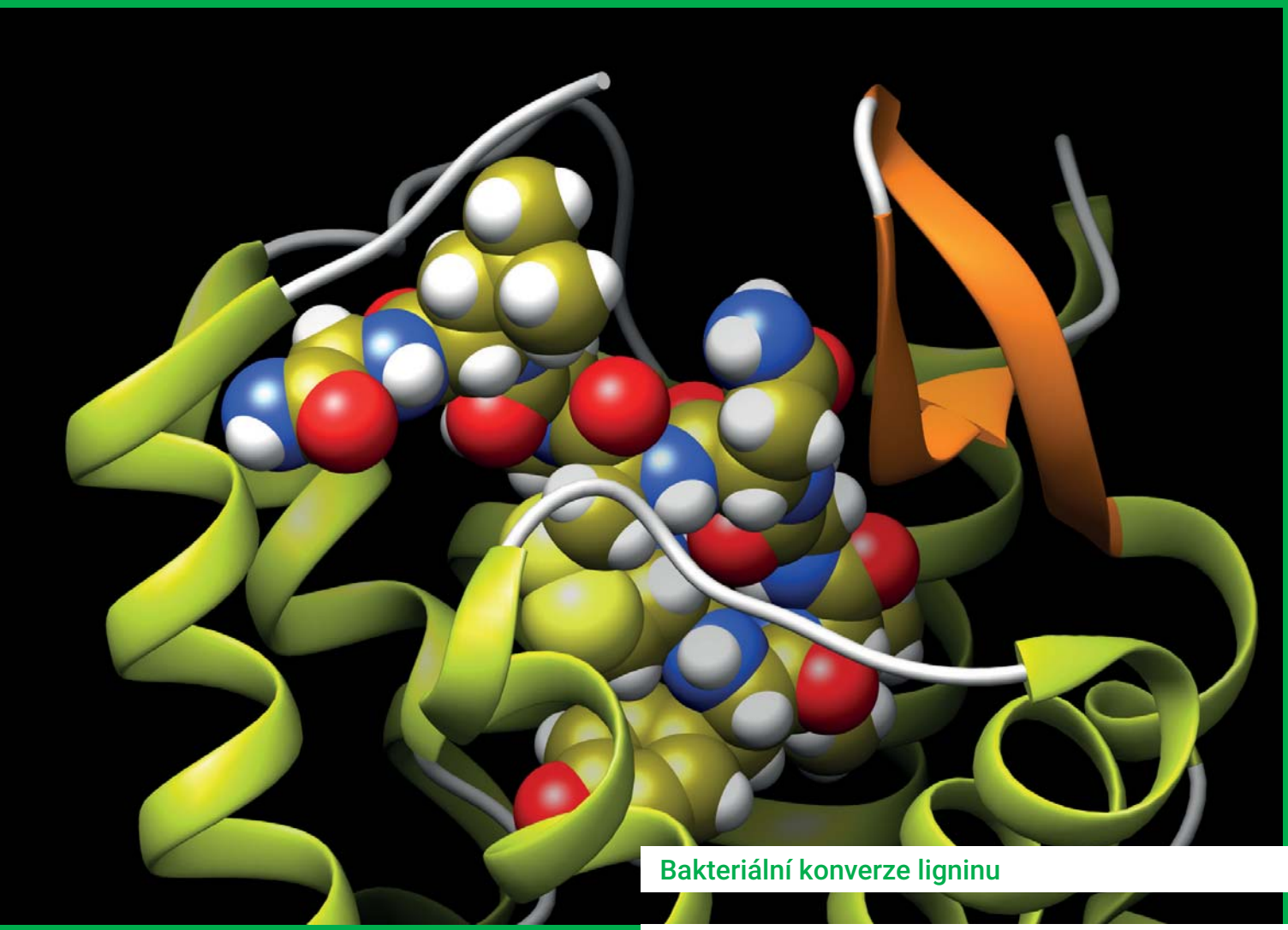
Chemické Listy

5
ročník • 117



Bakteriální konverze ligninu

Hořké peptidy v sýrech

Aplikace monolitických struktur

Konjugáty protilátka-léčivo

CHLSAC 117 (5) 277—344 (2023) ISSN 0009-2770 http://www.chemicke-listy.cz

Chemistry Europe
European Chemical Societies Publishing

WILEY VCH

Excellence in Chemistry Research

Announcing our new flagship journal

- Gold Open Access
- Publishing charges waived
- Preprints welcome
- Edited by active scientists

Meet the Editors of *ChemistryEurope*

Luisa De Cola
Università degli Studi di Milano Statale, Italy

Ive Hermans
University of Wisconsin-Madison, USA

Ken Tanaka
Tokyo Institute of Technology, Japan

Před sto lety zemřel Wilhelm Conrad Röntgen

Röntgen objevil záření, které se dodnes nazývá jeho jménem. Je velmi užitečné pro tomografii, ale i pro chemii: jako způsob spektrální analýzy a difrakce krystalografickou strukturou látek. Difrakce Röntgenova záření umožňuje nejen určit x-, y-, z- souřadnice atomů v molekule s přesností 0,02 Å, ale objevila také, že toto určení je svým způsobem transcendentní, neboť uspořádání atomů v jednotlivých elementárních buňkách struktury krystalických látek se vzájemně liší a je leckdy dost nepravidelné – a to v řadě aspektů – což více nebo méně ovlivňuje vlastnosti těchto látek[1].

Jedním ze způsobů, jak se (reálné) krystalické látky liší od ideálních (na tomto světě se nevyskytujících) krystalů (s absolutně pravidelnou vnitřní strukturou) je parakrystalinita[2]*. Na rozdíl od stavebního principu ideálních krystalů – přísné poziční periodicity, je způsob vzájemného uložení „nejbližších sousedů" (buněk, molekul, atomů) ve struktuře parakrystalu v zásadě stochastický. To znamená, že se mění v určitých mezích, když přecházíme od jednoho páru sousedních motivů k druhému. I když tyto odchylky nejsou velké, kumulují se, přejdeme-li od „nejbližšího souseda" ke 2., 3. a 4. sousednímu motivu, takže poloha n-tého motivu vzhledem k výchozímu („nultému") motivu bude už pak náhodná. Zatímco struktura (ideálního) krystalu je „globálně" periodická, jeví struktura parakrystalu přibližnou periodicitu jen lokálně, do určité vzdálenosti od (libovolného) uvažovaného atomu.*

Kapalné krystaly[3] *jsou látky, které již svým názvem vyjadřují, že jsou jakýmsi hybridem mezi krystaly – s ideálně pravidelnou vnitřní strukturou – a kapalinou – se strukturou, jež jakoukoli pravidelnost postrádá. Nepravidelnost vnitřní struktury kapalných krystalů je specificky anizotropní, v určitém směru (resp. v určitých směrech) jsou molekuly uspořádány pravidelně, jako v krystalech, v jiném směru (resp. směrech) tak nepravidelně jako u kapalin. Je to způsobeno výraznou anizotropií tvaru molekul, které jsou u většiny kapalných krystalů lineární (kalamitické, t.j. nematické, smektické a cholesterické mezofáze) nebo destičkovité (diskotické kapalné krystaly), či s výraznou anizotropií vazby těchto molekul (mezofáze pyramidální, kolumnární, stýlické a fazmidické).*

Roku 1984 se objevila první zpráva o látkách, jejichž struktura není vytvořena periodickým opakováním jediné základní buňky, jako je tomu u krystalů, ale kvaziperiodickým uspořádáním několika (minimálně dvou) buněk. Tento stavební způsob umožňuje, aby nové látky – jimž se začalo říkat kvazikrystaly[4] *– jevily symetrii, která je u krystalů nemožná – aby např. měly pětičetnou osu symetrie. Zprvu se sice předpokládalo, že existence kvazikrystalů je jenom časná, že jsou to látky nestabilní. Pozdější teoretické rozbory však prokázaly, mimo jakoukoli pochybnost, že základní stav systému částic, jež na sebe působí silami krátkého dosahu, může být kvazikrystalický v důsledku konkurence mezi vzájemně protikladnými požadavky, které na uložení atomů do krystalu klade jednak pořádek na blízko, jednak pořádek na dálku.*

Ukázalo se také, jak strukturu látek ovlivňuje její disperzní stav[5]*. Kupříkladu, že materiál při svém „žití" rytmicky mění svou disperzi, což je dnes hlavní příčinou omezené životnosti dílců a konstrukcí z toho materiálu vyrobených (únava, něco jako ateroskleróza omezující délku života lidí [žalm 90:10]; asi i W. C. Röntgen na ni zemřel)*[6,7]*.*

Jestliže pak jest ambiciózním cílem chemie nalézat závislost vlastností látek na jejich struktuře, vzpomínáme při stoletém výročí úmrtí Röntgena na jeho práci, která poznávání této závislosti přispěla.

Jaroslav Fiala

LITERATURA

1. *Defect and Microstructure Analysis by Diffraction* (Snyder P. L., Fiala J., Bunge H. J., ed.). International Union of Crystallography, Oxford University Press, New York 1999.
2. Hosemann R., Bagchi S. N.: *Direct Analysis of Diffraction by Matter*. North Holland, Amsterdam 1962.
3. Stephen M. J., Straley J. P.: Rev. Mod. Phys. *46*, 617 (1974).
4. Nelson D. R.: Sci. Am. *254*, 43 (1986).
5. Fiala J., Kraus I.: *Povrchy a rozhraní*, Česká technika – nakladatelství ČVUT, Praha 2016.
6. Fiala J., Mazal P., Skřivánková V., Mohammad H.: *Proceedings of NDE for Safety / Defektoskopie 2019* (Pazdera L., Mazal P., Turek P., ed.), Brno University of Technology, Brno 2019.
7. Kraus I., Fiala J.: *Krystalografie*. Česká technika – nakladatelství ČVUT, Praha 2021.

Chemické Listy

Referát

www.chemicke-listy.cz

O DUCHU (DUŠI) Z VÍNA

Michal Jurášek a Pavel Drašar

Ústav chemie přírodních látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
drasarp@vscht.cz

Došlo 2.1.23, přijato 23.1.23.

Článek popisuje historii a základy výroby vína a pálenek. Přináší informace o obsahu, zrání a názvosloví různých druhů vína a pálenek.

Klíčová slova: alkohol, cognac, brandy, matolinovice, weinbrand, alembík

Kultivované pěstování hroznů a výroba vína jsou známy již v Egyptě ve třetím miléniu před naším letopočtem. Je však prokázáno, že již o tři tisíce let dříve víno pěstovali v jihozápadní Asii. Pokud jde o destilaci této tekutiny, zdá se, že s tím začali Babyloňané ve druhém tisíciletí před naším letopočtem a posléze svoje poznatky předali arabským alchymistům[1], kteří toto umění postoupili dále Evropanům[2]. Alchymisté, jako např. Ibn Badis, ne nadarmo nazývali zprvu alkohol jako destilované víno (خمر مصعّد, khamr mseed, či نبيذ مقطر , nabidh muqatar), teprve později jako arak (عرق, eirq) a až pak se objevilo slovo alkohol (الكحول, alkuhul). Procesy destilace však používali již Číňané ve třetím tisíciletí před naším letopočtem.

Jak lze očekávat, ze začátku byl hlavním produktem destilát z vína, jehož přípravu údajně precizoval navrátivší se křižák Arnaud de Villeneuve v polovině 13. století ve Francii[3]. O blahodárném působení destilátu z vína přesvědčoval františkánský teolog, alchymista a kardinál Vital du Four (Vitalis de Furno) ve svém díle „*Kniha o vybraných lécích pro zachování zdraví celého těla od lidských chorob*“[4] z roku 1310 (tiskem 1521)[5].

