produkce takového množství nanočástic je ale za použití v současnosti využívaných fyzikálních či chemických metod sotva udržitelná. Alternativní cesty využívající živé organismy či jejich části, které s sebou nenesou riziko využití toxických chemikálií či nevýhody ve formě ekonomické a energetické náročnosti, se tedy jeví jako vhodnější volba. Využití rostlinných extraktů je v tomto směru ještě výhodnější, jelikož zde narozdíl od mikrobiální syntézy není potřeba udržovat specifické kultivační podmínky a také zachovávat sterilitu procesu. Tato oblast je nicméně stále poměrně málo prozkoumaná, je tedy záhodno v budoucnu studovat další možné využitelné materiály především z kategorie odpadů.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.21-SVV/2019).

5. Literatura

- Alexander, J.W. (2009). History of the Medical Use of Silver. *Surg. Infect.* 10, 289–292.
- Anshup, A., Venkataraman, J.S., Subramaniam, C., Kumar, R.R., Priya, S., Kumar, T.R.S., Omkumar, R.V., John, A., and Pradeep, T. (2005). Growth of gold nanoparticles in human cells. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 21, 11562–11567.
- Chaloupka, K., Malam, Y., and Seifalian, A.M. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications. *Trends Biotechnol.* 28, 580–588.
- Chernousova, S., and Eppler, M. (2013). Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 1636–1653.
- Das, R.K., Pachapur, V.L., Lonappan, L., Naghdi, M., Pulicharla, R., Maiti, S., Cledon, M., Dalila, L.M.A., Sarma, S.J., and Brar, S.K. (2017). Biological synthesis of metallic nanoparticles:

plants, animals and microbial aspects. *Nanotechnol. Environ. Eng.* 2.

Gan, P.P., Ng, S.H., Huang, Y., and Li, S.F.Y. (2012). Green synthesis of gold nanoparticles using palm oil mill effluent (POME): a low-cost and eco-friendly viable approach. *Bioresour. Technol.* 113, 132–135.

Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem.* 13, 2638–2650.

ISO (2014). 14786:2014 - Nanotechnologies -- Considerations for the development of chemical nomenclature for selected nano-objects.

Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ram Kumar Pandian, S., Kottaisamy, M., BarathManiKanth, S., Kartikeyan, B., and Gurunathan, S. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 77, 257–262.

Khan, M., Khan, M., Adil, S.F., Tahir, M.N., Tremel, W., Alkhathlan, H.Z., Al-Warthan, A., and Siddiqui, M.R.H. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles mediated by *Pulicaria glutinosa* extract. *Int. J. Nanomedicine* 8, 1507–1516.

Khan, M., Khan, S.T., Khan, M., Adil, S.F., Musarrat, J., Al-Khedhairi, A.A., Al-Warthan, A., Siddiqui, M.R.H., and Alkhathlan, H.Z. (2014). Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized using *Pulicaria glutinosa* plant extract as a green bioreductant. *Int. J. Nanomedicine* 9, 3551–3565.

Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.-H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.-Y., et al. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 3, 95–101.

Klasen, H.J. (2000). Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26, 117–130.

Kowshik, M., Deshmukh, N., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S.K., and Paknikar, K.M. (2002). Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 583–588.

Krishnaraj, C., Jagan, E.G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P.T., and Mohan, N. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 76, 50–56.

Kumar, V., and Yadav, S.K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 151–157.

Lengke, M.F., Fleet, M.E., and Southam, G. (2007). Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver(I) nitrate complex. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* 23, 2694–2699.

Li, H., Li, M., Shih, W.Y., Lelkes, P.I., and Shih, W.-H. (2011). Cytotoxicity Tests of Water Soluble ZnS and CdS Quantum Dots. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 3543–3551.

Makarov, V., Love, A., Sinitsyna, O., Makarova, S., Yaminsky, I., Taliany, M., and Kalinina,

N. (2014). “Green” nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae* Англоязычная Версия 6.

Mallick, K., Witcomb, M.J., and Scurrall, M.S. (2004). Polymer stabilized silver nanoparticles: A photochemical synthesis route. *J. Mater. Sci.* 39, 4459–4463.

Nakkala, J.R., Mata, R., Gupta, A.K., and Sadras, S.R. (2014). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their antibacterial activity. *Indus Crop Prod* 52, 562–566.

Narayanan, K.B., and Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Colloid Interface Sci.* 156, 1–13.

Parveen, K., Banse, V., and Ledwani, L. (2016). Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages. p. 020048.

Rautaray, D., Ahmad, A., and Sastry, M. (2003). Biosynthesis of CaCO_3 Crystals of Complex Morphology Using a Fungus and an Actinomycete. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14656–14657.

Roco, M.C. (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 337–346.

Schröfel, A., Kratošová, G., Šafařík, I., Šafaříková, M., Raška, I., and Shor, L.M. (2014). Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – A review. *Acta Biomater.* 10, 4023–4042.

Shaik, M., Khan, M., Kuniyil, M., Al-Warthan, A., Alkhathlan, H., Siddiqui, M., Shaik, J., Ahamed, A., Mahmood, A., Khan, M., et al. (2018). Plant-Extract-Assisted Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Origanum vulgare* L. Extract and Their Microbicidal Activities. *Sustainability* 10, 913.

Siddiqi, K.S., Husen, A., and Rao, R.A.K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J. Nanobiotechnology* 16.

Syafiuddin, A., Salmiati, Salim, M.R., Kueh, A.B.H., Hadibarata, T., and Nur, H. (2017). A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. *J. Chin. Chem. Soc.* 64, 732–756.

Tan, Y., Dai, X., Li, Y., and Zhu, D. (2003). Preparation of gold, platinum, palladium and silver nanoparticles by the reduction of their salts with a weak reductant–potassium bitartrate. *J. Mater. Chem.* 13, 1069–1075.

Thakkar, K.N., Mhatre, S.S., and Parikh, R.Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 6, 257–262.

Veeraputhiran, V. (2013). Bio-catalytic synthesis of silver nanoparticles. 5, 2555–2562.

Zhang, L., Gu, F.X., Chan, J.M., Wang, A.Z., Langer, R.S., and Farokhzad, O.C. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 761–769.

Antibiofilmové účinky anorganické soli COSANu v kombinaci s antibiotiky

Z. Gašparínová, K. Lokočová, E. Vaňková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Kobalt bis-1,2-dikarbolid neboli COSAN (CObaltcarborane Sandwich ANiont) je stabilní anorganická sloučenina, jejíž soli mají antimikrobiální aktivitu a jsou účinné i vůči methicillin resistantním kmenům *Staphylococcus aureus* (MRSA) a multirezistentním kmenům *Pseudomonas aeruginosa*. Z důvodu vzniku a šíření rezistence mikroorganismů vůči antimikrobiálním látkám jsou studovány možnosti využití látek jako je COSAN k podpoře účinku současných léčiv.

1. Biofilm

Rozmanité druhy bakterií mají schopnost zachytit se na površích různých materiálů a vytvářet kolonie, obklopené extracelulárními polymerními látkami (EPS), odborně nazývané biofilm. Evolučně byla tvorba biofilmu výhodná pro udržení stálých podmínek pro optimální růst bakterií v extrémních podmínkách (teplota, pH, salinita, přítomnost těžkých kovů, UV záření), a také zde byl možný vývoj signálních drah. S biofilmy se můžeme setkat v přírodě (především ve vodních ekosystémech) i v lidském těle, kde nejznámějším příkladem je zubní plak (Donlan a Costerton, 2002; Hall-Stoodley a kol., 2004).

Pokud biofilm tvoří patogenní bakterie, představuje tato forma života, kvůli zvýšené odolnosti biofilmů vůči imunitnímu systému hostitele a antibiotikům, komplikace při léčbě vznikajících infekcí. Důvodem je například snížená penetrace a difuze účinných látek biofilmem, která se vztahuje především na reaktivní (superoxid), nabité (kovy) a velké (imunoglobuliny) antimikrobiální látky. Také mechanismus účinku většiny antibiotik je cílen na metabolizující buňky, ale v biofilmu (především ve spodních vrstvách) se nacházejí i bakterie se značně sníženou nebo téměř zastavenou metabolickou aktivitou, které terapii odolají a mohou být základem pro nové kolonie. Biofilmy se běžně tvoří na katetrech, kloubních náhradách nebo jako komplikace chronických onemocnění (např. cystická fibróza, osteomyelitida), které mohou zásadně zhoršit zdravotní stav pacienta (Costerton a kol., 1999; Donlan a Costerton, 2002; Hall-Stoodley a kol., 2004; Hoiby a kol., 2010; Mah a O'Toole, 2001).