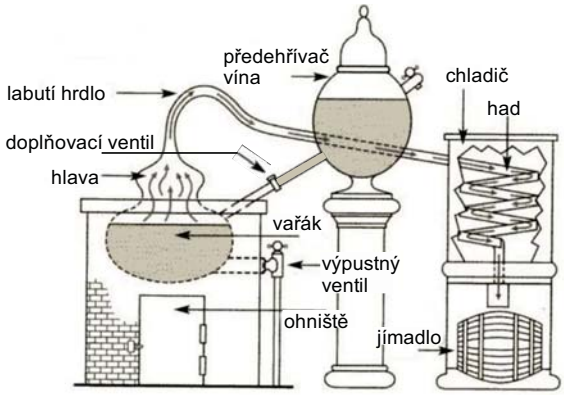
V oblasti Cognac pak zavedl dvojitou destilaci Chevalier de la Croix Marron, pán ze Segonzacu[6]. Tomuto velice zbožnému a poněkud poetickému muži se zdálo, že se Satan pokouší ukrást mu duši vařením a viděl se ve snu v jeho kotli. Jeho víra byla tak hluboká, že duše rytíře odolala prvnímu „vaření“. Ďábel, aby dosáhl svých cílů, byl nucen podrobit ji druhému „vaření“. Když se rytíř probudil, napadlo ho vytáhnout duši z vína druhou destilací. Vinař pak vzal tento destilát a řekl si, že když jej nechá v dubovém sudu uležet, zlepší se jeho chuť jako u vína. Nemohl tušit, že tím proběhnou transesterifikace a ze dřeva se vylouží vanilinu příbuzné sloučeniny, známé jako chuťové modifikátory[7], a přirozeně trpké třísloviny (taniny)[8] zlatavě žlutohnědé až hnědé barvy. Tak vznikl bohulibý nápoj, který v okolí města Cognac (Grande Champagne, Petite Champagne, Borderies, Fins Bois, Bons Bois a Bois Ordinaires), pokud je vyroben z odrůd révy Saint-Émilion des Charentes (používána ve velké většině), Folle Blanche nebo Colombard, a pokud zrál v dubových sudech minimálně dva roky, může nést název koňak (francouzsky cognac). Ostatní podobné pálenky jsou pak označovány jako brandy. Přidávání jakýchkoliv látek jak k moštu, tak k destilátu, s výjimkou karamelu, jenž může přidávat destilátu barvu a plejádu najmě heterocyklických sloučenin, je zakázáno zákonem.

Brandy (nebo Weinbrand, tj. pálené víno), je podle moderních předpisů EU (cit.[9]) lihovina, vyráběná z vínovice, smísená nebo nesmísená s vinným destilátem destilovaným na méně než 94,8 obj.% za předpokladu, že daný destilát netvoří více než 50 % konečného produktu, zrající alespoň jeden rok v dubových nádobách nebo alespoň šest měsíců v dubových sudech o objemu menším než 1000 litrů. Obsah těkavých látek, které pocházejí výhradně z destilace nebo redestilace surovin, má být v množství rovném nebo vyšším než 125 gramů na hektolitr alkoholu o 100 obj.%, obsah methanolu je nejvýše 200 gramů na hektolitr alkoholu o 100 obj.% a výsledný obsah alkoholu musí být větší než 36 obj.%.

Destilace probíhá stále v téměř alchymistických měděných destilačních zařízeních typu charentského alembiku (Charentais alembic; Charente (ʃa.ʁɑ̃t) je departement zahrnující oblast „cognac“) (obr. 1). Musí jít o alembik menšího objemu, neboť je známo, že destilace ve větším objemu či v zařízení jiného typu nedá žádaný kvalitní produkt.

Zásadní pro klasickou chuť destilátu je koncentrace alkoholu 40 obj.% v produktu prodávaném spotřebiteli[11]. „Pitelnou“ koncentraci alkoholu 40 % údajně stanovil D. I. Mendělejev ve své disertační práci, což ale není úplně pravda, neboť on se sice zabýval hustotami různě zředěného lihu, leč ne kvůli pití, ale kvůli jeho zdaňování[12].

Organoleptický profil destilátu se formuje zejména při prvé destilaci a během této destilace množství vonných látek přibývá, protože se při ní např. teplem uvolní terpeny



Obr. 1. **Charentský alembik** (podle cit.[10])

z glykosylované formy, dochází též k esterifikacím, transesterifikacím, Maillardově reakci a podobně. Tak při destilaci vznikají dva estery, tři aldehydy, tři terpeny a 12 dalších isoprenoidů. Ostatní látky pocházejí z hroznů (primární), z vinného moštu (fermentační), případně jsou tvořeny při stárnutí v dřevěných sudech, či extrahovány ze dřeva[13], nebo též vznikající reakcemi na povrchu mědi[1].

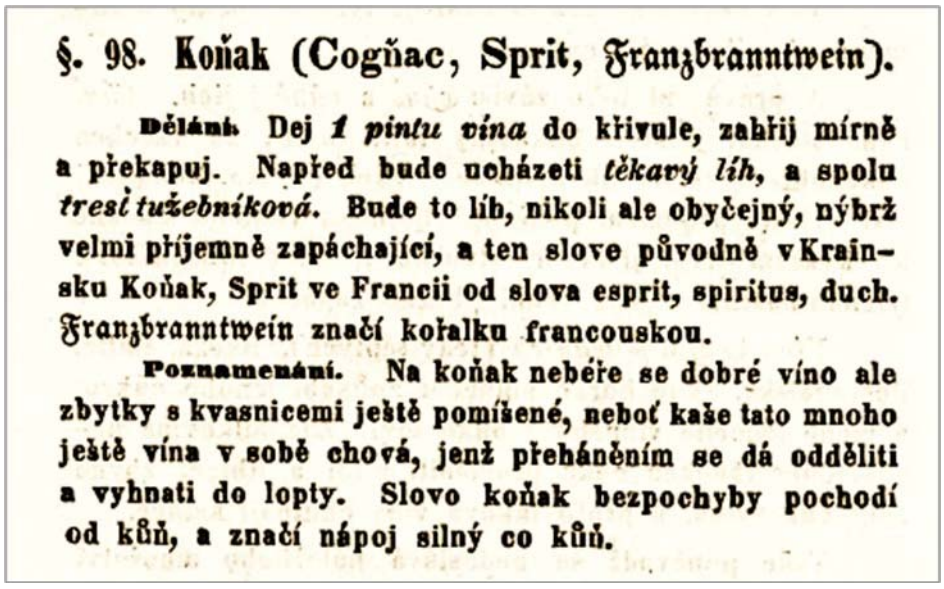
O bohulibém destilátu z vína psal u nás již Amerling roku 1854 (obr. 2).

Pod pojmem tresť vidí Amerling někdy ether, někdy ethyl (trestil), jindy destilovatelnou (voňavou) frakci. Tresť tužebníková je potom vůně představující aroma vína a květu vinné révy (cit.[14]).

Podívejme se tedy, co může být ta tužebníková tresť. Koňak i brandy dají v ústech nejprve pálivou chuť alkoholu, po které se rozvine příjemná aromatická chuť, více či méně nasládlá až sladká. Byly identifikovány stovky sloučenin přítomných v destilátu. Mezi nejhojnější patří[15] acetaldehyd, ethyl-acetát, methanol, propan-1-ol, isobutanol (2-methylpropan-1-ol), a isoamylalkohol (3-methylbutan-1-ol), které nacházíme v množství mezi 50 a 2000 mg l^{-1}. Kvasné alkoholy vyšší než ethanol se nazývají přiboudlina (fusel, fusl) a přispívají k aromatické komplexitě, jsou však ve vyšších koncentracích nežádoucí. Bylinková vůně destilátu spočívá zejména na hexan-1-olu a hexan-2-olu, *cis*-3-hexen-1-olu, *trans*-2-hexen-1-olu a *cis*-2-hexen-1-olu. Pokud je přítomen 1-okten-3-ol, který přidává houbovou vůni, pochází z hroznů infikovaných nekrotrofní plísní šedou *Botrytis cinerea* Pers.

Nejvíce zastoupená octová kyselina může vznikat oxidací alkoholu nebo může pocházet z hemicelulos. Mohou být také přítomny i jiné karboxylové kyseliny, jako je propionová a máselná, které jsou spojovány s bakteriální aktivitou. Máselná kyselina je charakterizována nepříjemnými máslovými a sýrovými vůněmi a její koncentrace se zvyšuje během stárnutí. Kyseliny hexanová, oktanová, dekanová, dodekanová, myristová, palmitová a stearová jsou vytvářeny kvasinkami. Organické kyseliny se vyskytují ve formě esterů, kterých bylo izolováno přes 160, v nich (logicky) převládají ethylestery. O esterech kyselin kapronové, kaprylové a kaprinové se soudí, že vínu dávají typickou vůni. Koncentrace ethyl-butyrátu, podobně jako máselné kyseliny roste se stárnutím. Pokud se týká esterů odvozených od vyšších alkoholů, jde zejména o „ovocné“ estery octové kyseliny, jako isoamyl-, isobutyl- a hexylestery. Přítomnost organických kyselin a eventuální přítomnost kyseliny siřičité ve víně syntéze a transesterifikaci esterů nahrávají. Vyšší koncentrace ethyl-acetátu a isoamyl-acetátu jsou považovány za nežádoucí.

Acetaldehyd bývá přítomen ve víně v koncentracích mezi 0,20 až 0,25 g l^{-1} a bývá spojován se zvracením



§. 98. Koňak (Cogňac, Sprit, Franzbranntwein).

Dělání. Dej *1 pintu vína* do křivule, zahřij mírně a překapuj. Napřed bude uháželi *těkavý líh*, a spolu *tresť tužebníková*. Bude to líh, nikoli ale obyčejný, nýbrž velmi příjemně zapáchající, a ten slove původně v Krajnsku Koňak, Sprit ve Francii od slova esprit, spiritus, duch. Franzbranntwein značí kořalku francouskou.

Poznamenání. Na koňak nebéře se dobré víno ale zbytky s kvasnicemi ještě pomíšené, neboť kaše tato mnoho ještě vína v sobě chová, jenž přeháněním se dá odděliti a vyhnati do lopty. Slovo koňak bezpochyby pochodí od kůň, a značí nápoj silný co kůň.

Obr. 2. **Ukázka z učebnice Amerlingovy**[14]

a nevolností při masivní konzumaci alkoholických nápojů. Je to pochopitelné, protože LD_{50} (krysa) je 4,57 g kg^{-1} (cit.[16]), či dokonce (krysa p.o.) 1,9 g kg^{-1} (cit.[17]). Z dalších aldehydů se vyskytuje formaldehyd, 5-hydroxymethylfurfural, akrolein, propionaldehyd, butyraldehyd, benzaldehyd, isovaleraldehyd a valeraldehyd, snadno je lze dokázat pomocí HPLC (cit.[18]). K příjemným ovocným a sladkým vůním přispívají isoprenoid β-damascenon a diacetyl (butan-2,3-dion). Furfural, vzniklý při destilaci z pentos je přítomen v množství 0,2–30 mg l^{-1} a vyvolává dojem vůně pečiva. Furfural spolu s 5-hydroxymethylfurfuralem často pocházejí z přidaného karamelu.

Z látek, které přispívají k organoleptickým vlastnostem destilátu, lze uvést zejména furfurylethylether, furfural, furan-2(5*H*)-on, 2-acetylfuran, 5-methylfurfural, 5-(hydroxymethyl)furan-2-karbaldehyd, eugenol, (4*S*,5*S*)-5-butyl-4-methyloxolan-2-on (whisky lakton), kapronovou (hexanovou) kyselinu, guajakol, syringol, 4-allylsyringol, kumariny, eugenol a vanilin[19]. Fakt, že sud byl vyroben nikoli z dubu, ale ze dřeva kaštanovníku jedlého, se pozná podle zvýšené přítomnosti whisky laktonu.

Celá řada látek, které se do destilátu mohou dostat z agrochemikálií, je pod velmi přísnou kontrolou, a tudíž se mohou vyskytovat, leč v nepatrných stopách.

Zázrak, čímž se koňak liší od jiných pálenek, tkví v procesu jeho zrání v dubových sudech, kdy se vyluhují látky jako eugenol (hřebíčková vůně) a whisky lakton („sladká“, dřevěná až kokosová vůně). Další látky se rozkládají, a tak hydrolýzou a následnou oxidací ligninu a esterů mastných kyselin (zejména o sudém počtu uhlíků) vznikají ketony přispívající k čemusi, co je nazýváno „rancio“ (rancio charentais)[20]. Tyto látky produkují i enzymy z hub rostoucích na površích dřevěných sudů. Rancio lze definovat jako soubor vůní a chutí, které se rozvinou až po rozsáhlém zrání v dubových sudech (více než 10 let, ale častěji po 15–20 letech). Vzhledem k tomu, že lidé dokážou rozlišit mnohem více vůní než chutí, je rancio snáze patrné v nose než na patře. Mezi typické vůně, které popisují dobře vyvinuté rancio, patří v různých stadiích zrání nádechy vůně houbové, zemité, ořechové a sýrové, vůně sušeného ovoce, rozinek, mýdla a žluklého másla. V poslední, čtvrté fázi se rancio přesouvá do vůní tropického ovoce, dřevěné krabice od doutníků, cedrového dřeva, staré kůže, knih a pergamenu. Rancio má také vliv na to, jak se koňak cítí v ústech. Někteří chuť popisují jako máslovou, jiní jako mastně oříškovou[1]. Přestože je vůně žluklého másla (beurre rance, rancid butter) obecně vnímána negativně, v případě letitého koňaku je, do určité intenzity, naopak známkou nejvyšší kvality.

Dobrý hospodář pro něco k pití „i přes plot skočí“, jak říkávala babička. Prakticky ve všech kulturních oblastech, kde pěstovali vinnou révu a dělali z ní víno, přišlo hospodářům líto toho, co zbylo po vylisování hroznů, tedy matoliny (někdy též vinných pokrutin a rmutu), jak již píše výše uvedený Amerling. Ať již překvašené matoliny z vína červeného nebo nekvašené z vína bílého dají ročně v EU okolo 6 milionů tun materiálu[21]. Ano, dal se z matolin udělat „druhák pro Pražáky“ přidáním cukru a vody, což se ještě jednou překvasilo a pak šup s tím na trh jako „přírodně nasládlý výběr z hroznů“. Zdálo se, že ale je lepší bílé matoliny nechat po přidání vody překvasit, červené zředit vodou a poté obé předestilovat. Bohužel, vzhledem k množství matolin je často nutno je skladovat, a to i několik měsíců (za chladu a bez přístupu vzduchu), z čehož může plynout i rozdílná kvalita destilátu.

Čistý destilát z matolin (matolinová pálenka[9]) se vyrábí buď průmyslově nebo podomácku v celém světě. Podívejme se, jak jej nazývají různí národové: Bulharsko: dzhibrovitsa (typ rakie); Čechy: matolinovice, vínovice; Francie: marc; Gruzie: chacha; Chile: aguardiente de chillán; Itálie, Korsika: grappa; Kréta: tsikoudia (též raki); Kypr: zivania; Maďarsko: törkölypálinka; Německo: Tresterbrand, Weinbrand; Portugalsko: bagaceira; Rumunsko: tescovină; Řecko: tsipouro; Severní Makedonie: komova rakija; Slovensko: vínovica, terkelica; Slovinsko: tropinovec; Srbsko a Balkán: rakie, komovica; Španělsko: orujo. Nutno podotknout, že ceněný destilát se vyrábí zásadně diskontinuální metodou a naopak méně kvalitní pálenky metodou kontinuální. Koncentrace methanolu v EU nesmí převýšit 1,5 % z čistého 100% ethanolu[9].

Matolinovice je složením v zásadě podobná výše popsaným brandy a koňakům, leč protože je destilována z matolinové kaše, může být kompozice obsažených látek bohatší například o octovou kyselinu extrahovanou z dřevných hemicelulos, případně i ve směsi s methanolem a acetonem ze „suché destilace“ dřevitých součástí matoliny, ale jde i o furfural, 2-fenylethanol, acetaldehyd, butan-2-ol a další vyšší alkoholy, což činí matolinovice rozdílné od čistě vinných destilátů. Často jsou matolinovice též bohatší na terpenové alkoholy, jako citronellol, geraniol, linalool, nerol and α-terpineol[22]. Záleží ale nejen na technologii a pečlivosti provedení destilačního procesu, ale i na délce a způsobu uskladnění matoliny.

Těkavé sloučeniny, které nejvíce přispívají k senzorické kvalitě lihoviny z matolin, jsou (stejně jako u jiných lihovin) estery mastných kyselin. Ty vznikají při fermentaci a nacházejí se ve výsledném destilátu, přičemž jejich koncentrace se obecně liší podle odrůdy hroznů, způsobu destilace a uskladnění. Obecně lze říci, že stárnutím destilátu jejich koncentrace roste, jde např. o ethyl-hexanoát a ethyl-oktanoát. Tyto dva estery přispívají k lihovinovému aromatu mastných nebo voskových tónů. Octové estery, jako je hexyl-acetát, isoamyl-acetát a 2-fenylethyl-acetát, jsou pak zodpovědné za květinově-ovocné tóny. Opět vyšší koncentrace ethyl-acetátu a isoamyl-acetátu jsou považovány za nežádoucí[1], stejně jako vyšší obsah kyseliny octové. Svým dílem přispívají k lihovinovému aromatu též 3-methyl-1-butanol (isoamylalkohol) a 2-methyl-1-butanol.

Přinášíme tento příspěvek jako další příspěvek do série učebních textů popisujících různé zajímavé aspekty chemie přírodních látek[23–25] i proto, že chceme takto reagovat na množství smyšlenek, polopravd a nesmyslů, které jsou kolem přírodních sloučenin dnes šířeny. Je nabíledni, že zkoumání přírodních látek, jakožto látek

z obnovitelných zdrojů, je jednou z cest, jak laciným a efektivním způsobem přispět ku všeobecnému prospěchu[26,27].

LITERATURA

1. Buglass A. J. (ed.): *Handbook of Alcoholic Beverages*, Wiley, Chichester 2011.
2. Jurášek M., Opletal L., Drašar P.: Chem. Listy *115*, 458 (2021).
3. Léauté R.: Am. J. Enol. Vitic. *41*, 90 (1990).
4. de Furno V.: *Liber selectiorum remediorum pro conservanda sanitate ad totius corporos humani morbos*, Mohuč 1521.
5. Neuburger M.: *Geschichte der Medizin*, Inktank, Bremen 2019.
6. https://www.grandsudinsolite.fr/1839-16-charente-la-legende-du-chevalier-de-la-croix-maron--inventeur-de-la-double-distillation.html, staženo 12. 12. 2022.
7. Moravcová J., Opletal L., Lapčík O., Čopíková J., Uher M., Drašar P.: Chem. Listy *101*, 1002 (2007).
8. Čopíková J., Wimmer Z., Lapčík O., Cahlíková L., Opletal L., Moravcová J., Drašar P.: Chem. Listy *108*, 1053 (2014).
9. Official Journal of the European Communities. Úřední věstník evropských společenství L 160/1 (12.6.1989): Nařízení rady (EHS) č. 1576/89 ze dne 29. května 1989, kterým se stanoví obecná pravidla pro definici, označování a obchodní úpravu lihovin.
10. https://www.slideshare.net/SunilKumar148/brandy-34796489, staženo 12. 12. 2022.
11. Anonym: Décret du 15 mai 1936 sur la défination appellation controllée comcernant les eaux-de-vie: "Cognac" (tel que modifié jusqu'au 10 mars 1993).
12. Shiltsev V.: Phys. Today, 22 Aug. 2019, DOI:10.1063/PT.6.4.20190822a
13. Awad P., Athès V., Decloux M. E., Ferrari G., Snakkers G., Raguenaud P., Giampaoli P.: J. Agric. Food Chem. *65*, 7736 (2017).
14 Amerling K., v knize: *Lučební základové hospodářství a řemeslnictví. Ku prospěchu čekatelům promyslných škol. Lučba organická*, str. 112. B. Rohlíček, Arcibiskupský seminář, Praha 1854.
15. Tsakiris A., Kallithrak S., Kourkoutas Y.: J. Sci. Food Agric. *94*, 404 (2014).
16. Kolektiv: The Merck Index, Merck & Co. Inc. Whitehouse station, 2001.
17. Kolektiv: ACD/Percepta, Release 2022.1.0, Build 3577), Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, 2022.
18. Nascimento R., Marques J., Neto B., Keukeleire D., Franco D.: J. Chromatogr. A *782*, 13 (1997).
19. Caldeira I., Clímaco M., Bruno de Sousa R., Belchior A.: J. Food Eng. *76*, 202 (2006).
20. Mosedale J. R., Puech J.-L.: Trends Food Sci. Technol. *9*, 95 (1998).
21. Laufenberg G., Kunz B., Nystroem M.: Bioresour. Technol. *8*, 167 (2003).
22. Peña R. M., Barciela J., Herrero C., García-Martín S.: Food Chem. *56*, 2788 (2008).
23. Jurášek M., Stárka L., Drašar P.: Chem. Listy *116*, 115 (2022).
24. Bejček J., Spiwok W., Kmoníčková E., Ruml T., Rimpelová S.: Chem. Listy *115*, 4 (2021).
25. Jurášek M., Opletal L., Kmoníčková E., Drašar P.: Chem. Listy *115*, 363 (2021).
26. Jurášek M., Opletal L., Harmatha J., Sláma K., Drašar P.: Chem. Listy *115*, 595 (2021).
27. Rádl S.: Chem. Listy *115*, 246 (2021).

M. Jurášek and P. Drašar *(Department of Chemistry of Natural Substances, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic)*: **On Spirit (Soul) from Wine**

The article describes the history and basics of production of wine and pomace spirits. It brings information about content, aging (maturation), and nomenclature of various types of wine and pomace distillates.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: alcohol, cognac, brandy, pomace spirits, Weinbrand, alembic

Chemické Listy

Referát

www.chemicke-listy.cz

LIGNIN A JEHO BIOKONVERZE NA POLYHYDROXYALKANOÁTY BAKTERIÍ *PSEUDOMONAS PUTIDA*

Dominik Maršík

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
marsikd@vscht.cz

Došlo 29.12.21, přijato 15.1.23.

Rostlinná biomasa je velice slibným zdrojem surovin pro výrobu udržitelných paliv a chemikálií jinak pocházejících z ropných produktů. Součástí rostlinné biomasy je mimo jiné lignin, který je jedním z hlavních přírodních zdrojů aromatických sloučenin. Přestože se jedná o rozsáhlý vedlejší produkt průmyslu a obnovitelný zdroj uhlíku, další zpracování na produkty s přidanou hodnotou je v současné době velice omezené. Jednou z mnoha aktuálně studovaných aplikací ligninu je jeho biokonverze na polyhydroxyalkanoáty neboli biologicky odbouratelné polymery, které by mohly díky svým vlastnostem nalézt uplatnění ve výrobě produktů pro každodenní použití nebo v lékařských aplikacích a v budoucnu nahradit plasty na bázi ropy. Produkovány jsou řadou bakterií ve formě intracelulárních granulí, jejich průmyslovému zavedení však brání vysoké výrobní náklady, které se odvíjí zejména od ceny zdroje uhlíku využitého pro kultivaci. Účinnou biokonverzí ligninu na polyhydroxyalkanoáty bychom mohli získat ekologické a nákladově efektivní biorafinérie. Nicméně k úspěšnému převedení technologie do průmyslového měřítka je nutné připravit biologického činitele, který bude rychle a účinně asimilovat aromatické složky ligninu. Nadějným kandidátem je metabolicky všestranná bakterie *Pseudomonas putida*. I přestože se jedná o bakterii s lignolytickou aktivitou, komercializace procesu vyžaduje vedle výzkumu v oblasti genetické a metabolické regulace také přípravu kvalitního substrátu, který závisí na zdroji a samotném izolačním postupu a pravděpodobně se neobejde bez dobré charakterizace a předúpravy ligninu.

Klíčová slova: lignin, polyhydroxyalkanoáty, *Pseudomonas putida*, bioplasty

Obsah

1. Úvod
2. Lignin
   2.1. Biosyntéza ligninu
3. Polyhydroxyalkanoáty
   3.1. Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů
4. Závěr

1. Úvod

Plasty tvoří neodmyslitelnou součást našich každodenních životů a jsou nezbytné pro fungování moderní společnosti. V mnoha průmyslových a medicínských aplikacích úspěšně nahrazují sklo, dřevo i kov. Na druhou stranu, stále rostoucí množství biologicky nerozložitelného plastového odpadu představuje pro lidstvo globální ekologický problém. Každoroční celosvětová produkce plastů přesahuje více než 350 miliónů tun (cit.[1,2]) a přibližně 50 % z celkového množství je použito na produkty určené ke spotřebě a likvidaci do jednoho roku od nákupu[3]. Zásoby fosilních paliv jsou navíc omezené a v dohledné době dojde k jejich vyčerpání. Z těchto důvodů je vyvíjena snaha nahradit plasty na bázi ropy bioplasty s obdobnými vlastnostmi[4]. Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (IUPAC)[5] definuje bioplasty jako polymery na biologické bázi odvozené z biomasy nebo monomerů získaných z biomasy. Tyto materiály mohou být jak biodegradovatelné, tak nebiodegradovatelné. V literatuře se lze setkat s označením bioplast i pro biodegradovatelné plasty odvozené z fosilních paliv, nicméně zařazení do této skupiny se nedoporučuje[6].

Jedním z velice slibných bioplastů jsou biodegradovatlené polyhydroxyalkanoáty (PHA). Zdrojem PHA je řada mikroorganismů, které ukládají tento polymer na biologické bázi intracelulárně jako zásobu uhlíku a energie. Jejich fyzikální vlastnosti jsou srovnatelné s běžnými komoditními plasty na bázi ropy, jako je polypropylen, polyethylen nebo polystyren[7]. V současné době jsou využívány jako přísada k polylaktidovým vláknům (PLA) a polyvinylchloridu (PVC) využívaných v kosmetice, medicíně a textilních materiálech[4]. I přes příznivé prognózy nárůstu produkce PHA jsou bioplasty obecně ve srovnání s plasty na bázi ropy stále využívány zřídka. Dle údajů zveřejněných European Bioplastics ve spolupráci s nova-Institute (Hürth, Německo)[2] dosahovala celosvětová kapacita produkce bioplastů v roce 2020 přibližně 2,11 milionů tun. Téměř 60 % těchto materiálů bylo biologicky rozložitelných, 1,7 % zaujímaly PHA. Do roku 2025 se předpokládá navýšení produkce PHA na 11,5 % celkového množství bioplastů.