2. *Staphylococcus epidermidis*

Koaguláza negativní *S. epidermidis* patří mezi významné oportunně patogenní bakterie a je častým původcem nosokominálních (v nemocnici získaných) infekcí. Na rozdíl od *Staphylococcus aureus* produkuje méně toxinů a způsobuje spíše chronické infekce, které ohrožují především pacienty se sníženou imunitou, novorozence a starší osoby. Tato bakterie je také hlavním původcem neonatální sepse (zánět spojený s rozšířením mikroorganismů krevním řečištěm po celém těle a s agresivní imunitní reakcí u novorozenců, laicky nazývaný jako otrava krve) a katetrových sepsí (záněty zapříčiněné zavedením kontaminovaného katetru). Mnoho kmenů je rezistentních nebo multirezistentních vůči antimikrobiálním léčivům a většina kmenů dokáže také tvořit biofilm (Cherifi a kol., 2013; Malfertheiner a kol., 2017; Otto, 2013).

3. Antibiotika

3.1 Tetracyklin

Tetracykliny jsou první objevená širokospektrá antibiotika působící na grampozitivní a gramnegativní bakterie, chlamydie, mykoplazmata a prvoky. Základním strukturním prvkem jsou 4 lineárně propojené šestičlenné uhlíkaté kruhy, z toho jeden aromatický. Tetracyklin patří do první generace této skupiny antibiotik, zástupcem druhé generace je například minecyclylin a doxycyclylin a třetí generace je tvořena glycyclykliny. Tetracyklin je produkován bakteriemi *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus*, a *Streptomyces viridofaciens*. Mechanismem účinku je inhibice nasazení tRNA na 70S ribozom obsazením akceptorového místa za účasti Mg^{2+} , tudíž nemůže dojít ke vzniku peptidové vazby a translaci proteinu. Tetracykliny mají především bakteriostatický účinek (Chopra a Roberts, 2001; Thaker a kol., 2010).

3.2 Erythromycin

Erythromycin patří mezi makrolidová antibiotika, která působí především proti grampozitivním bakteriím rodu *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Diplococcus*. Účinkují však i proti některým gramnegativním bakteriím jako *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitis*, *Haemophilus influenzae* a *Mycoplasma* spp. Jsou tvořeny 12, 14, 15 nebo 16členným laktonovým kruhem, ke kterému má většina zástupců připojen jeden nebo více aminosacharidů pomocí glykosidové vazby. Erythromycin je produkován bakterií *Streptomyces erythraeus* (Dinos, 2017; Fernandes a kol., 2017).

Mechanismus účinku je u všech zástupců makrolidových antibiotik založen na vazbě antibiotika na velkou 23S ribozomální podjednotku a allosterickou modifikací peptidyl-transferázového centra, které pak nedokáže katalyzovat vznik peptidové vazby. Některé peptidy

se specifickým N-koncem však mohou být translatovány i za přítomnosti makrolidového antibiotika. Tento jev zatím není podrobně popsán (Dinos, 2017; Pavlova a kol., 2017).

3.3 Vankomycin

Vankomycin je glykopeptidové antibiotikum poprvé izolované v roce 1956 z *Amycolatopsis orientalis*. Používá se při léčbě infekcí způsobených gram pozitivními bakteriemi, které jsou rezistentní vůči jiným skupinám antibiotik, např. β -laktamům. Vankomycin je tvořen sedmi aminokyselinami, z toho 5 aromatických, a jedním disacharidem připojeným na fenolickém kyslíku fenylalaninu (Kahne a kol., 2005; Nicolaou a kol., 1999; Van Bambeke a kol., 2004).

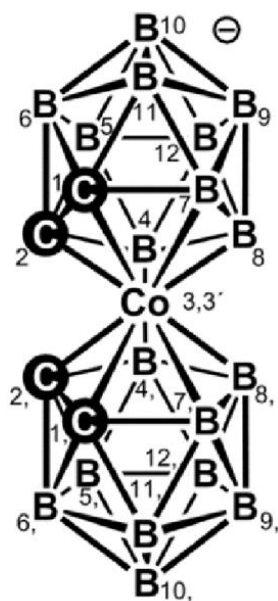
Mechanismus účinku vankomycinu spočívá v jeho reversibilní vazbě na koncový D-Ala-D-Ala úsek prekurzorů peptidoglykanu a v zabránění transglykosidaci a transpeptidaci vedoucí k rozpadu peptidoglykanu a buněčné smrti. Účinnost může být zesílena tvorbou homodimerů (např. vankomycin, eremomycin), která usnadňuje vazbu antibiotika k cílové struktuře, anebo schopností některých zástupců glykoproteinů začlenit se do fosfolipidové dvouvrstvy a zajistit tak výskyt léčiva v blízkosti cílové struktury (Kahne a kol., 2005; Nicolaou a kol., 1999; Van Bambeke a kol., 2004).

4. Možnosti kombinace antibiotik s jinými látkami

S rostoucím množstvím rezistentních kmenů bakterií je zvýšená poptávka po nových antibioticích, ale tempo výzkumu a vývoje zcela nových látek naopak zpomaluje. Běžnou možností léčby infekcí způsobených rezistentními kmeny je kombinační terapie, která se ale s nárůstem počtu rezistencí postupně omezuje. V současné době jsou studovány různorodé typy látek (přírodní látky, léčiva jiných terapeutických skupin, nanočástice apod.) pro potencionální synergické působení v kombinaci s antibiotiky, ke kterým je rozšířena rezistence (Li a kol., 2005; Otto a kol., 2019; Palaniappan a Holley, 2010).

5. Kobalt bis-1,2-dikarbolid (COSAN)

Komplexní anion bóru, kobalt bis-1,2-dikarbolid monoanion neboli COSAN (CObaltcarborane Sandwich ANiont), je tvořen centrálním atomem kobaltu spojujícím dva karboranové klastry (Obr. 1). Celá molekula vykazuje negativní náboj a zároveň nevazebné intramolekulární interakce mezi B-H a C-H vazbami, díky čemuž má amfifilní charakter. COSAN je tedy rozpustný ve vodě i v tucích a tvoří jednovrstevné váčky a micely připomínající fosfolipidovou dvouvrstvu. Dokáže procházet buněčnou membránou kinetikou nultého řádu a akumulovat se zde (Tarres a kol., 2015; Tarres a kol., 2014).



Obr. 1: Struktura COSANu, převzato z Kvasnickova a kol. (2017).

Od základní struktury COSANu je možné syntetizovat širokou škálu derivátů připojením různých funkčních skupin na uhlíkové atomy nebo atomy boru. Chemické vlastnosti a potencionální využití těchto derivátů je více prostudováno než u originální struktury. Deriváty s lipofilním etherem na prvním a methylovou skupinou na druhém uhlíku u obou karboranových klastrů byly testovány při extrakci ^{152}Eu z jaderného odpadu a některé byly účinnější než v současnosti používané kalixareny. Je možné připravit deriváty s diagnostickými radionuklidy a využít je jako radiofarmaka nebo biologické sondy (Dash a kol., 2017; Valliant a kol., 2002).

Odolnost a stabilita vůči chemickým i biologickým vlivům a možnost různých modifikací jsou důvodem snahy o využití COSANu a jeho derivátů k farmakologickým účelům. Soli COSANu vykazují antimikrobiální aktivitu (Kvasnicková a kol., 2017) a jsou účinné i vůči MRSA a multirezistentním kmenům *P. aeruginosa* (Popova a kol., 2013).

Popova a kol. (2013) studovali účinek sedmi derivátů COSANu na 4 druhy bakterií (*S. aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *E. coli* a *P. aeruginosa*), a porovnávali jej s působením běžně používaného antibiotika thiamfenikolu. U nejúčinnějšího derivátu se hodnoty MIC₅₀ (MIC, která sníží aktivitu buněk o 50 %) pohybovaly v rozmezí 2,5–10,1 mg/l, zatímco pro thiamfenikol představovaly 12–21,3 mg/l.

Kvasničková a kol. (2017) testovali účinek sedmi alkylamoných derivátů COSANu na grampozitivní a gramnegativní bakterie (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*). U všech derivátů byla MIC₈₀ stanovena na hodnoty vyšší než MIC₈₀ kontrolních antibiotik (erythromycinu a polymyxinu B).

Mechanismus účinku COSANu na mikroorganismy zatím není znám, ale pravděpodobně není založen na inhibici syntézy buněčné stěny, protože působí inhibičně na růst gramnegativních i grampozitivních bakterií (Popova a kol., 2013).

Poděkování

Tato práce byla realizována v rámci “Operačního programu Praha - Konkurenceschopnost” (CZ.2.16/3.1.00/24503) za podpory “Národního programu udržitelnosti I” - NPU I LO1601.