Aby byla mikrobiální výroba PHA schopná průmyslově konkurovat výrobě syntetických plastů, je potřeba

snížit náklady na bakteriální kultivaci. Zdroj uhlíku tvoří asi 50 % celkových výrobních nákladů. Z tohoto důvodu stále roste potřeba vývoje nových mikrobiálních procesů využívajících levné zdroje uhlíku. Důležitými požadavky na substrát je konstantní kvalita a stabilita, dostupnost ve stálém množství a kvalitě po celý rok[4]. Vhodným kandidátem je lignin, který tvoří s polysacharidy celulosou a hemicelulosou více než 90 % lignocelulosové biomasy[8]. Zatímco celulosa je široce využívána v papírenském, textilním, potravinářském nebo chemickém průmyslu[9], lignin je obvykle považován za vedlejší nebo odpadní produkt výroby[10]. V roce 2017 dosahovala celosvětová produkce sulfátové buničiny pro výrobu papíru přibližně 130 miliónů tun, čímž bylo současně vyprodukováno okolo 70 miliónů tun ligninu. Odpadní lignin lze potenciálně spalováním převést na teplo a energii[11], nicméně jeho přímé spalování je bez ohledu na původ limitováno vysokým obsahem vody, heterogenním složením polymeru a tvorbou toxických produktů[12,13]. V současné době se na výrobu produktů s přidanou hodnotou využívá pouze 5 % z celkového dostupného množství ligninu. Z těchto důvodů je více než žádoucí najít cesty k valorizaci a dalšímu využití tohoto odpadního produktu[11].

Mezi metabolicky všestranné mikroorganismy schopné degradace ligninu patří zástupci rodu *Pseudomonas*[14]. Jedná se o rozsáhle studované bakterie produkující polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem (mcl-PHA)[4]. Nalezení účinné cesty přeměny ligninu na PHA by otevřelo cestu pro zavedení udržitelné moderní lignocelulosové biorafinérie[15].

2. Lignin

Lignin je nejrozšířenějším obnovitelným zdrojem aromatických sloučenin[16,17] a po celulose druhým nejvíce zastoupeným biopolymerem na Zemi[18], který tvoří 15 až 40 % sušiny většiny vyšších suchozemských rostlin[16,17]. Jako jedna ze tří hlavních složek biomasy představuje významný rezervoár uhlíku a jeho rozklad významně ovlivňuje uhlíkový cyklus[19]. Funkcí ligninu je posilovat buněčné stěny rostlinných buněk, usnadňovat transport vody a působit jako fyzická bariéra chránící rostliny před patogeny. Strukturně se jedná o heteropolymer složený z guayacylových (G), syringylových (S) a *p*-hydroxyfenylových (H) podjednotek odvozených z odpovídajících hydroxyskořicových alkoholů – koniferylalkoholu, sinapylalkoholu a *p*-kumarylalkoholu lišících se pouze stupněm methoxylace (schéma 1). Dosud bylo ve struktuře ligninu objeveno celkem 35 přirozeně se vyskytujících sloučenin z jedenácti skupin – hydroxyskořicové alkoholy, hydroxyarylpropanoly, hydroxyskořicové estery, hydroxyskořicové aldehydy, hydroxyskořicové kyseliny, estery hydroxycinamátu, hydroxycinnamidy, hydroxybenzaldehydy, hydroxybenzoové kyseliny, hydroxystilbeny a flavonoid tricin[20]. Během lignifikace jsou vzniklé monomery připojeny k rostoucímu řetězci mechanismem radikálové polymerace, která je vysoce flexibilní[17,21]. Výsledné množství a složení ligninu je ovlivněno stupněm vývoje rostliny či environmentálními podmínkami a liší se v závislosti na druhu rostliny, pletivu, typu buněk a vrstvě buněčné stěny. Komplexnost a rigidita ligninu nicméně znesnadňuje determinaci struktury polymeru a v současnosti neexistuje jednoduchá metoda umožňující přesnou kvantifikaci monomerních jednotek včetně vzájemného propojení. S využitím několika metod lze stanovit pouze aproximativní složení, které by nemělo být generalizováno pro daný rostlinný druh nebo tkáň. Obecně však vlákna a cévy rostlin obsahují z největší části tři základní hydroxyskořicové alkoholy a od nich odvozené acetáty, *p*-hydroxybenzoáty a *p*-kumaráty. Ostatní monolignoly jsou obvykle zastoupeny zřídka[20]. Pro lignin nahosemenných rostlin je pak typická absence S podjednotek a větvenější struktura v porovnání s ligninem krytosemenných rostlin, který je bohatý na podjednotky G a S. Feruláty a kumaráty jsou zastoupeny především v buněčných stěnách trav, kde mechanicky chrání mikrofibrily složené z celulosy proti působení mikroorganismů[17]. Lignin jednoděložných trav rovněž obsahuje malé, ale významné množství H podjednotek, které se u dvouděložných rostlin nacházejí pouze ve stopovém množství[22].

2.1. Biosyntéza ligninu

Komplexní strukturu ligninu lze přiblížit s pomocí biosyntézy ligninových monomerů. Syntéza dosud známých monolignolů je odvozena z obecné fenylpropanoidové dráhy (schéma 1). Výchozím substrátem biosyntézy je fenylalanin, který je konvertován působením ammonialyasy na kyselinu skořicovou. Tyrosin slouží pouze jako dodatečný substrát biosyntézy ligninu trav a za působení ammonialyasy je přeměněn na kyselinu *p*-kumarovou. Vzniku hydroxyskořicových alkoholů předchází redukce karboxylové kyseliny a v případě koniferyl a sinapyl alkoholů rovněž methoxylace aromatického kruhu. Redukce karboxylové kyseliny je katalyzována prostřednictvím 4CL, CCR a CAD a po reakci jsou postupně uvolňovány příslušné thioestery CoA, aldehydy a alkoholy. Hydroxylaci aromatického kruhu zajišťují enzymy cytochromu-P450, konkrétně C4H, C3H a F5H, zatímco 3-*O*-methylaci a 5-*O*-methylaci zprostředkovávají *O*-methyltransferasy COMT a CCoAOMT (cit.[20]). Alternativně mohou být konečnými produkty biosyntézy kyselina ferulová a sinapová vzniklé oxidací příslušných aldehydů po katalýze HCALDH (cit.[23,24]). Vysvětlení zkratek viz legenda k schématu 1.

Několik enzymů fenylpropanoidové dráhy jako 4CL, CCR, CAD, HCT, COMT, HCALDH a F5H katalyzuje více substrátů, díky čemuž mohou být koniferyl alkohol a sinapyl alkohol syntetizovány více paralelními cestami[20]. Vzniklé hydroxyskořicové alkoholy mohou sloužit jako monomery ligninu nebo mohou být za katalýzy acyltransferas PMT či FMT transformovány na γ-*O*-acylované esterové konjugáty. Mimoto slouží aktivované formy derivátů skořicové kyseliny k biosyntéze dalších tříd ligninových monomerů. *p*-Kumaroyl-CoA je substrátem pro

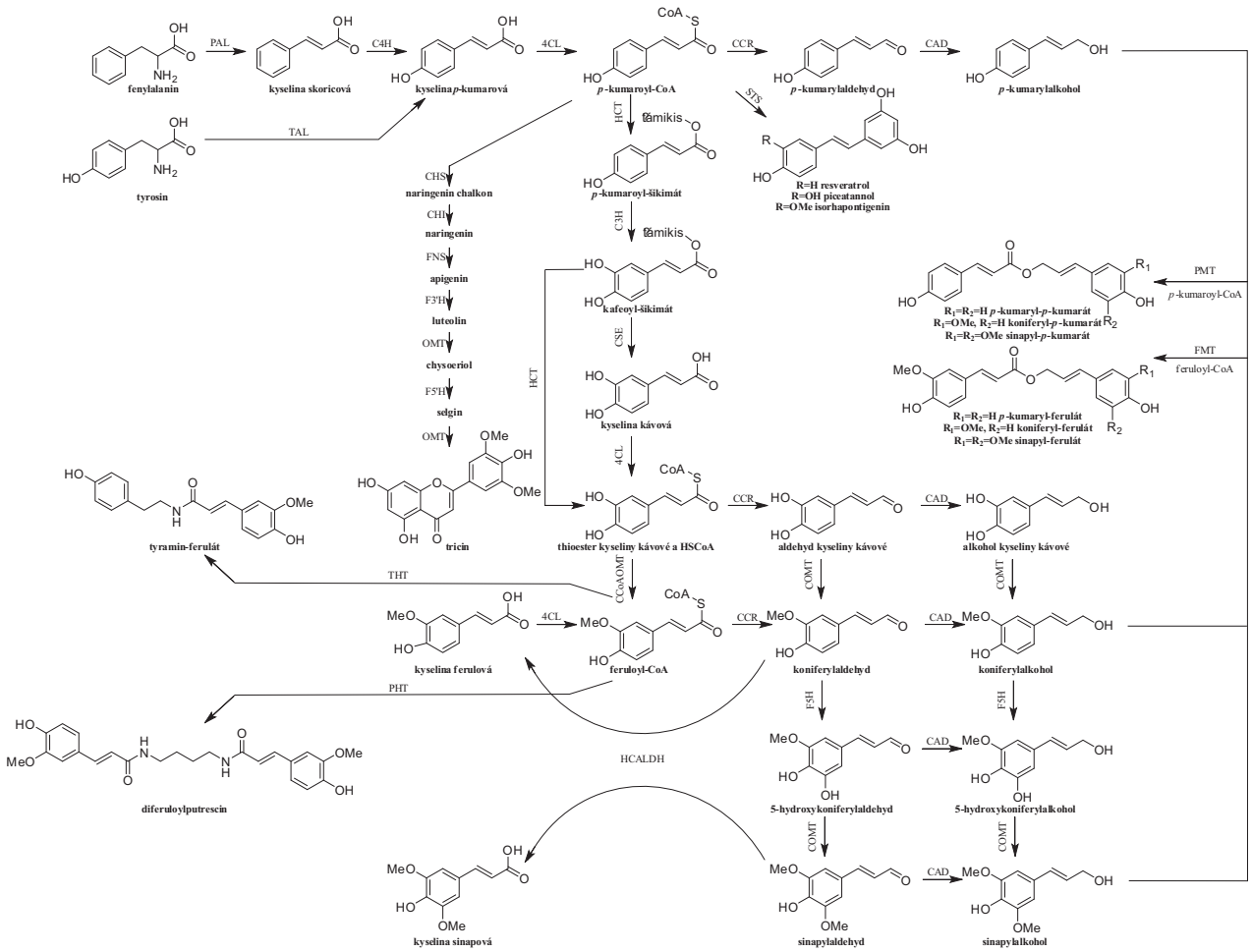


Schéma 1. **Metabolická dráha biosyntézy ligninových monomerů.** Schéma bylo omezeno na monomery, u kterých byla prokázána enzymatická syntéza alespoň *in vitro* testy. PAL: fenylalanin-ammonialyasa, TAL: tyrosin-ammonialyasa, C4H: cinamát-4-hydroxylasa, 4CL: 4-kumarát-CoA-ligasa, CCR: cinnamoyl-CoA-reduktasa, CAD: cinnamylalkohol-dehydrogenasa, CHS: chalkon-synthasa, CHI: chalkon-isomerasa, FNS: flavon-synthasa, F3'H: flavonoid-3'-hydroxylasa, OMT: *O*-methyltransferasa, F5'H: flavonoid-5'-hydroxylasa, HCT: *p*-hydroxycinnamoyl-CoA:chinát/šikimát-*p*-hydroxycinnamoyl-transferasa, C3H: *p*-kumarát-3-hydroxylasa, CSE: kafeoyl-šikimát--esterasa, CCoAOMT: kafeoyl-CoA-*O*-methyltransferasa, THT: hydroxycinnamoyl-CoA:tyramin-*N*-hydroxycinnamoyltransferasa, PHT: hydroxycinnamoyl-CoA:putrescin-hydroxycinnamoyltransferasa, COMT: kyselina kávová-*O*-methyltransferasa, F5H: ferulát-5-hydroxylasa, HCALDH: hydroxycinnamaldehyd-dehydrogenasa, FMT: feruloyl-CoA-monolignol-transferasa, PMT: *p*-kumaroyl-CoA--monolignol-transferasa, STS: stilben-synthasa. Přepracováno podle cit.[17,20]

vznik stilbenů a flavonoidů, zatímco feruloyl-CoA se účastní biosyntézy amidů kyseliny ferulové[25,26].

Charakteristickým meziproduktem fenylpropanoidové dráhy je *p*-kumaroyl-šikimát, který není k biosyntéze hydroxyskořicových alkoholů nezbytný, ale je výhodným substrátem k 3-hydroxylaci prostřednictvím C3H. Vzniklý ester kyseliny kávové a šikimátu je aktivitou CSE hydrolyzován zpět na kyselinu kávovou, která je následně konvertována na thioester kyseliny kávové a HSCoA prostřednictvím 4CL. Jelikož aktivita 4CL vyžaduje na rozdíl od HCT spotřebu ATP, je tento krok biosyntézy monolignolu z energetického hlediska nevýhodný[20,27,28].

3. Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polymery na biologické bázi, které mikroorganismy akumulují jako zásobní zdroj uhlíku a energie. V bakteriálních buňkách jsou syntetizovány ve formě nerozpustných intracelulárních granulí s průměrem od 0,2 do 0,5 µm. Hydrofobní jádro granulí obsahuje PHA obklopené proteiny a fosfolipidy, které hrají důležitou roli v syntéze, degradaci a regulaci. Nejčastěji zastoupenými proteiny jsou phasiny. Samotné PHA jsou polyestery složené z opakujících se monomerů hydroxykyselin, které jsou vzájemně propojeny vazbou mezi karboxylovou a hydroxylovou skupinou. Doposud je

známo více než 150 odlišných monomerních struktur PHA, jejichž struktura závisí např. na producentovi či zdroji uhlíku použitém při kultivaci[4]. Dle počtu atomů uhlíku obsažených v monomeru lze PHA rozdělit na polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem (scl-PHA), polyhydroxyalkanoáty se středním řetězcem (mcl-PHA) a PHA obsahující opakující se scl a mcl (scl-*co*-mcl PHA) jednotky, přičemž monomer scl-PHA obsahuje od 3 do 5 atomů uhlíku, zatímco monomer mcl-PHA je složen z 6 až 14 atomů uhlíku[29]. Vzhledem k vyšší pružnosti, pevnosti v tahu, nižšímu stupni krystalinity a dostatečnému bodu tání jsou polymery mcl-PHA preferovaným produktem před scl-PHA (cit.[4]) pro výrobu bioplastů.

Mimo zásobní funkci přispívají PHA k odolnosti mikrobiálních buněk proti stresovým podmínkám. Obecně napomáhají zachovat buněčnou integritu při náhlé osmotické nerovnováze, slouží jako účinné kryoprotektanty a například 3-hydroxybutyrát zvyšuje odolnost enzymů proti tepelné denaturaci a oxidačnímu stresu[4]. Především se ale jedná o udržitelný, biokompatibilní, kompletně biologicky rozložitelný materiál s nízkými emisemi CO_2, díky čemuž jsou PHA vhodnou alternativou k současným plastům vyrobených z ropy. Mimoto možnost přizpůsobení molekulové hmotnosti, tepelných a mechanických vlastností, umožňuje využít PHA jako chemické prekurzory a paliva na bázi methylesterů[15].

3.1. Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

Za optimálních podmínek může produkce PHA bakteriálními buňkami dosahovat až 90% výtěžků, vztaženo na suchou hmotnost biomasy[4]. Ve studii Langenbach a spol.[30] se podařilo syntetizovat vysoký obsah PHA v *E. coli* s využitím mastných kyselin jako zdroje uhlíku. Z důvodu vysoké ceny mastných kyselin bylo potřeba nalézt další možnosti syntézy. Wang a spol.[29] úspěšně produkovali PHA v rekombinantní *E. coli* s využitím glukosy a glycerolu. Vzhledem k tomu, že glukosu lze získat z celulosy a glycerol je vedlejším produktem výroby bionafty, jedná se o potenciálně vhodné zdroje uhlíku k produkci PHA, jejichž cena bude pravděpodobně s rozvojem technologií klesat. I přes úspěšnou produkci PHA v *E. coli* s využitím celulosy a glycerolu jako zdroje uhlíku je v současné době stále poptávka po alternativních systémech, které by snížily produkční náklady. Celulosa a glycerol jsou rovněž využívány i v dalších odvětvích průmyslu[31,32]. Naproti tomu je použití ligninu v současné době stále limitováno[33] a vzhledem k jeho rozšíření se jedná o vhodný zdroj uhlíku s potenciálem snížit náklady na produkci PHA. Biologická valorizace ligninu mikroorganismy však vyžaduje nejprve rozklad polymeru za vzniku nízkomolekulárních látek, které mohou být dále přeměněny na produkty s přidanou hodnotou.

Degradovat lignin jsou schopné tzv. houby bílé hniloby. Jejich průmyslové využití nebylo nikdy úspěšně komercializováno z důvodu nestability, obtížné exprese rekombinantních proteinů a komplexnosti genomu. Naproti tomu bakterie rodu *Pseudomonas*, které jsou známé rovněž lignolytickou aktivitou, velmi dobře akumulují energeticky bohaté složky jako PHA, dobře se adaptují na různé typy prostředí a jsou pro ně běžně dostupné systémy pro genetickou modifikaci[19]. Vhodný zástupce rodu *Pseudomonas* pro utilizaci ligninu je *P. putida*, která produkuje mcl-PHA (cit.[34]) a je rovněž ceněná pro své nízké nutriční požadavky, vysokou toleranci vůči toxickým látkám a širokou metabolickou diverzitu[35]. Navíc se jedná o bakteriální druh efektivně transportující extracelulární aromatické sloučeniny do interiéru buňky jak aktivním, tak pasivním transportem[35]. Samotný rozklad ligninu zahajuje *P. putida* oxidoreduktasami (lakasami, peroxidasami), jejichž účinkem jsou z polymeru uvolňovány sloučeniny, které mohou být následně utilizovány metabolickými drahami pro aromatické látky[15]. Z důvodu komplexní struktury ligninu se obvykle pro studium a optimalizaci procesu volí modelové sloučeniny jako kyselina vanilová, *p*-kumarová nebo ferulová[36]. Kyselina vanilová je klíčový meziprodukt v metabolismu ligninu, protože spojuje několik periferních drah s centrální metabolickou dráhou β-ketoadipátu, která generuje acetyl-CoA potřebný k *de novo* syntéze mastných kyselin využitých k produkci PHA (cit.[15]). Obdobně jako u *E. coli* lze i u *P. putida* využít jako zdroj uhlíku k produkci PHA přímo mastné kyseliny podléhající β-oxidaci. Obě zmíněné metabolické cesty vedou ke vzniku (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA, který je pomocí PHA-synthas kódovaných geny *PhaC* začleněn do řetězce mcl-PHA. Pokud je zdrojem uhlíku při kultivaci přímo mastná kyselina, předchází vzniku (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA hydratace meziproduktu β-oxidace *trans*-2-enoylu-CoA katalyzovaná hydratasou kódovanou genem *PhaJ*. V opačném případě, kdy je potřeba syntézu mastných kyselin zajistit, dochází ke konverzi meziproduktů metabolické dráhy na (*R*)-3-hydroxyacyl-ACP, který podléhá hydrolýze na volnou hydroxy mastnou kyselinu, ke které je následně připojen prostřednictvím ligasy kódované genem *AlkK* koenzym A (schéma 2). V případě úplného vyčerpání zdroje uhlíku může nastat rovněž depolymerace PHA katalyzovaná prostřednictvím PHA-depolymeras *PhaZ* (cit.[36]).

K akumulaci mcl-PHA u *P. putida* dochází zejména za podmínek kultivace v nadbytku uhlíku a limitaci jednoho z dalších nutrientů, např. dusíku. Při nedostatku dusíku nastává při kultivaci s využitím kyseliny vanilové indukce enoyl-CoA-hydratasy kódované genem *PhaJ*, která pravděpodobně přispívá k produkci mcl-PHA. Nedostatek dusíku na druhou stranu limituje růst, což ovlivňuje jeden z kritických faktorů produkce PHA, a to množství celkové biomasy[15]. Ve snaze zvýšit efektivitu produkce mcl-PHA byla využita celá řada metod genového inženýrství s cílem posílit expresi operonu syntézy PHA; vyřadit konkurenční metabolickou dráhu – β-oxidaci mastných kyselin; zvýšit dodávku NADH nebo NADPH; změnit morfologii a zvětšit buňky nebo zamezit utilizaci PHA (cit.[36]). Komercializace procesu se neobejde bez efektivní biokonverze ligninu, která vyžaduje mimo nalezení optimálních podmínek kultivace rovněž cílený zásah do metabolismu *P. putida*[35]. U *P. putida* se podařilo odstraněním genu pro Crc protein

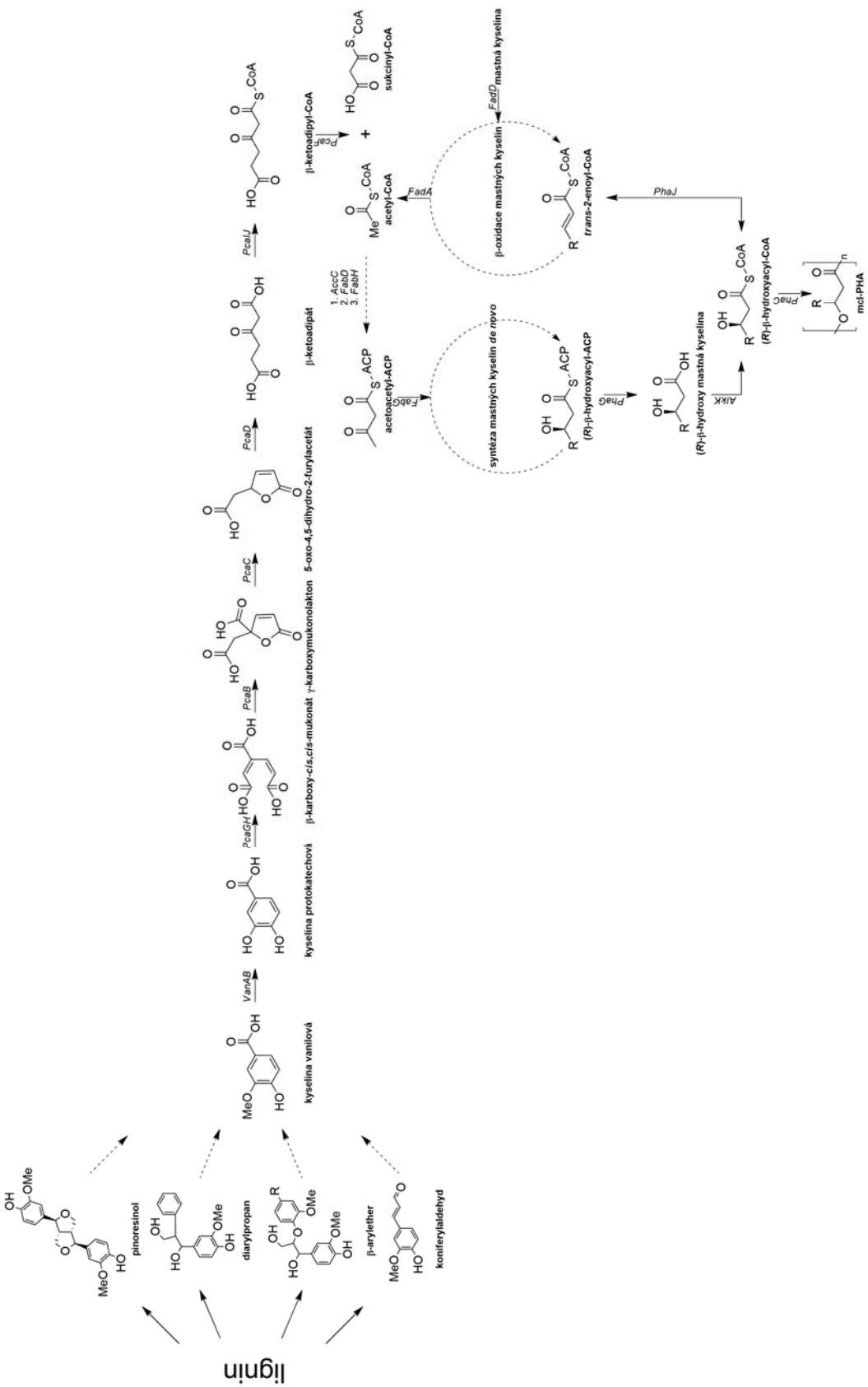


Schéma 2. **Zjednodušené schéma biokonverze ligninu na mcl-PHA bakterií *Pseudomonas putida* A514.** Přerušované šipky naznačují několik kroků syntézy meziproduktů metabolické dráhy. *VanAB*: vanilát-*O*-demethylasa, *PcaGH*: protokatechuát-3,4-dioxygenasa, *PcaB*: 3-karboxy-*cis*-*cis*-mukonát-cykloisomerasa, *PcaC*: 4-karboxymukonolakton-dekarboxylasa, *PcaD*: 3-oxoadipát-enol-laktonasa, *PcaIJ*: 3-oxoadipát-CoA-transferasa, *PcaF*: 3-xoadipyl-CoA-thiolasa, *AccC*: biotin-karboxylasa, *FabD*: malonyl-CoA-ACP-transacylasa, *FabH*: 3-oxoacyl-ACP-synthasa, *FabG*: 3-oxoacyl-ACP-reduktasa, *PhaG*: 3-hydroxyacyl-ACP-thioesterasa, *AlkK*: mastná kyselina se středním řetězcem-CoA-ligasa, *PhaC*: poly(3-hydroxyalkanoát)-polymerasa, *FadA*: 3-ketoacyl-CoA-thiolasa, *FadD*: mastná kyselina s dlouhým řetězcem-CoA-ligasa, *PhaJ*: (*R*)-specifická-enoyl-CoA-hydratasa. Přepracováno podle cit.[15,36]

dosáhnout usnadněné konverze ferulové a *p*-kumarové kyseliny na kyselinu *cis*,*cis*-mukonovou. Crc protein řídí v bakterii katabolickou represi aromatických sloučenin v přítomnosti preferovaných substrátů, jako je acetát a jeho odstraněním tak lze zvýšit produktivitu kmene v prostředí heterogenního substrátu[37]. Samotnou asimilaci aromatických sloučenin lze přímo podpořit např. vysokou expresí genu *VanAB* kódujícího vanilát-*O*-demethylasu, která katalyzuje klíčový krok metabolismu aromatických sloučenin – přeměnu kyseliny vanilové na kyselinu protokatechovou (schéma 2). Nadprodukce tohoto enzymu u *P. putida* zlepšila růst a akumulaci PHA v případě využití kyseliny vanilové nebo ligninu jako jediného zdroje uhlíku[35,38]. Při depolymerizaci ligninu mohou vznikat rovněž substráty, které není *P. putida* schopna přirozeně utilizovat. Jako příklad lze uvést guajakol vznikající bazicky katalyzovanou depolymerizací měkkého dřeva. Toto omezení se podařilo vyřešit ve studii García Hidalgo a spol.[39], kteří zavedli do *P. putida* cytochrom P450 z *Rhodococcus rhodochrous* za účelem demethylace guajakolu na katechol, který je pro *P. putida* snadno využitelný.

4. Závěr

Přestože je *P. putida* schopna lignin sama depolymerovat, jedná se o metabolicky a časově náročný proces, který dále limituje špatná rozpustnost polymeru v kultivačním médiu. Již tak rozmanitá struktura ligninu navíc závisí na vstupní surovině a samotném procesu izolace z lignocelulosové biomasy. Klíčovým krokem procesu je samotná extrakce velmi čistého ligninu, které předchází uvolnění sacharidové frakce přerušením vazeb v lignocelulosovém komplexu. Následuje depolymerace, která zvyšuje rozpustnost produktu a umožňuje separaci ligninu od biomasy. V průběhu procesu má lignin rovněž tendenci repolymerovat, čímž roste jeho komplexnost. Komercializace procesu se tak pravděpodobně neobejde bez efektivní předúpravy ligninu použitého pro kultivaci zahrnující separaci výhodných, ve vodě rozpustných substrátů získaných z rozpadu polymeru a snížení tvorby inhibitorů bakteriálního růstu. Pouze s kvalitním vstupním substrátem lze naplno využít výhod biologického systému, který funguje dobře v mírných podmínkách. Během návrhu procesu předúpravy ligninu je potřeba nalézt rovnováhu mezi ekonomickými aspekty a efektivitou při zachování environmentálně šetrného provozu. U procesu je dále potřeba zohlednit možnost implementace v komerčním měřítku[40,41].

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2_FPBT_2023_036.

Seznam zkratek

4CL	4-kumarát-CoA-ligasa (4-coumarate:CoA ligase)
AlkK	mastná kyselina se středním řetězcem-CoA--ligasa (medium-chain-fatty-acid-CoA ligase)
C3H	*p*-kumarát-3-hydroxylasa (*p*-coumarate 3-hydroxylase)
C4H	cinamát-4-hydroxylasa (cinnamate 4-hydroxylase)
CAD	cinnamylalkohol-dehydrogenasa (cinnamyl alcohol dehydrogenase)
CCoAOMT	kafeoyl-CoA-*O*-methyltransferasa (caffeoyl--CoA *O*-methyltransferase)
CCR	cinnamoyl-CoA-reduktasa (cinnamoyl--CoA reductase)
CoA/HSCoA	koenzym A (coenzyme A)
COMT	kyselina kávová-*O*-methyltransferasa (caffeic acid *o*-methyltransferase)
Crc	regulátor represe katabolitů (catabolite repression control)
CSE	kafeoyl-šikimát-esterasa (caffeyol shikimate esterase)
F5H	ferulát-5-hydroxylasa (ferulate 5-hydroxylase)
FMT	feruloyl-CoA-monolignol-transferasa (feruloyl-CoA monolignol transferase)
G	guayacyl (guaiacyl)
H	*p*-hydroxyfenyl (*p*-hydroxyphenyl)
HCALDH	hydroxycinnamaldehyd-dehydrogenasa (hydroxycinnamaldehyde dehydrogenase)
HCT	*p*-hydroxycinnamoyl-CoA:chinát/šikimát--*p*-hydroxycinnamoyl-transferasa (*p*-hydroxycinnamoyl-CoA:quinate/ shikimate *p*-hydroxycinnamoyltransferase)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a udržitelnou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
mcl-PHA	polyhydroxyalkanoáty se středně dlouhým řetězcem (medium chain lenght poly-hydroxyalkanoate)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (nicotinamide adenine dinucleotide)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
PHA	polyhydroxyalkanoáty (polyhydroxyalkanoates)
Phac	poly(3-hydroxyalkanoát)-polymerasa [poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase]
PhaJ	(*R*)-specifická-enoyl-CoA-hydratasa [(*R*)-specific enoyl-CoA hydratase]
PhaZ	PHA-depolymerasa (PHA depolymerase)
PLA	polylaktid (polylactide)
PMT	*p*-kumaroyl-CoA-monolignol-transferasa (*p*-coumaroyl-CoA monolignol transferase)
PVC	polyvinylchlorid (polyvinyl chloride)
S	syringyl (syringyl)

scl-PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkým řetězcem (short chain lenght polyhydroxyalkanoate)
VanA	vanilát-*O*-demethylasa podjednotka A (vanillate *O*-demethylase oxygenase subunit)
VanB	vanilát-*O*-demethylasa podjednotka B (vanillate *O*-demethylase oxidoreducatese subunit)

LITERATURA

1. Chinthapalli R., Skoczinski P., Carus M., Baltus W., de Guzman D., Käb H., Raschka A., Ravenstijn J.: Ind. Biotechnol. *15*, 237 (2019).
2. Nova-Institute.: *15th European Bioplastics Conference, 30 November-3 December 2020, virtual,* poster Bioplastics market development update 2020, https:// docs. european-bioplastics.org/conference/ Report_Bioplastics_Market_Data_2020_ short_version.pdf, staženo 15. 12. 2021.
3. Singh P., Sharma V. P.: Procedia Environ. Sci. *35*, 692 (2016).
4. Mozejko-Ciesielska J., Szacherska K., Marciniak P.: J. Polym. Environ. *27*, 1151 (2019).
5. Vert M., Doi Y., Hellwick K. H., Hodge P., Kubisa P., Rinaudo M., Schué F.: Pure Appl. Chem. *85*, 377 (2012).
6. Rosenboom J. G., Langer R., Traverso G.: Nat. Rev. Mater. *7*, 117 (2022).
7. Muhammadi S. A. M., Hameed S.: J. Polym. Environ. *27*, 1151 (2019).
8. Williams C. L., Emerson R. M., Tumuluru J. S., v knize: *Biomass Volume Estimation and Valorization for Energy* (Tumuluru J. S., ed.), str. 251. IntechOpen, Rijeka 2017.
9. Sundarraj A. A., Ranganathan T. V.: Drug Invent. Today *10*, 89 (2018).
10. Luo H., Klein I. M., Jiang Y., Zhu H., Liu B., Kenttämaa H. I., Abu-Omar M. M.: ACS Sustainable Chem. Eng. *4*, 2316 (2016).
11. Supanchaiyamat N., Jetsrisuparb K., Knijnenburg J. T. N., Tsang D. C. W., Hunt A. J.: Bioresour. Technol. *272*, 570 (2019).
12. Tsvetkov M. V., Salganskii E. A.: Russ. J. Appl. Chem. *91*, 1129 (2018).
13. Font R., Esperanza M., García A. N.: Chemosphere *52*, 1047 (2003).
14. Bugg T. D. H., Ahmad M., Hardiman E. M., Singh R.: Curr. Opin. Biotechnol. *22*, 394 (2011).
15. Wang X., Lin L., Dong J., Ling J., Wang W., Wang H., Zhang Z., Yu X.: Appl. Environ. Microbiol. *84*, 18 (2018). doi: 10.1128/AEM.01469-18.
16. Cao Y., Chen S. S., Zhang S., Ok Y. S., Matsagar B. M., Wu K. C. W., Tsang D. C. W.: Bioresour. Technol. *291*, 121878 (2019).
17. Ragauskas A. J. a 15 spoluautorů: Science *344*, 709 (2014).
18. Argyropoulos D. S., Menachem S. B., v knize: *Biopolymers from renewable resources*, (Kaplan D. L., ed.), str. 292. Springer, Heidelberg 1998.
19. Lin L., Wang X., Cao L., Xu M.: Environ. Microbiol. *21*, 1847 (2019).
20. Vanholme R., De Meester B., Ralph J., Boerjan W.: Curr. Opin. Biotechnol. *56*, 230 (2019).
21. Ralph J., Lapierre C., Boerjan W.: Curr. Opin. Biotechnol. *56*, 240 (2019).
22. Vogel J.: Curr. Opin. Plant Biol. *11*, 301 (2008).
23. Nair R. B., Bastress K. L., Ruegger M. O., Denault J. W., Chapple C.: Plant Cell *16*, 544 (2004).
24. Vanholme R. a 12 spoluautorů: Plant J. *64*, 885 (2010).
25. Petrik D. L. a 12 spoluautorů: Plant J. *77*, 713 (2014).
26. Smith R. A. a 11 spoluautorů: Biotechnol. Biofuels *10*, 109 (2017).
27. Saleme M. d. L. S. a 14 spoluautorů: Plant Physiol. *175*, 1040 (2017).
28. Ha C. M., Escamilla-Trevino L., Yarce J. C. S., Kim H., Ralph J., Chen F., Dixon R. A.: Plant J. *86*, 363 (2016).
29. Wang Q., Tappel R. C., Zhu C., Nomura C. T.: Appl. Environ. Microbiol. *78*, 519 (2012).
30. Langenbach S., Rehm B. H., Steinbüchel A.: FEMS Microbiol. Lett. *150*, 303 (1997).
31. Jedvert K., Heinze T.: J. Polym. Eng. *37*, 845 (2017).
32. Fan X., Burton R., Zhou Y.: Open Fuels Energy Sci. J. *3*, 17 (2010).
33. Chio C., Sain M., Qin W.: Renewable Sustainable Energy Rev. *107*, 232 (2019).
34. Borrero-de Acuña J. M., Bielecka A., Häussler S., Schobert M., Jahn M., Wittmann C., Jahn D., Poblete-Castro I.: Microb. Cell Fact. *13*, 88 (2014).
35. Lee S., Sohn J.-H., Bae J.-H., Kim S. C., Sung B. H.: Biotechnol. Bioprocess Eng. *25*, 862 (2020).
36. Salvachúa D. a 17 spoluautorů: Microb. Biotechnol. *13*, 290 (2020).
37. Johnson C. W., Abraham P. E., Linger J. G., Khanna P., Hettich R. L., Beckham G. T.: Metab. Eng. Commun. *5*, 19 (2017).
38. Lin L., Cheng Y., Pu Y., Sun S., Li X., Jin M., Pierson E. A., Gross D. C., Dale B. E., Dai S. Y.: Green Chem. *18*, 5536 (2016).
39. García-Hidalgo J., Ravi K., Kuré L.-L., Lidén G., Gorwa-Grauslund M.: AMB Express *9*, 34 (2019).
40. Anthony W. E., Carr R. R., DeLorenzo D. M., Campbell T. P., Shang Z., Foston M., Moon T. S., Dantas G.: Biotechnol. Biofuels *12*, 192 (2019).
41. Kumar M., You S., Beiyuan J., Luo G., Gupta J., Kumar S., Singh L., Zhang S., Tsang D. C. W.: Bioresour. Technol. *320*, 124412 (2021).