6 Literatura

- Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P., (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284, str. 1318-1322
- Dash, B. P., Satapathy, R., Swain, B. R., Mahanta, C. S., Jena, B. B. and Hosmane, N. S., (2017) Cobalt bis(dicarbollide) anion and its derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry*, 849-850, str. 170-194
- Dinos, G. P., (2017) The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology*, 174, str. 2967-2983
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W., (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, str. 167-+
- Fernandes, P., Martens, E. and Pereira, D., (2017) Nature nurtures the design of new semi-synthetic macrolide antibiotics. *Journal of Antibiotics*, 70, str. 527-533
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. and Stoodley, P., (2004) Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2, str. 95-108
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. and Ciofu, O., (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, str. 322-332
- Cherifi, S., Byl, B., Deplano, A., Nonhoff, C., Denis, O. and Hallin, M., (2013) Comparative Epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* Isolates from Patients with Catheter-Related Bacteremia and from Healthy Volunteers. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, str. 1541-1547
- Chopra, I. and Roberts, M., (2001) Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, str. 232-260
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Wei, L. and Walsh, C., (2005) Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chemical Reviews*, 105, str. 425-448

- Kvasnickova, E., Masak, J., Cejka, J., Matatkova, O. and Sicha, V., (2017) Preparation, characterization, and the selective antimicrobial activity of N-alkylammonium 8-diethyleneglycol cobalt bis-dicarbollide derivatives. *Journal of Organometallic Chemistry*, 827, str. 23-31
- Li, P., Li, J., Wu, C. Z., Wu, Q. S. and Li, J., (2005) Synergistic antibacterial effects of beta-lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16, str. 1912-1917
- Mah, T. F. C. and O'Toole, G. A., (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9, str. 34-39
- Malfertheiner, S. F., Wendt, S., Layer, F., Weigl, M., Seelbach-Gobel, B., Konig, W. and Konig, B., (2017) Prevalence, clonality, and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* isolates in newborn feces. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36, str. 1955-1964
- Nicolaou, K. C., Boddy, C. N. C., Brase, S. and Winssinger, N., (1999) Chemistry, biology, and medicine of the glycopeptide antibiotics. *Angewandte Chemie-International Edition*, 38, str. 2096-2152
- Otto, M., (2013) Coagulase-negative *Staphylococci* as reservoirs of genes facilitating MRSA infection. *Bioessays*, 35, str. 4-11
- Otto, R. G., van Gorp, E., Kloezen, W., Meletiadis, J., van den Berg, S. and Mouton, J. W., (2019) An alternative strategy for combination therapy: Interactions between polymyxin B and non-antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53, str. 34-39
- Palaniappan, K. and Holley, R. A., (2010) Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 140, str. 164-168
- Pavlova, A., Parks, J. M., Oyelere, A. K. and Gumbart, J. C., (2017) Toward the rational design of macrolide antibiotics to combat resistance. *Chemical Biology & Drug Design*, 90, str. 641-652
- Popova, T., Zaulet, A., Teixidor, F., Alexandrova, R. and Vinas, C., (2013) Investigations on antimicrobial activity of cobaltabisdicarbollides. *Journal of Organometallic Chemistry*, 747, str. 229-234
- Tarres, M., Canetta, E., Paul, E., Forbes, J., Azzouni, K., Vinas, C., Teixidor, F. and Harwood, A. J., (2015) Biological interaction of living cells with COSAN-based synthetic vesicles. *Scientific Reports*, 5, str. DOI 10.1038/srep07804
- Tarres, M., Canetta, E., Vinas, C., Teixidor, F. and Harwood, A. J., (2014) Imaging in living cells using nu B-H Raman spectroscopy: monitoring COSAN uptake. *Chemical Communications*, 50, str. 3370-3372
- Thaker, M., Spanogiannopoulos, P. and Wright, G. D., (2010) The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, str. 419-431
- Valliant, J. F., Guenther, K. J., King, A. S., Morel, P., Schaffer, P., Sogbein, O. O. and Stephenson, K. A., (2002) The medicinal chemistry of carboranes. *Coordination Chemistry Reviews*, 232, str. 173-230
- Van Bambeke, F., Van Laethem, Y., Courvalin, P. and Tulkens, P. M., (2004) Glycopeptide antibiotics from conventional molecules to new derivatives. *Drugs*, 64, str. 913-936

Identifikace a studium markerů piv zrajících ve dřevě

M. Lazarová, M. Karabín, J. Nešpor

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Zrání ve dřevě, technika používaná nejčastěji při výrobě whisky, vína a dalších alkoholických nápojů, je v poslední době využívána také při výrobě piva. Tradiční způsob zrání s využitím dřevěných sudů je však velmi nákladný, a proto je v současné době stále více používán alternativní způsob zrání piva s dřevěnými fragmenty, u kterých je však nutné posoudit, zda dochází k účinnému přestupu senzoryicky aktivních látek dřeva do piva, a čím je tento děj ovlivňován. V rámci této práce bylo zjištěno, že i přes nízký obsah alkoholu v pivě dochází i po relativně krátké době k účinné extrakci markerů dřeva, kterými jsou především dubové laktony, fenolové a furanové aldehydy, a kyselina gallová, do piva. Jejich výsledný profil je nicméně výrazně ovlivněn druhem dřeva a mírou jeho opálení. Širší spektrum sloučenin je extrahováno při použití středně opáleného dřeva, zatímco při aplikaci silně opáleného dřeva jsou extrahovány zejména deriváty guajakolu a syringolu zodpovědné za kouřové aroma. Použitím dřeva francouzského dubu bylo dosaženo vyšších koncentrací furanových aldehydů a kyseliny gallové, americký dub vnáší do piva naopak větší množství dubových laktonů. Při použití této techniky v reálných podmínkách během dokvašování, bylo prokázáno, že spektrum stanovovaných markerů je ovlivněno také přítomnými kvasinkami, které mají na výsledné aroma spíše negativní vliv, jelikož některé z nich (furfural, vanilín) přeměňují na jinak, či méně, senzoryicky aktivní sloučeniny.

Možnosti studia virulence patogenních mikroorganismů

P. Kašparová, O. Mařátková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Vzhledem k rostoucí antimikrobiální rezistenci mikroorganismů je velký zájem studovat látky, které by mohly lépe regulovat infekčnost daných patogenů. Jedním z moderních přístupů je využití látek potlačujících virulenci. Virulence mikroorganismů je schopnost mikroorganismů účinně se vyhnout účinkům lidské imunity, vyvolat v těle infekci a dále ji rozvíjet. Je zprostředkována produkcí tzv. virulenčních faktorů, které jsou zodpovědné za charakteristické vedlejší projevy infekčních onemocnění.

Tato práce se zabývá zhodnocením virulence patogenů rodu *Staphylococcus* a rodu *Candida* a možnostmi studia virulenčních faktorů těmito mikroorganismy produkovaných. Bylo zavedeno několik různých metod pro stanovení těchto faktorů, které lze využít ke studiu potenciálního anti-virulenčního účinku přírodních látek.

1. Úvod

Rozvoj antimikrobiální rezistence u běžných patogenních mikroorganismů se natolik rozšířil, že již nestačí zavádění nových tříd antibiotik k účinné regulaci chorob způsobených těmito multi-rezistentními patogeny, jako jsou např. methicillin-rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus*, multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa*, vankomycin-rezistentní enterokoky nebo flukonazol-rezistentní *Candida albicans* (Anderl a kol., 2000; Livermore, 2000; Werner a kol., 2013). Je velká snaha nalézt nový způsob jak tyto patogeny likvidovat. Velká část farmaceutického výzkumu se proto zaměřuje na látky utlumující tzv. virulenci těchto patogenů (Barczak a Hung, 2009). Použití anti-virulenčních látek by tak mohlo významně pomoci proti mnohým patogenům, ze kterých by se díky použití těchto léčiv mohly stát naprosto neškodné avirulentní organismy (Johnson a Abramovitch, 2017). Tato práce se proto zabývá zhodnocením virulence jako potenciálního cíle nové generace farmaceutik a možnostmi studia virulenčních faktorů rodu *Staphylococcus* a rodu *Candida*.

2. Virulence mikroorganismů

Virulence je schopnost mikroorganismů odolávat účinkům lidské imunity a vyvolat a dále v lidském těle rozvíjet infekci. Je charakterizována produkcí nejrozličnějších virulenčních faktorů, které zvyšují odolnost patogenů proti vlivům lidského organismu, narušují tkáň a podporují kolonizaci nových míst v hostiteli (Haynes, 2001). Existuje několik tříd virulenčních faktorů mezi které patří toxiny, hydrolytické enzymy, sekreční systémy a další (Defoirdt, 2018). Důležitým virulenčním faktorem je také schopnost adherence buněk a tvorba biofilmu a extracelulární matrix, která buňky chrání např. před fagocytózou bílými krvinkami (Saising a kol., 2012; Xu a kol., 2006). Různé virulenční faktory jsou vyjmenovány v tabulce (Tab. 1).

Tab. I: Skupiny virulenčních faktorů s uvedenými příklady.

Virulenční faktory	příklad
Toxiny	enterotoxiny, cholera toxin, candidalysin, botulotoxin, tetanospasmin
Hydrolasy	serinové proteasy, fosfolipasy, hemolysiny, coagulasa, staphylokinasa
Tvorba biofilmu a kapsul	
Siderofory	pyoverdin, staphyloferriny
Sekreční systémy	
Quorum sensing	acylhomoserinové laktony, farnesol/tyrosol, systémy Las, Lux, Rhl

Toxiny jsou většinou látky oligopeptidové povahy schopné rozrušit tkáň hostitele a významně ovlivnit jeho fyziologické funkce. V extrémních případech mohou vést až k úmrtí hostitelského organismu (Barczak a Hung, 2009). Na rozdíl od ostatních virulenčních faktorů mohou ublížit hostiteli i bez přítomnosti daných patogenních buněk a proto jsou častou příčinou potravinových otrav. Významnými producenty toxinů jsou např. *Staphylococcus aureus* (enterotoxiny, TSST-1, hemolysiny), patogenní druhy *Clostridium* (botulotoxin, tetanospasmin), *Candida albicans* (candidalysin, hemolysiny), *Corynebacterium diphtheriae* (záškrtový toxin), *Vibrio cholerae* (cholera toxin) a mnoho dalších (Balaban a Rasooly, 2000; Barczak a Hung, 2009). Některé toxiny lze zařadit i do další skupiny hydrolytických enzymů. Ty působí zdánlivě obdobně jako toxiny. Taktéž rozrušují tkáň hostitele především pro získání potřebných nutrientů ale také za účelem překonání membránových bariér v těle (Barczak a Hung, 2009; Defoirdt, 2018). Umožňují tak patogenu dále kolonizovat doposud neosídlené tkáně. Mezi tyto enzymy patří široká škála virulenčních faktorů jako jsou proteasy, elastasy, lipasy, fosfolipasy, coagulasa a mnoho dalších (Rohde a kol., 2005; Saising a kol., 2012; von Eiff a kol., 2002). Důležitým aspektem virulence je v kontextu hydrolas také hemolýza. Hemolýza představuje rozštěpení erythrocytů pomocí působení hemolysinu. Podle produkovaného druhu hemolysinu lze hemolýzu rozdělit na tři typy: α , β a γ (Duan a kol., 2018; Lee a kol., 2014; Tang a kol., 2019). Nejvýznamnějším typem je hemolýza typu β zodpovědná za kompletní rozštěpení erythrocytů za vzniku průhledných zón na krevním agaru. Mezi typické β -hemolytické mikroorganismy patří jednoznačně *S. aureus*, dále *C. albicans*, orální streptokoky a další. Mnoho dalších organismů produkuje také hemolysiny typu α či γ (např. *S. epidermidis*). Význam těchto hemolysinů je však v porovnání s typem β značně pomíjivý. Využívá se jich především pro fenotypovou identifikaci klinických izolátů a pro kvalitativní zhodnocení patogenity daného kmene.

Pro virulenci a celkově patogenitu mikroorganismů je důležitá také schopnost tvořit biofilm. Biofilm výrazně zvyšuje odolnost buněk v něm obsažených proti působení antimikrobiálních látek a umožňuje účinnější kolonizaci infikované tkáně (Costerton a kol., 1999). Pro charakterizaci produkce biofilmu je důležité množství produkované matrix a případně tvorba kapsul buňkami v biofilmu (Hauck a Ohlsen, 2006; Sousa a kol., 2009). Buňky produkující nadměrné množství matrix jsou výrazně odolnější k vlivům organismu a jejich eradikace pomocí imunity hostitele či podpůrné antimikrobiální terapie je velmi komplikovaná až nemožná (Arciola a kol., 2012; Mah a O'Toole, 2001). Tvorba biofilmu výrazně komplikuje život imunosuprimovaným pacientům a její význam je značný také v oblasti katetrizace a implantace biomateriálů do těla. Jedná se proto o významný virulenční faktor, který nesmí být podceněn (Arciola a kol., 2012).

Virulenční faktory představují v mnoha případech značně komplikované látky, jejichž produkce je pochopitelně velmi energeticky náročná (Defoirdt, 2018; Juhas a kol., 2005; Pesci a Iglewski, 1997; Xu a kol., 2006). Z toho důvodu syntéza těchto látek podléhá komplexní regulaci pomocí systému intercelulární komunikace quorum sensing. V mnoha publikacích je samo quorum sensing resp. signální molekuly, které jsou za něj zodpovědné, považovány za virulenční faktory mikroorganismů (Baron, 2010; Defoirdt, 2018; Juhas a kol., 2005).

3. Možnosti studia virulence

Virulenci lze studovat dvěma způsoby. Buď lze sledovat přímo genovou expresi daných genů pro virulenční faktory pomocí metod molekulární biologie nebo lze sledovat fenotypové projevy spojené s produkcí daných virulenčních faktorů tedy exprese jejich genů pomocí jednoduchých tradičních mikrobiologických metod.

3.1 Sledování genotypu

Virulentní genotyp mikroorganismů lze sledovat pomocí klasických metod molekulární biologie jako je polymerasová řetězová reakce nebo pomocí gelových elektroforetických metod. Taková stanovení často vyžadují nákladné přístrojové vybavení a drahé materiály pro jednotlivá stanovení. Pokud se nejedná vyloženě o stanovení mRNA pro dané virulenční faktory, poskytují tyto metody pouze informaci o existenci daného genu v genomu příslušného mikroorganismu nikoliv o míře jeho exprese.

3.2 Sledování fenotypu

Při sledování fenotypu se zaměřujeme na přímé důsledky produkce daných virulenčních faktorů nebo přímo stanovujeme daný faktor. Tato měření tak poskytují informace o skutečné míře produkce a vlivech daných virulenčních faktorů. Navíc se mnohdy jedná o velmi jednoduché a rychlé metody stanovení, což umožňuje plošný screening mnoha mikroorganismů a případně i látek, které by jejich virulenci mohly potlačit.

3.2.2 Stanovení extracelulárních hydrolas na agaru

V této práci byly vyvinuty metody pro stanovení extracelulárních hydrolas na diagnostických agarech suplementovaných příslušnými substráty pro dané hydrolasy. Experimenty byly provedeny tak, že suspenze buněk byla injikována v objemu 5 μ l do agaru a následně inkubovány po předem stanovenou dobu. Byly stanovovány proteasy, lipasy, fosfolipasy a hemolysiny u mikroorganismů *S. aureus*, *S. epidermidis* a *C. albicans* (Saising a kol., 2012). Složení agarů, doby a výsledky kultivací jsou uvedeny v tabulce (Tab. II).

3.2.3 Kolorimetrické stanovení hemolýzy

Dalším velmi jednoduchým typem stanovení virulentního fenotypu je kolorimetrie. V této práci byla využita pro stanovení hemolýzy. Slizený supernatant po kultivaci buněk byl smíchán se defibrinovanou beranní krví v poměru 1:1 a inkubován 16 h. Po inkubaci byla směs supernatantu s krví naředěna v poměru 1:9 s fyziologickým roztokem a změřena na spektrofotometru při 540 nm. Výsledky byly na základě lineární regrese s hodnotami pozitivní a negativní kontroly převedeny na procenta hemolýzy. Jako pozitivní kontrola byl použit 2%

roztok SDS (aq) a jako negativní kontrola byl použit fyziologický roztok (Bandeira a kol., 2018; Tao a kol., 1999).

Tab. II: Stanovení extracelulárních hydrolas zástupců rodu *Staphylococcus* a *Candida* pomocí diagnostických agarů. BSA – bovinní sérový albumín

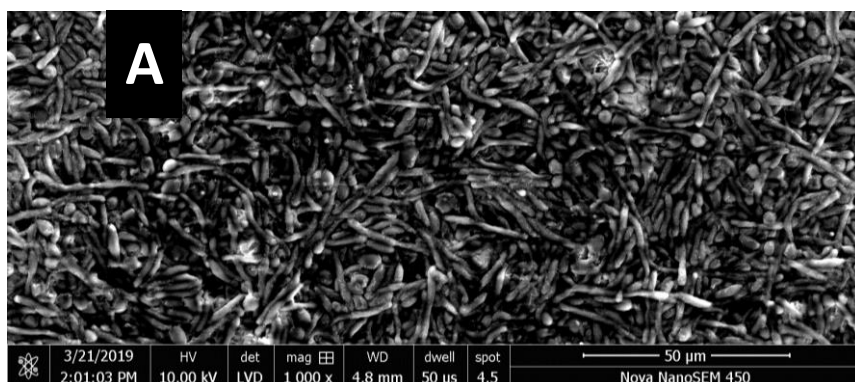
Enzym	Mikroorganismus	Typ agaru	Vzniklá zóna
Proteasy	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	Mléčný agar	Průhledná zóna
	<i>C. albicans</i>	BSA agar	Precipitační zóna
Lipasy	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	Tributylinový agar	Opalescentní zóna
Fosfolipasy	<i>C. albicans</i>	Žloutkový agar	Precipitační zóna
Hemolysiny	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	Krevní agar	Průhledná zóna
	<i>C. albicans</i>	Sabouraudův krevní agar	Průhledná zóna