D. Maršík *(Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague, Czech Republic):*
Lignin and Its Bioconversion to Polyhydroxyalkanoates by the Bacterium *Pseudomonas putida*

Plant biomass is a very promising source of raw materials to produce sustainable fuels and chemicals otherwise derived from petroleum-based products. Part of plant biomass is lignin, which is one of the main natural sources of aromatic compounds. Although it is a large industrial by-product and a renewable carbon source, further processing into value-added products is currently limited. One of many applications of lignin under consideration is its bioconversion to polyhydroxyalkanoates, i.e., biodegradable polymers, which, due to their properties, could find their use in the fabrication of everyday products or in medicine and replace petroleum-based plastics in the future. They are produced by various bacteria in the form of intracellular granules but their industrial implementation is hindered by high production costs, which depend mainly on the price of the carbon source used for cultivation. Through the efficient bioconversion of lignin to polyhydroxyalkanoates, we could obtain environment-friendly and cost-effective biorefineries. However, to successfully bring the technology to an industrial scale, it is necessary to prepare a biological agent that will quickly and efficiently assimilate the aromatic components of lignin. The metabolically versatile bacterium *Pseudomonas putida* represents a promising candidate. Although it is a bacterium with lignolytic activity, the commercialization of the process requires further research on genetic and metabolic regulation and the preparation of a quality substrate, which depends on the source and the isolation process itself, and the success is unlikely to be achieved without good characterization and pretreatment of lignin.

Keywords: lignin, polyhydroxyalkanoates, *Pseudomonas putida*, bioplastics

Acknowledgements
This work was supported from the grant of Specific university research – grant No A2_FPBT_2023_036.

Chemické Listy

Referát

www.chemicke-listy.cz

PRÍPRAVA A POUŽITIE POLYMÉRNYCH ADSORBENTOV S ODTLAČKOM MOLEKÚL V SÚLADE S PRINCÍPMI ZELENEJ CHÉMIE

Andrea Špačková a Katarína Hroboňová

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Ústav analytickej chémie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
andrea.spackova@stuba.sk, katarina.hrobonova@stuba.sk

Prišlo 12.1.23, prijaté 16.2.23.

Technológia molekulového odtlačku je vhodným nástrojom na vývoj selektívnych materiálov na izoláciu a separáciu látok a ich cielené použitie. Cieľom práce bolo zostaviť prehľad súčasných trendov v príprave MIP (polymérov s odtlačkom molekul). Zamerali sme sa na implementáciu ekologicky prijateľných riešení do postupov výroby a aplikácie MIP, najmä na účely chemických analýz. Teoretické prístupy a simulácie výberu optimálnych zložiek polymerizačnej zmesi, aplikácia ultrazvuku a mikrovlnného žiarenia pri syntéze MIP, ako aj mikroextrakčné postupy na prípravu komplexných vzoriek na analýzu sa úspešne uplatňujú pri vývoji analytických metód založených na MIP adsorbentoch. Hoci použitie zmesí s nízkou teplotou prechodu (hlboké eutektické rozpúšťadlá, iónové kvapaliny) a zložiek biomasy ako náhrady alebo modifikácie porogénov, funkčných a sieťovacích monomérov alebo iných zložiek polymerizačnej zmesi môže pomôcť transformovať polymerizačné postupy na ekologickejšie, stále si vyžaduje skúmanie mechanizmov syntézy a ich vplyvu na vlastnosti pripravených MIP.

Kľúčové slová: polyméry s odtlačkom molekuly, ekologické alternatívy v príprave, použitie MIP

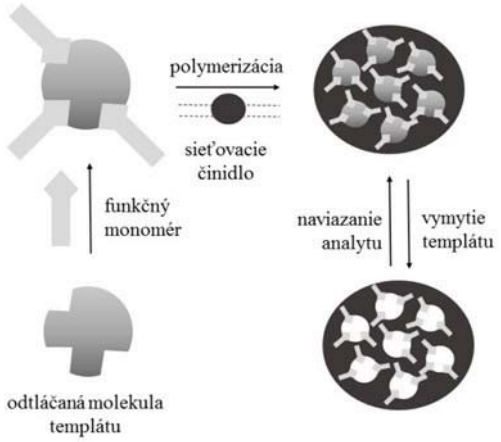
Obsah

1. Úvod
2. Optimalizácia prípravy polymérnych adsorbentov s odtlačkom molekuly
   2.1. Teoretické výpočty
   2.2. Stratégie polymerizácie
      2.2.1. Polymerizácia podporená ultrazvukom a mikrovlnným žiarením
      2.2.2. Polymerizácia na povrchu nosiča
   2.3. Zložky polymerizačnej zmesi
   2.4. Odstránenie templátu z polymérnych adsorbentov s odtlačkom molekuly
3. Využitie polymérnych adsorbentov s odtlačkom molekuly v miniaturizovaných extrakčných technikách
4. Záver

1. Úvod

Prvý vedecký koncept o odtláčaní molekúl navrhol už v roku 1931 Polyakov, ktorý pozoroval selektívne adsorpčné vlastnosti častíc oxidu kremičitého pripravených pomocou syntézy v prítomnosti inej molekuly[1]. Moderné technológie odtláčania molekúl publikovali ďalší autori, ktorí rozpracovali tri spôsoby molekulového odtláčania. Kovalentná metóda, ktorú zaviedol Wulff v sedemdesiatych rokoch[2], je založená na reverzibilných kovalentných väzbách. Naopak pri metóde navrhnutej Mosbachom v roku 1994 (cit.[3]) sa využívajú nekovalentné interakcie medzi odtláčanými molekulami a funkčnými monomérmi. Kovalentno-nekovalentný (semikovalentný) spôsob opísaný Whitcombom a spol.[4] kombinuje predošlé prístupy (po odstránení kovalentne viazanej molekuly templátu dochádza k následnému zachyteniu nekovalentnými interakciami. Syntéza takýchto materiálov je realizovateľná v laboratórnych podmienkach, avšak v súčasnosti sú už komerčne dostupné adsorbenty v kolónkach pre selektívnu extrakciu a skoncentrovanie vybraných látok/skupín látok (napr. polyaromatických uhľovodíkov, fenolových látok, katecholamínov, tetracyklínov, niektorých herbicídov, palutinu, chloramfenikolu, riboflavínu, bisfenol A, a iných)[5–7].

Technológia odtláčania molekúl zahrňuje návrh a syntézu polymérnych materiálov – polymérov s odtlačkom molekuly (MIP – Molecularly Imprinted Polymers) s charakteristickými štruktúrnymi časťami (dutinami komplementárnymi s molekulou odtláčanej látky – templátom), ktoré majú vysokú selektivitu pre cieľový analyt. Schému prípravy MIP dokumentuje obr. 1. Vďaka ich mnohým pozitívnym vlastnostiam (napr. vysoká mechanická aj chemická odolnosť, opakovaná použiteľnosť) narastá ich využitie v oblastiach, ako sú izolácia účinných látok z prírodných materiálov[8], odstraňovanie nežiaducich látok[9], zavádzanie liečiv na miesto biologického účinku[10], extrakčné a separačné metódy chemickej analýzy[11].



Obr. 1. **Schéma prípravy polyméru s odtlačkom molekuly**

Problematike MIP je venovaných viacero prehľadových článkov zameraných na spôsoby syntézy, hodnotenie sorpčných, kinetických, morfologických vlastností, ako aj na aplikácie v rôznych oblastiach[12–14]. Experimentálna optimalizácia syntézy MIP s využitím rôznych polymerizačných techník (bloková, precipitačná, suspenzná, a ďalšie) si vyžaduje použitie väčších objemov či množstiev (≥ 10 ml, g) organických rozpúšťadiel a iných chemikálií, produkuje množstvo odpadu zo syntézy, a preto sa v posledných rokoch kladie dôraz na hľadanie alternatívnych riešení z hľadiska energetickej šetrnosti postupov, či ekologickosti používaných chemikálií[15]. Alternatívnym zdrojom látok pre syntézu MIP môže byť odpad z biomasy či fytomasy, príkladom potenciálnych rozpúšťadiel (porogénov) sú napr. iónové kvapaliny, hlboko eutektické rozpúšťadlá, etanol, voda. K ekologickejším spôsobom prípravy patria aj prístupy využívajúce kvantové výpočty, ktoré na základe návrhu najpravdepodobnejších interakcií medzi templátom a monomérom v prítomnosti porogénneho rozpúšťadla uľahčujú výber vhodných zložiek polymerizačnej zmesi a eliminujú časť experimentálnej práce. Ďalšie ekoprístupy na minimalizovanie používania toxických alebo vzácnych templátov zahrňujú odtláčanie štruktúrne podobnej látky („dummy“ templát) a stratégie imprintovania s viacerými templátmi súčasne. Použitie „dummy“ templátu pri navrhovaní a syntéze MIP je vhodné aj na zabránenie „carryover“ efektu, ktorý môže ovplyvniť kvantifikáciu detegovaných látok. Uvedené prístupy sú vhodné pri príprave MIP aplikovaných v oblasti medicíny, kde je potrebné obmedziť toxicitu materiálov. Špeciálny typ predstavujú membrány s odtlačkom molekuly (MIM – Molecularly Imprinted Membrane) kombinujúce špecifické rozpoznávacie schopnosti MIP a vlastnosti membrán. MIM sú vhodné pre izoláciu látok v makromerítku a dokonca aj v kontinuálnom režime, vykazujú vyššiu väzbovú kapacitu a účinnosť separácie v porovnaní s tradičnými MIP adsorbentami[17].

Cieľom práce je poskytnúť prehľad ekologických a alternatívnych spôsobov prípravy MIP ako aj ich využitia v analýze reálnych vzoriek.

2. Optimalizácia prípravy polymérnych adsorbentov s odtlačkom molekuly

Aj keď polymerizačné stratégie pri syntéze MIP najčastejšie zahrňujú blokovú, precipitačnú a suspenznú polymerizáciu kvôli jednoduchosti ich prevedenia, žiadna z nich nie je úplne vhodná z hľadiska šetrnosti a časovej náročnosti (doba prípravy približne 24–50 h, spotreba rozpúšťadiel a chemikálií približne 10–15 ml g^{-1} MIP). Experimentálny prístup k príprave MIP metódou „pokus – omyl“, pozostáva zo syntézy produktov použitím širšej škály polymerizačných zložiek (funkčných monomérov, sieťovacích monomérov, porogénnych rozpúšťadiel) a podmienok polymerizácie (napr. teplota). Navyše, pri vývoji MIP experimentálnym optimalizovaním syntézy približne 50 % pripravených pevných materiálov tvorí odpad, ktorý nespĺňa požadované vlastnosti (napr. nízka adsorpčná kapacita, nevhodná morfológia, pomalá kinetika adsorpcie, iné). Pred experimentálnym uskutočnením polymerizácie je možné vopred pomocou teoretických výpočtov a návrhov modelov uskutočniť výber vhodných kombinácii zložiek polymerizačnej zmesi. Takéto nástroje sú užitočné, pretože vedú k úspore nákladov a zníženiu odpadu.

2.1. Teoretické výpočty

Výpočtová simulácia spája teoretické základy kvantovej a štatistickej mechaniky. Simulácia zmien v štruktúre molekúl a porovnávanie vzťahu medzi typom a energiou interakcie medzi molekulami umožňuje vysvetliť mechanizmus vzniku komplexov polymerizačných zložiek. Výpočtové metódy umožňujú účinne predpovedať najstabilnejšie konformačné zloženie medzi templátom a monomérom, jednoduché nastavenie parametrov syntézy aj bez obmedzenia reakčného prostredia. Výpočet je presný a efektívny a tiež znižuje náklady na optimalizáciu podmienok prípravy MIP. Výhodou je aj to, že v tomto prístupe sa neprodukuje odpad a nepoužiteľný MIP (cit.[18]). Pri teoretických výpočtoch a simulácii rôznych návrhov MIP sa používa molekulová mechanika. Je to najjednoduchšia z techník, avšak najmenej presná, čo následne ovplyvňuje presnosť výsledkov[19]. Najpoužívanejšou metódou je molekulová dynamika, ktorá pri simulácii interakcii medzi molekulami neberie do úvahy zmeny v samotnej molekule[18]. Najpresnejšou, ale najkomplikovanejšou metódou je kvantová mechanika. Uvedené metódy sa odlišujú v zložitosti a rýchlosti výpočtov, presnosti výsledkov, a použiteľnosti pre viaczložkové zmesi. Aplikácia teoretických výpočtov pri navrhovaní MIP sa uplatňuje pri výbere vhodných funkčných monomérov, templátov, sieťovacích činidiel, porogénov, iniciátorov a ich pomerov. V simuláciách sa zloženie, ktoré poskytuje naj-

nižšiu hodnotu väzbovej energie, považuje za vhodné na syntézu MIP. Väzbovú energiu (t.j. energiu elektrónovej interakcie) medzi templátom a funkčným monomérom možno simulovať a vypočítať za predpokladu, že väzbová energia templát-monomér je dostatočne vysoká, čo naznačuje, že zodpovedajúce MIP budú mať vysokú selektivitu a adsorpčnú kapacitu. Rozpúšťadlo (porogén) ovplyvňuje energiu systému počas syntézy MIP, a preto je vhodné pri simulácií zohľadňovať jeho účinok. V mnohých príkladoch boli výsledky výpočtových metód v súlade s experimentálnymi údajmi[17–21].