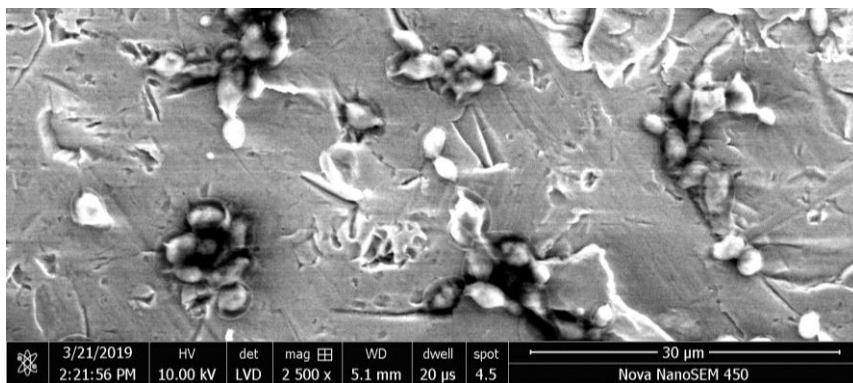
3.2.4 Vizualizace pomocí mikroskopie

Expres virulenčních faktorů a celkově virulentní fenotyp se často projeví i v morfologii buněk, která je nejlépe patrná u kvasinek. Lze tak např. sledovat vliv některých látek na tvorbu hyf daných kvasinek. Hyfogeneze je významným virulenčním faktorem zástupců rodu *Candida* (Yang a kol., 2018). Vliv látek na tvorbu hyf lze sledovat všemi typy mikroskopie, přičemž nejúčinnější jsou hlavně fluorescenční konfokální mikroskopie nebo elektronová mikroskopie. Příklad sledování vlivu látky na tvorbu biofilmu a hyfogenezi je uveden na obrázku (Obr. 1).

4. Závěr

Virulence mikroorganismů představují slibný cíl pro novou generaci antimikrobiálních léčiv. Pro studium těchto látek je potřeba jednoduchých a rychlých metod stanovení virulenčních faktorů. V této práci bylo zavedeno několik metod pro stanovení faktorů virulence zástupců rodu *Staphylococcus* a *Candida*. Tyto metody budou využity pro studium biologicky aktivních látek přírodního původu, které by mohly mít anti-virulentní potenciál. Na základě výsledků získaných pomocí těchto metod budou moci být také vysloveny hypotézy o mechanismu účinku takových látek.





Obr. 1: Snímky ze skenovacího laserového mikroskopu znázorňující hustý hyfami protkaný biofilm *C. albicans* (A) a torzo biofilmu bez přítomnosti hyf stejného mikroorganismu po vystavení subletální koncentraci vhodné anti-virulentní látky (B).

Poděkování

Tato práce byla realizována za podpory Grantové agentury České republiky, projekt 17-15936S.

5. Literatura

- Anderl, J. N., Franklin, M. J., Stewart, P. S. (2000): Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 (7), str. 1818–1824
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., Costerton, J. W. (2012): Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, *Biomaterials*, 33 (26), str. 5967-5982
- Balaban, N., Rasooly, A. (2000): Staphylococcal enterotoxins, *Int. J. Food Microbiol.*, 61 (1), str. 1-10
- Bandeira, G., Sutili, F. J., Gressler, L. T., Ely, V. L., Silveira, B. P., Tasca, C., Reghelin, M., Matter, L. B., Vargas, A. P. C., Baldisserotto, B. (2018): Antibacterial potential of phytochemicals alone or in combination with antimicrobials against fish pathogenic bacteria, *J. Appl. Microbiol.*, 125 (3), str. 655-665
- Barczak, A. K., Hung, D. T. (2009): Productive steps toward an antimicrobial targeting virulence, *Curr. Opin. Microbiol.*, 12 (5), str. 490-496
- Baron, C. (2010): Antivirulence drugs to target bacterial secretion systems, *Current Opinion in Microbiology*, 13 (1), str. 100-105
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999): Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, *Science*, 284 (5418), str. 1318-1322
- Defoirdt, T. (2018): Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy, *Trends Microbiol.*, 26 (4), str. 313-328
- Duan, J. J., Li, M. L., Hao, Z. H., Shen, X. F., Liu, L., Jin, Y., Wang, S. S., Guo, Y. J., Yang, L. H., Wang, L. X., Yu, F. Y. (2018): Subinhibitory concentrations of resveratrol reduce alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates by downregulating *saeRS*, *Emerging Microbes & Infections*, 7,
- Hauck, C. R., Ohlsen, K. (2006): Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*, *Curr. Opin. Microbiol.*, 9 (1), str. 5-11
- Haynes, K. (2001): Virulence in *Candida* species, *Trends Microbiol.*, 9 (12), str. 591-596
- Johnson, B. K., Abramovitch, R. B. (2017): Small Molecules That Sabotage Bacterial Virulence, *Trends in Pharmacological Sciences*, 38 (4), str. 339-362

- Juhas, M., Eberl, L., Tummeler, B. (2005): Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*, Environ. Microb., 7 (4), str. 459-471
- Lee, K., Lee, J. H., Ryu, S. Y., Cho, M. H., Lee, J. (2014): Stilbenes Reduce *Staphylococcus aureus* Hemolysis, Biofilm Formation, and Virulence, Foodborne Pathog. Dis., 11 (9), str. 710-717
- Livermore, D. M. (2000): Antibiotic resistance in staphylococci, Int. J. Antimicrob. Agents, 16, str. S3-S10
- Mah, T. F. C., O'Toole, G. A. (2001): Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, Trends Microbiol., 9 (1), str. 34-39
- Pesci, E. C., Iglewski, B. H. (1997): The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing, Trends Microbiol., 5 (4), str. 132-134
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K. M., Heilmann, C., Herrmann, M., Mack, D. (2005): Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases, Mol. Microbiol., 55 (6), str. 1883-1895
- Saising, J., Singdam, S., Ongsakul, M., Voravuthikunchai, S. P. (2012): Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acne lesions, Biosci.Trends, 6 (4), str. 160-164
- Sousa, C., Henriques, M., Teixeira, P., Oliveira, R. (2009): Relevance of Cell Wall and Extracellular Matrix Proteins to *Staphylococcus Epidermidis* Adhesion and Biofilm Formation, J. Adhes. Sci. Technol., 23 (12), str. 1657-1671
- Tang, F., Li, L., Meng, X. M., Li, B., Wang, C. Q., Wang, S. Q., Wang, T. L., Tian, Y. M. (2019): Inhibition of alpha-hemolysin expression by resveratrol attenuates *Staphylococcus aureus* virulence, Microbial Pathogenesis, 127, str. 85-90
- Tao, M., Yamashita, H., Watanabe, K., Nagatake, T. (1999): Possible virulence factors of *Staphylococcus aureus* in a mouse septic model, Fems Immunol. Med. Microbiol., 23 (2), str. 135-146
- von Eiff, C., Peters, G., Heilmann, C. (2002): Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci, Lancet Infect. Dis., 2 (11), str. 677-685
- Werner, G., Coque, T. M., Franz, C., Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., van Schaik, W., Weaver, K. (2013): Antibiotic resistant enterococci-Tales of a drug resistance gene trafficker, Int. J. Med. Microbiol., 303 (6-7), str. 360-379
- Xu, L., Li, H. L., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J. P., Yao, Y. F., Otto, M., Gao, Q. (2006): Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*, Infect. Immun., 74 (1), str. 488-496
- Yang, L. F., Liu, X., Lv, L. L., Ma, Z. M., Feng, X. C., Ma, T. H. (2018): Dracorhodin perchlorate inhibits biofilm formation and virulence factors of *Candida albicans*, Journal De Mycologie Medicale, 28 (1), str. 36-44

Inhibice tvorby biofilmu biologicky aktivními látkami

D. Simonová, K. Lokočová, O. Mařátková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Mikroorganismy se mohou vyskytovat jako samostatně rostoucí buňky, ale jsou také schopné adheze na nejrůznější biotické a abiotické povrchy, na nichž tvoří biofilm. Významnou roli při tvorbě bakteriálního biofilmu u mnoha mikroorganismů hrají lektiny. Lektiny jsou skupina proteinů účastníci se procesu patogeneze díky své schopnosti vázat buňky mezi sebou, sacharidy obsažené v biofilmové matrix i sacharidy obsažené na povrchu hostitelských buněk.

Základem této práce je předpoklad, že pokud by byla inhibována schopnost patogenních mikroorganismů vázat se na sacharidy hostitelských buněk, následovala by inhibice tvorby biofilmu. Mezi látky, které ovlivňují vazbu lektinů na sacharidy hostitelské buňky, patří i polyvalentní glykomimetika. Polyvalentní glykomimetika jsou látky, které imitují funkční sacharidy, a jejich vysoká afinita zapřičiňuje preferenční vazbu k vybraným lektinům. Tímto zabraňují patogenním mikroorganismům se navázat na sacharidy přítomné na povrchu hostitelské buňky. Mezi zástupce polyvalentních glykomimetik patří konjugáty kalixarenů či konjugáty pillararenů. Tyto konjugáty jsou prokázány inhibitory lektinů.

1. Lektiny

Bakterie mohou kolonizovat hostitele a způsobovat onemocnění díky jejich schopnosti adherovat na hostitelskou buňku či tkáň. Adheze je důležitá, aby nedocházelo k odstranění mikroorganismů z povrchu přirozeným obranným mechanismem, jako je dýchání či proudění tělních tekutin. Dále adheze ulehčuje mikroorganismům přístup k výživě a usnadňuje dopravu toxických agens do tkání v organismu. Jedním z nejznámějších mediátorů pro adhezi jsou lektiny (Sharon, 2006). Lektiny jsou látky přítomné v mnoha různých organismech, počínaje viry, přes bakterie až po rostlinné a živočišné buňky. Jedná se o oligomerní proteiny, které jsou značně různorodé z hlediska velikosti, struktury a molekulového uspořádání. Mají schopnost vratně vázat s vysokou specifitou mono- i oligosacharidy, přičemž jejich struktura se při vazbě nemění. Vzhledem k jejich interakci s glykoproteiny, glykolipidy a oligosacharidy hrají lektiny důležitou roli při komunikaci buněk vázaných v biofilmu a také při dešifrování „glykokódu“ (Audfray a kol., 2013). Bakteriální lektiny jsou neenzymatické proteiny, které se významně

podílí na tvorbě biofilmu a nástupu virulence. Bližší studium lektinů by mohlo pomoci při dalším výzkumu vzniku biofilmu a přidružených infekcí. Stejně tak při studiu vzniku glykoproteinů a při získávání informací o fyziologických a patologických procesech probíhajících v bakteriálních buňkách (Bouvier, 2016).

Většina bakteriálních lektinů je vázána na povrch buňky. Obvykle se vyskytují v submikroskopických multi-jednotkách, které v závislosti na růstových podmínkách připomínají fimbrie nebo pili (Sharon, 2006). Každá molekula lektinu obsahuje dvě či více míst, která jsou určena pro vazbu sacharidu, mají tedy di- či polyvalentní charakter. Spojují se se sacharidy sítí vodíkových můstků a hydrofobními interakcemi. Při vazbě má zásadní význam i interakce s ionty, přesněji s vápenatým kationtem Ca^{2+} . Vodíkové můstky se vyskytují mezi hydroxylovými skupinami cukrů a aminoskupinou proteinů. Kromě vazby k sacharidovým makromolekulám na povrchu hostitelské buňky, mají lektiny také schopnost propojovat jednotlivé buňky mezi sebou. V tom případě dochází tedy k aglutinaci, které se říká u erytrocytů hemaglutinace. U bakterií slouží lektiny jako struktura napomáhající přichycení buňky na hostitelský organismus při počínající infekci. V rostlinách slouží lektiny jako ochrana proti patogenům a škůdcům a hrají důležitou roli v imunitním systému mnoha bezobratlých. Jsou totiž schopné rozlišovat mezi vlastními a cizími sacharidy. Lektiny obsažené v živočišných buňkách napomáhají vzniku glykoproteinů (Audfray a kol., 2013). Dalším příkladem mohou být toxiny produkované bakteriemi rodu *Clostridium*, které jsou schopné se vázat skrz lektinovou doménu gangliosidů přítomných v neuronech a způsobovat tetanus či botulismus (Richichi a kol., 2013).

2. Inhibitory lektinů

Použitím specifických látek na bázi sacharidů nebo jejich analogů dochází k interferenci vazby lektin – sacharid hostitelské buňky. Na tomto principu pracuje anti-adhezní terapie, založená na zabránění přilnutí buněk patogenních mikroorganismů k hostitelské tkáni a tím pádem zabránění prvnímu kroku infekce. Anti-adhezní terapie nabízí mnoho výhod oproti konvenčním terapiím. Jedná se především o vyšší účinnost, snížení vedlejších efektů a přívětivost k přírodnímu prostředí. Jejich vhodnost potvrzuje skutečnost, že se většinou nejedná o toxické látky a nevyvolávají imunogenní odpověď. Například lidské mléko je bohaté na oligosacharidy, které mají inhibiční schopnost vůči povrchovým lektinům. Fukosylované oligosacharidy jsou efektivním inhibitorem adheze mezi *Campylobacter jejuni* a lidskými buňkami. Novorozenci, kteří byli kojeni mlékem se zvýšeným obsahem těchto oligosacharidů,

trpěli mnohem méně na průjem, než ti kteří dostávali mléko s nižším množstvím těchto oligosacharidů (Sharon, 2006).

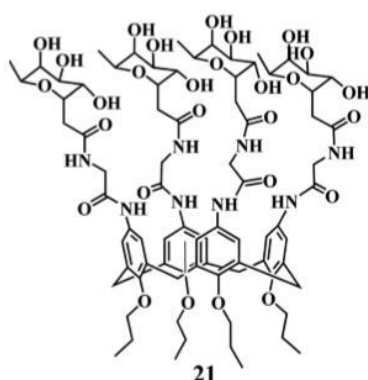
Při hledání vhodných inhibitorů lektinů je důležité, aby vázaly lektiny patogenních a oportunně patogenních mikroorganismů s vysokou specifitou a afinitou, ale zároveň neovlivňovaly lidské lektiny ve fyziologických procesech. Vzhledem k tomu, že se lektiny při počátku infekce specificky vážou na základě afinity k sacharidům na povrch hostitelských buněk, nabízí se tedy možnost blokovat lektiny pomocí molekul, které mají podobnou nebo vyšší afinitu. Bylo navrženo mnoho inhibitorů založených na různých strukturních motivech. Lze nalézt i potenciální inhibitory získané extrakcí z přírodních materiálů (Sharon, 2006).

Inhibitory lze rozdělit do několika skupin: glykomimetické ligandy (multivalentní glykoklustery, syntetické dendrimery s různým chemickým původem), deriváty přirozených ligandů (deriváty monosacharidů), přirozené glykoproteiny a polysacharidy (Grishin a kol., 2015). Výše zmíněné inhibitory jsou převážně anti-adhezní látky koncipované tak, aby se selektivně vázaly na sacharid rozeznávající doménu. Zabraňují tím tak již zmíněné vazbě mezi lektinem, který je přítomen v patogenu a sacharidem na povrchu hostitelské buňky (Richichi a kol., 2013). Glykomimetické peptidy jsou atraktivními inhibitory lektinů, jelikož vykazují vyšší specifitu, afinitu a stabilitu vůči endogenním degradačním enzymům ve srovnání s modifikovanými nebo nemodifikovanými glykany (Gustke a kol., 2012).

2.1 Kalixareny

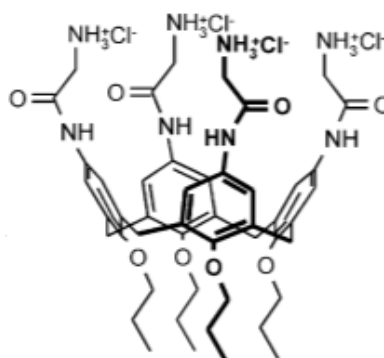
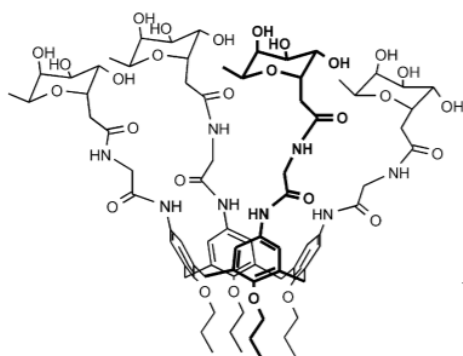
Kalixareny jsou unikátní molekuly, jejichž struktura obsahuje čtyři provázané fenolové kruhy, které připomínají svým tvarem pohár (název odvozen od latinského slova „calix“) (Nimse a Kim, 2013). Se svým 3D povrchem jsou jedny z nejznámějších hostitelských molekul spolu s cyklodextriny, kukurbiturily, kryptany a korunovými étery. Díky jejich dostupnosti a snadné funkcionalizaci na horním a / nebo dolním okraji molekulární kostry se kalixareny staly důležitými zprostředkovatelem v syntéze či biotechnologických aplikacích jako jsou supramolekulární platformy pro molekulární rozpoznávání, katalýza, nanotechnologie, a objevování léků. Mají několik konformačních isomerů a velké množství dutin různých velikostí a tvarů, které se podílí na molekulárním rozpoznávání. Vývoj ve vodě rozpustných kalixarenů je důležitý vzhledem k jejich možným lékařským účelům. Komplexy kalixarenů jsou významně silnější v porovnání s cyklodextriny a korunovými étery s aminokyselinami. Další studie týkající se specifických interakcí kalixarenů s molekulami, jako jsou organické a anorganické ionty, peptidy, polární nebo neutrální organické molekuly a biomolekuly, včetně bílkovin a

lipidů, vedly k četným aplikacím kalixarenů v technologii čipů DNA, technologii biosenzoru a biotechnologie. Je známo, že toxicita představuje obrovskou překážku při objevování a vývoji nových molekul léků. Většina derivátů kalixarenu však vykazuje na zvířecích modelech nízkou či žádnou toxicitu. U kalixarenů byla prokázána protivirová, antibakteriální, antimykotická, antituberkulární a protinádorová aktivita. Geraci a kol. (2013) navrhli kalixaren funkcionalizovaný α -1-C-fukosylem jako potenciální inhibitor biofilmu bakterie *P. aeruginosa*. Anti-biofilmová aktivita syntetizované sloučeniny 21 (viz Obr. 1) ukázala účinek proti kmenu PAO1 (Nimse a Kim, 2013). Použitím specifických látek na bázi sacharidů nebo jejich analogů dochází k interferenci vazby lektin – sacharid hostitelské buňky.



Obr. 1: sloučenina 21 (Nimse a Kim, 2013)

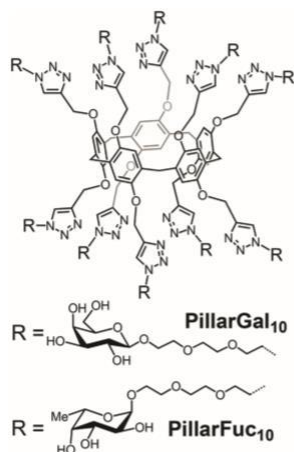
Consoli a kol. (2011) otestovali kalixaren, značený jako 6 (viz Obr. 2) na biofilm *P.aeruginosa* s rozsahem koncentrací 12,5 – 200 μ M. Výsledkem byla inhibice biofilmu o 35 – 73 %. Pravděpodobně ji způsobila interakce fukózy s receptorem LecB. Také testovali kalixaren, značený jako 3 (viz Obr. 3) s koncentračním rozmezím 50–200 μ M, kde také došlo k inhibici biofilmu *P. aeruginosa*, avšak úspěšnost nebyla tak vysoká jako u první zmíněné sloučeniny. Vzhledem k tomu, že u kalixarenů lze obměnit sacharidové ligandy, tyto látky tak nabízí řadu možností jak vytvářet nové inhibitory a najít v nich ten nejúčinnější (Consoli a kol., 2011).



Obr. 2: sloučenina 6 (Consoli a kol., 2011) **Obr. 3:** sloučenina 3 (Consoli a kol., 2011)

2.2 Pillarareny

Pillarareny jsou nejnovějším členem „rodiny“ kalixarenů, které byly představeny v roce 2008. Jejich název byl odvozen od anglického slova „pillar“ neboli sloup. Mají široké uplatnění. Používají se jako senzory, rotaxanová kola a supramolekulární polymery (Galanos a kol., 2016). Pillarareny jsou tvořeny pěti spojenými fenolovými kruhy. Struktura je velmi tuhá a symetrická s dvěma identickými místy pro funkcionalizaci. Mají vyšší valenci než kalixareny a jsou chirální. Byly vyvinuty syntetické postupy pro přípravu plně i částečně funkcionalizovaných pillararenů. Takové molekuly přitahují velkou pozornost zejména díky možnosti vázat nejrůznější molekuly. Navržené glykoklastry jsou schopné vazbou na bakteriální lektiny ovlivnit interakci mezi bakteriemi a lidskými buňkami a tím narušit tvorbu bakteriálního biofilmu (Galanos a kol., 2016). V předchozích studiích (Buffet a kol., 2016) byly vyvinuty topologicky různorodé série glykoklastrů založených na kalixarenech (se čtyřmi či šesti fenolovými kruhy), resorcinarenech, fullerenech a porfyrinech. Dále byl zaznamenán vývoj desetivalentních pillararenů s galaktózovými a fukózovými epitopy, u kterých byla měřena schopnost vazby na lektiny LecA, LecB (oba pro *P. aeruginosa*) a BambL (*Burkholderia ambifaria*). Pro PillarGal10 (viz Obr. 4) byla hodnota K_d vůči lektinu LecA naměřena na 366 ± 129 nM. Pro PillarFuc10 (viz Obr. 4) byla změřena hodnota $K_d = 280 \pm 33$ nM vůči lektinu LecB a $K_d = 57$ nM vůči lektinu BambL (Galanos a kol., 2016). Galanos a kol. (2016) také připravili nesymetricky funkcionalizované pillarareny působící jako vynikající platforma pro interakci s bakteriálními lektiny. Pillarareny byly připraveny buď s pěti alkynylovými nebo azidovými funkčními skupinami a glykoklastry majícími buď skupiny galaktózy nebo fukózy.



Obr. 4: Struktura galaktosylovaného (PillarGal₁₀) a fukosylovaného (PillarFuc₁₀) desetivalentního pillararenu (Galanos a kol., 2016)

2.3 Přírodní inhibitory

Kromě synteticky vytvořených inhibitorů lektinů lze najít i látky s inhibiční schopností obsažené v přírodních zdrojích. Prvním příkladem jsou lidské tělní tekutiny, jako jsou například sliny či sperma obsahující látky s fukosylovanými zbytky. Stejně tak mateřské mléko napomáhá novorozencům při obraně proti mikrobiálním infekcím. Bylo prokázáno, že lektin LecB je vysoce citlivý ke glykoproteinům, které jsou obsaženy v lidském mléce. Tyto glykoproteiny obsahují fukózu, která je pro lektin LecB přirozeným sacharidovým ligandem (Lerrer a kol., 2005). Právě glykany z těchto glykoproteinů napodobují lidské buněčné receptory a mohly by mnohem účinněji inhibovat vazbu lektinů než přirozené ligandy lektinů. Glykoproteiny z mateřského mléka interagují také s lektiny Con A (Concanavalin A - rostlinný lektin obsažený v plodech *Canavalia ensiformis*) a LecA (Lesman-Movshovich a kol., 2003). Kromě lidského mléka byly dále testovány i lidské sliny nebo sperma, jejichž vliv však nebyl příliš významný. Dle studie Lesman-Movshovich a kol. (2003) byl lektin LecB inhibován nejvíce mateřským mlékem.

Mezi další potenciální zdroje přírodních látek pro inhibici bakteriálních lektinů se řadí ptačí vaječný bílek (Lerrer a Gilboa-Garber, 2001b). Glykokonjugáty z vaječného bílku jsou potenciálními inhibitory lektinů, které vznikají během embryonálního vývoje drůbeže. Lerrer a Gilboa-Garber (2001) zjistili, že lektin LecA je vysoce citlivý ke glykoproteinům obsažených v holubích vejcích (inhibice hemaglutinace o 95 % ve srovnání s kontrolou). V jiném článku Lerrer a Gilboa-Garber (2001) prezentovali výsledky, kde glykany mnoha glykoproteinů z křepelčích bílků nesou koncové zbytky pro manózu, která je schopna inhibovat aktivitu lektinu

LecB (inhibice hemaglutinace o 50 % v porovnání s kontrolou). Vzhledem k tomuto zjištění by tyto nebo synteticky získané glykoproteiny s podobnou strukturou mohly být vhodné pro terapeutické využití (Lerrer a Gilboa-Garber, 2001a).

Neméně významným zdrojem jsou semena rostlin, která obsahují velké množství polysacharidů. Ty slouží jako rezervní substrát pro klíčení a dále fungují jako osmoprotektanty. Kromě těchto funkcí přispívají k ochraně embryí proti infekci zprostředkované právě bakteriálními lektiny. Obecně platí, že se většina semen obsahuje polysacharidy jako jsou galaktany, galaktomany, manany a xyloglukany (Rachmaninov a kol., 2012). Mezi rostliny, jejichž semena a extrakty by mohly mít antiadhezivní účinnost, se řadí kešu (*Anacardium occidentale*), kakao (*Theobroma cacao*), káva (*Coffea arabica*), dýně (*Curcubita maxima*) a rajčata (*Lycopersicon esculentum*). Kakaová semena obsahují vysoce rozvětvené pektinové polysacharidy včetně galaktoglukomananů. Kávová semena jsou bohatá na galaktomany a arabinogalaktomany. Podobně tak rajčatová semínka, která mají významný obsah galaktoglukomananů. Dle experimentu Rachmaninov a kol. (2012) bylo zjištěno, že lektin LecA byl nejcitlivější na galaktomany obsažené v kešu, kokosových, kávových a rajčatových semenech.

Dalším příkladem je mateří kašička. Mateří kašička je produkována z hypofaryngeálních a mandibulárních žláz mladých včelích dělnic. Obsahuje široké spektrum přírodních látek a je složena z vody, sacharidů, lipidů, proteinů, vitaminů jako je riboflavin, niacin nebo thiamin a z některých minerálů (především vápník a železo). Množství studií demonstrovalo její možné antimikrobiální, protinádorové a protizánětlivé účinky. V adhezních testech bakterie *P. aeruginosa* byla aplikována koncentrace mateříkašičky s obsahem v roztoku od 12,5 do 25 %. Výsledky ukázaly, že 25% mateří kašička inhibovala bakteriální adherenci biofilmu *P. aeruginosa* až o 90 % vůči kontrole (Susilowati a kol., 2017).

Mezi přírodní látky s antimikrobiální aktivitou patří i chitosan. Mechanismus antimikrobiální aktivity chitosanu je založen na vazbě kladně nabitých aminoskupin chitosanu na záporně nabitě komponenty bakteriální buněčné stěny (N-acetylmuramová kyselina, sialová kyselina) (Li a kol., 2000). Byly zkoumány specifické interakce mezi lektiny a sacharidovými hybridy syntetizovanými jako deriváty chitosanu (Li a kol., 2000). Tyto hybridy mají své antibakteriální funkční skupiny (hlavní chitosanový řetězec) a vazebné místo pro inhibici lektinů (postranní fukózový řetězec). Proto je předpokládána zvýšená antimikrobiální aktivita těchto hybridů oproti nemodifikovanému chitosanu. Morimoto a kol. (2001) pozorovali vliv

derivátu chitosanu s navázanou L-fukózou na lektin LecB bakterie *P. aeruginosa*. Pomocí fluorescenčního mikroskopu byly pořízeny fotografie interakce fluorescenčně značeného derivátu chitosanu s buňkami bakterie *P. aeruginosa*. Na základě agregace buněk byla potvrzena hypotéza, že se L-Fuc-chitosan dokáže specificky vázat lektin LecB (Morimoto a kol., 2001).

3. Závěr

Vzhledem k vzrůstající odolnosti patogenních a oportunně patogenních mikroorganismů vůči komerčně dostupným antibiotikům a chemoterapeutikům je hledání alternativních léčiv v oblasti biologicky aktivních látek významnou součástí výzkumu. Mezi takovéto látky lze mimo jiné zařadit i polyvalentní glykomimetika, které byly již dříve prokázány jako účinné inhibitory lektinů (Wu a kol., 2006). Polyvalentní glykomimetika je možno tedy řadit mezi látky s potenciálem využití v lékařství při léčbě nejruznějších infekčních onemocnění.

Poděkování

Tato práce byla realizována v rámci “Operačního programu Praha - Konkurenceschopnost” (CZ.2.16/3.1.00/24503) za podpory “Národního programu udržitelnosti I” - NPU I LO1601.

4. Literatura

- Audfray, A., Varrot, A. a Imbert, A. (2013) Bacteria love our sugars: Interaction between soluble lectins and human fucosylated glycans, structures, thermodynamics and design of competing glycoconjugates. *Comptes Rendus Chimie* 16, str. 482-490.
- Bouvier, B. (2016) Optimizing the Multivalent binding of the bacterial lectin lecA by glycopeptide dendrimers for therapeutic purposes. *Journal of Chemical Information and Modeling* 56, str. 1193-1204.
- Buffet, K., Nierengarten, I., Galanos, N., Gillon, E., Holler, M., Imbert, A., Matthews, S.E., Vidal, S., Vincent, S.P. a Nierengarten, J.-F. (2016) Pillar[5]arene-based glycoclusters: synthesis and multivalent binding to pathogenic bacterial lectins. *Chemistry – A European Journal* 22, str. 2955-2963.
- Consoli, G.M.L., Granata, G., Cafiso, V., Stefani, S. a Geraci, C. (2011) Multivalent calixarene-based C-fucosyl derivative: a new *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inhibitor. *Tetrahedron Letters* 52, str. 5831-5834.
- Galanos, N., Gillon, E., Imbert, A., Matthews, S.E. a Vidal, S. (2016) Pentavalent pillar[5]arene-based glycoclusters and their multivalent binding to pathogenic bacterial lectins. *Organic & Biomolecular Chemistry* 14, str. 3476-3481.
- Grishin, A.V., Krivozubov, M.S., Karyagina, A.S. a Gintsburg, A.L. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials. *Acta Naturae* 7, str. 29-41.
- Gustke, H., Kleene, R., Loers, G., Nehmann, N., Jaehne, M., Bartels, K.-M., Jaeger, K.-E., Schachner, M. a Schumacher, U. (2012) Inhibition of the bacterial lectins of *Pseudomonas aeruginosa* with monosaccharides and peptides. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31, str. 207-215.
- Hofmann, A., Sommer, R., Hauck, D., Stifel, J., Göttker-Schnetmann, I. a Titz, A. (2015) Synthesis of mannoheptose derivatives and their evaluation as inhibitors of the lectin LecB from the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Carbohydrate Research* 412, str. 34-42.
- Lerrer, B. a Gilboa-Garber, N. (2001a) Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* PA-III lectin with quail egg white glycoproteins. *Canadian Journal of Microbiology* 47, str. 1095-1100.

- Lerrer, B. a Gilboa-Garber, N. (2001b) Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* galactophilic lectin PA-IL with pigeon egg white glycoproteins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 32, str. 33-36.
- Lerrer, B., Lesman-Movshovich, E. a Gilboa-Garber, N. (2005) Comparison of the antimicrobial adhesion potential of human body fluid glycoconjugates using fucose-binding lectin (PA-IIL) of *Pseudomonas aeruginosa* and Ulex europaeus lectin (UEA-I). *Current Microbiology* 51, str. 202-206.
- Lesman-Movshovich, E., Lerrer, B. a Gilboa-Garber, N. (2003) Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* lectins by human milk glycans. *Canadian Journal of Microbiology* 49, str. 230-235.
- Morimoto, M., Saimoto, H., Usui, H., Okamoto, Y., Minami, S. a Shigemasa, Y. (2001) Biological activities of carbohydrate-branched chitosan derivatives. *Biomacromolecules* 2, str. 1133-1136.
- Nimse, S.B. a Kim, T. (2013) Biological applications of functionalized calixarenes. *Chemical Society Reviews* 42, str. 366-386.
- Rachmaninov, O., Zinger-Yosovich, K.D. a Gilboa-Garber, N. (2012) Preventing *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum* infections by anti-adhesion-active components of edible seeds. *Nutrition Journal* 11, str. 10.
- Richichi, B., Imbert, A., Gillon, E., Bosco, R., Sutkeviciute, I., Fieschi, F. a Nativi, C. (2013) Synthesis of a selective inhibitor of a fucose binding bacterial lectin from *Burkholderia ambifaria*. *Organic & Biomolecular Chemistry* 11, str. 4086-4094.
- Sharon, N. (2006) Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1760, str. 527-537.
- Susilowati, H., Murakami, K., Yumoto, H., Amoh, T., Hirao, K., Hirota, K., Matsuo, T. a Miyake, Y. (2017) Royal jelly inhibits *Pseudomonas aeruginosa* adherence and reduces excessive inflammatory responses in human epithelial cells. *BioMed Research International* 2017, str. 10.
- Wu, A.M., Wu, J.H., Singh, T., Liu, J.H., Tsai, M.S. a Gilboa-Garber, N. (2006) Interactions of the fucose-specific *Pseudomonas aeruginosa* lectin, PA-IIL, with mammalian glycoconjugates bearing polyvalent Lewis and ABH blood group glycotopes. *Biochimie* 88, str. 1479-1492.

Oxidační stabilita nefiltrovaného piva ošetřeného paskalizací

K. Voldřichová, P. Dostálek, K. Štulíková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Jedním z nejvýznamnějších charakteristik piva rozhodující o jeho přijetí konzumenty je jeho senzorická stabilita v průběhu skladování, která je významně ovlivněna mírou probíhajících oxidačních reakcí. Tepelná pasterace, tradiční metoda aplikovaná k zajištění mikrobiologické stability, však může tyto oxidační reakce akcelarovat, což se projeví zhoršením senzorické kvality piva. Odolnosti piva vůči oxidaci lze vyjádřit obsahem látek s antioxidačními vlastnostmi a celkovou antioxidační kapacitou. Cílem naší práce bylo ověřit vliv nové stabilizační metody – paskalizace – na antioxidační kapacitu nefiltrovaného, filtrovaného a pšeničného piva a dále určení vlivu teploty skladování na rozvoj oxidačního poškození. K paskalizaci byly použity tlaky o intenzitě 250 MPa a 550 MPa. K popsání oxidační stability bylo využito celkem čtyř metod – DPPH, FRAP, EAP (stanovení endogenního antioxidačního potenciálu pomocí elektromagnetické spinové rezonance) a stanovení celkového obsahu polyfenolů. Výsledky měření ukázaly, že neprodleně po paskalizaci nedošlo k výraznému poklesu antioxidantů oproti kontrolnímu vzorku, avšak po 8-týdenním skladování se tato koncentrace snížila. Stabilizační vliv této metody byl zaznamenán u celkového množství polyfenolů, jejichž množství se dokonce zvýšilo oproti vzorkům pasterovaným. Zároveň však bylo potvrzeno, že doba a intenzita paskalizace ovlivňuje antioxidační potenciál piva. Dále bylo prokázáno, že vyšší skladovací teplota hraje důležitou roli v antioxidační kapacitě nápoje, neboť s její rostoucí hodnotou klesalo množství antioxidantů, nejméně však u paskalizovaných vzorků. Metodou EAP byl rovněž ověřen nárůst počtu volných radikálů v pivu při vyšších teplotách skladování.

**Sborník souhrnů a plných textů konference
KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2019**

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6

Editor: Olga Mařátková

Rok vydání: 2019

Počet stran: 46

Jedná se o elektronickou verzi publikace ve formátu PDF na CD-ROM.