2.2. Stratégie polymerizácie

V rámci samotnej polymerizácie sa dá proces podporiť mikrovlnným žiarením, ultrazvukom alebo prítomnosťou tekutín v nadkritickom stave. Alternatívne je vhodná aj *in situ* polymerizácia, pri ktorej sa využije celá polymerizačná zmes a tým sa minimalizuje tvorba odpadu. Tento spôsob zahŕňa syntézu MIP priamo vo vnútri trubice kolóny, kapiláry ako separačných prvkov napr. v HPLC alebo mikropipety pre mikroextrakčné techniky prípravy vzorky[22]. Tento spôsob polymerizácie bol použitý pri syntéze MIP-teofylín[23], MIP-kofeín[24,25], MIP-tramadol[26] a iných.

2.2.1. Polymerizácia podporená ultrazvukom a mikrovlnným žiarením

Syntéza MIP za prítomnosti ultrazvuku sa využíva hlavne na zvýšenie reakčnej rýchlosti a zhomogenizovanie reakčnej zmesi. Ultrazvukové vlnenie umožňuje v reakčnej zmesi vytváranie a kolaps malých bublín spôsobených kavitáciou. Tento efekt zvyšuje rozpustnosť templátu, monoméru a ďalších zložiek v porogénnom rozpúšťadle, difuzivitu, penetráciu a transport látok v reakčnom médiu[23]. Ultrazvukom podporenú prípravu MIP možno realizovať rôznymi typmi polymerizácií, tradičnou blokovou alebo aj na povrchu nosiča. Prvýkrát bol MIP vyrobený pomocou ultrazvukom asistovanej polymerizácie, pre templát teofylín a aplikovaný ako HPLC stacionárna fáza. Na prípravu bola použitá kyselina metakrylová (MAA), etylénglykoldimetakrylát (EGDMA) a azoizobutyronitril (AIBN) ako funkčný monomér, sieťovacie činidlo a iniciátor voľných radikálov. Polymerizácia sa uskutočnila pri teplote 65 °C počas 4 hodín s použitím ultrazvukového kúpeľa s frekvenciou 35 kHz. Takto pripravený MIP vykazoval podobné väzbové vlastnosti s minimálnymi zmenami v morfológii v porovnaní s MIP pripraveným konvenčným postupom[23]. Navyše sa skrátil čas syntézy z pôvodných približne 24 h na 0,5–4 h a znížil sa aj objem porogénneho rozpúšťadla približne o 25 % (cit.[23,24]).

Aplikácia mikrovlnného žiarenia s vlnovou dĺžkou $1–10^{-3}$ m sa uplatňuje pri syntéze MIP ako náhrada zahrievania, čím sa významne skráti čas potrebný na polymerizáciu a tiež je tento prístup energeticky výhodnejší, spotrebuje menej ako 10 % energie v porovnaní s tradičnými používanými ohrevmi (termostat, olejový kúpeľ a iné). Výhodou postupov s aplikáciou mikrovlnného žiarenia je podporenie homogénneho a rýchleho prenosu tepla cez reakčnú/polymerizačnú zmes, čo vedie k vyšším reakčným rýchlostiam a výťažkom[27]. Čas polymerizácie bol v intervale 0,5–4 h pri teplote 50–70 °C pre polyméry MIP-tetracyklín[28], MIP-tramadol[26] a MIP-kofeín[25].

Z uvedeného vyplýva, že či už mikrovlnný ohrev alebo ultrazvuk, obe majú v procese prípravy MIP priaznivý účinok, hlavne pri úspore času (v porovnaní s konvenčnou blokovou polymerizáciou je úspora aj o 90 %).

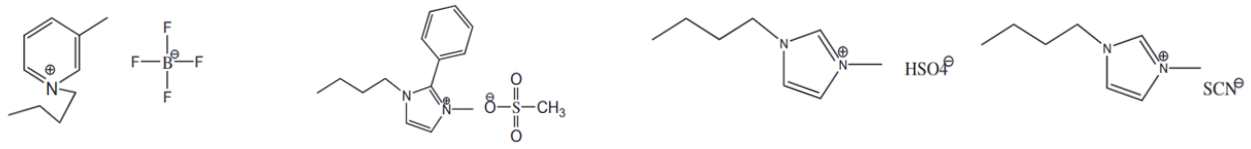
2.2.2. Polymerizácia na povrchu nosiča

Polymerizácia na povrchu nosiča používa materiály ako napr. SiO_2, kovovo-organické nosiče, uhlíkové nanorúrky alebo uhlíkové bodky, ako nosiče polymérnej MIP vrstvy. Väčšina odtlačených dutín sa nachádza v povrchovej vrstve, čo je prospešné pre proces adsorpcie a desorpcie molekúl cieľových látok[29]. Vysoká dostupnosť k povrchovým väzbovým miestam umožňuje rýchle rozpoznanie väzbového miesta analytom, jeho špecifické interakcie s funkčnými skupinami v dutinách a tiež aj ľahšie a takmer úplné odstránenie templátu z dutín polyméru v porovnaní s celopórovitými MIP. Výhodou, ktorá túto techniku radí medzi ekologickejšie prístupy, je fakt, že na vymytie templátu z povrchových dutín je potreba niekoľko násobne menšieho objemu rozpúšťadiel[29]. Hrúbka MIP vrstvy na povrchu nosiča je menšia ako 100 nm (hrúbku je možné regulovať v procese polymerizácie tzv. vrstvením polyméru opakovaním polymerizačného procesu), čo znamená menšiu spotrebu chemikálii v procese polymerizácie a to má za následok aj menšie množstvá odpadu pri výrobe a pri samotnom použití MIP (cit.[30]). Pri syntéze vrstvy MIP sa používajú bežné zložky polymerizačnej zmesi, EGDMA ako sieťovacie činidlo, MAA, akrylamid (AAm) alebo APTES (3-aminopropyltrietoxysilán) ako funkčný monomér spolu s vhodne zvoleným iniciátorom (zväčša AIBN) a porogénnym rozpúšťadlom (najčastejšie metanol, etanol, acetonitril alebo chloroform)[31].

2.3. Zložky polymerizačnej zmesi

Ekologickejšie postupy prípravy MIP sú zamerané aj na zníženie množstva, v ideálnom prípade aj úplnú elimináciu nebezpečných látok. Nahradenie organických porogénnych rozpúšťadiel vodou nebolo vhodným riešením, pretože spôsobovala tvorbu vodíkových väzieb s templátom alebo monomérom. Tieto silné interakcie oslabovali tvorbu a stabilitu predpolymerizačného komplexu templát-monomér, ktorý je vo veľkej miere založený na vodíkových interakciách zložiek, prípadne van der Waalsových silách a v niektorých prípadoch aj elektrostatických interakciách[32].

V súčasnosti sa uplatňujú pri príprave MIP iónové kvapaliny (IL – Ionic Liquids), ktoré majú viacero výhod, napr. vysoká tepelná a chemická stabilita, nízka viskozita, vysoká rozpúšťacia schopnosť pre mnohé látky. Zmenou typu a pomeru zložiek možno modifikovať alebo docieliť požadované fyzikálne a chemické vlastnosti IL. Navyše zanedbateľný tlak pár a nízka horľavosť sú ďalšie vlast-



[C4mpy][BF_4] [C4mPheim][CH_3SO_4] [C4mim][HSO_4] [C4mim][SCN]

Obr. 2. **Chemické štruktúry niektorých toxických iónových kvapalín**

nosti, ktoré klasifikujú niektoré IL k zeleným rozpúšťadlám. Nevýhodou používania niektorých typov IL je, že sú toxické, ako napr. 1-butyl-4-metylpyridínium tetrafluórborát [C4mpy][BF_4], 1-butyl-3-metyl-2-fenylimidazolium metylsulfát [C4mPheim][CH_3SO_4], 1-butyl-3-metylimidazolium hydrogénsulfát [C4mim][HSO_4] alebo [C4mim][SCN] 1-butyl-3-metylimidazolium tiokynát[33,34] (obr. 2) a v priemyselnom meradle nie je zanedbateľná ani ich vyššia cena.

V tabuľke I je zhrnutý prehľad využitia IL pri príprave MIP. IL sa uplatnili ako monoméry, napr. 1-vinyl-3-karboxybutylimidazoliumbromid pri príprave MIP-synefrín pre extrakciu z rastlinného materiálu[35] alebo 1-vinyl-3-etylimidazol pri syntéze MIP-4-chlorofenol pre extrakciu zo vzoriek životného prostredia[36]. Sieťovacie činidlá na základe IL boli použité pri syntéze MIP-6-benzylaminopurín (IL: 1,4-butándiyl-3,3'-bis-1-vinylimidazoliumdibromid)[37] a MIP-4-chlorfenol (IL: 1,4-bután-3,3'-bis-1-etylimidazol)[36]. IL 1-butyl-3-metylimidazoliumhexafluórfosfát sa uplatnil ako porogénne rozpúšťadlo pre prípravu MIP-dibutylftalát[38].

(Prírodné) hlboko eutektické rozpúšťadlá ((NA)DES – (Natural) Deep Eutectic Solvents) môžu v syntéze MIP nahrádzať rôzne zložky polymerizačnej zmesi (tab. II). Zmes cholín chloridu a etylénglykolu (1:2, mol/mol) sa použila ako rozpúšťadlo pri príprave MIP pre antibiotikové liečivá[39]. DES na základe cholín chloridu boli funkčnými monomérmi pri príprave rôznych MIP, napr. zmes cholín chloridu a kyseliny akrylovej (1:2, mol/mol)[40], zmes kyseliny kávovej, cholín chloridu a etylénglykolu (1:5:5 mol/mol/mol)[41], zmes kyseliny kávovej, cholín chloridu a kyseliny mravčej (1:3:1,5 mol/mol/mol)[42]

Tabuľka I
Prehľad využitia iónových kvapalín pri príprave MIP

Templát	IL	Funkcia IL	Typ polymerizácie, Podmienky [a]	Extrakčná technika [b], Typ vzorky	Lit.
Synefrín	1-viny-3-karboxybutyl-imidazoliumbromid	monomér	precipitačná polymerizácia, iniciátor: AIBN sieťovacie činidlo: EGDMA 60 °C, 24 h	extrakčná technika: SPE typ vzorky: rastlinná	35
4-Chlórofenol	1-vinyl-3-etylimidazol	monomér	polymerizácia na povrchu nosiča (Fe_3O_4) iniciátor: AIBN 60 °C, 24 h	extrakčná technika: MSPE typ vzorky: environmentálna	36
	1,4-bután-3,3´-bis-1-etylimidazol	sieťovacie činidlo			
6-Benzyl-aminopurín	1-vinyl-3-butylimidazolium-tetrafluórborát	monomér	polymerizácia na povrchu nosiča (grafén) iniciátor: AIBN 60 °C, 24 h	extrakčná technika: SPME typ vzorky: potravinárska, environmentálna	37
	4-butándiyl-3,3'-bis-1 vinyl-imidazolium dibromid	sieťovacie činidlo			
Dibutylftalát	1-butyl-3-metylimidazolium-hexafluórfosfát	porogén	bloková polymerizácia, iniciátor: AIBN sieťovacie činidlo: EGDMA 50 °C, 24 h	extrakčná technika: SPE typ vzorky: potravinárska	38

[a] AIBN: azoizobutyronitril, EGDMA: etylénglykoldimetakrylát, IL: iónová kvapalina, [b] MSPE: magnetická extrakcia tuhou fázou, SPE: extrakcia tuhou fázou, SPME: mikroextrakcia tuhou fázou

Tabuľka II
Aplikácie DES pri príprave MIP adsorbentov

DES [a], [mol/mol]	Spôsob polymerizácie MIP, zloženie polymerizačnej zmesi [a]	Extrakčná technika s MIP [a]	Typ vzorky	Extrahované zlúčeniny	Lit.
ChCl:Gl, 1:2	*bloková polymerizácia* templát: chlórmycetín + tiamfenikol monomér: AAm + DES (modifikátor) sieťovacie činidlo: EGDMA iniciátor: AIBN	SPE	potravinová	chlórmycetín, tiamfenikol	17
ChCl:U, 1:2	*polymerizácia na povrchu magnetického nosiča* templát: teobromín, teofylín nosič: Fe_3O_4 monomér: MAA + DES (modifikátor) sieťovacie činidlo: EGDMA iniciátor: AIBN	DM-SPME	potravinová, rastlinná	teobromín teofylín	21
ChCl:EG, 1:2	*precipitačná polymerizácia* templát: gatifloxacín monoméry: 3-aminopropyltrietoxysilán, MAA, TEOS sieťovacie činidlo: EGDMA iniciátor: AIBN porogén: DES	MEPS	biologická	levofloxacín	39
ChCl:AA, 1:2	*polymerizácia na povrchu magnetického nosiča* templát: β-laktoglobulín nosič: Fe_3O_4 . MoS_2 monomér: DES sieťovacie činidlo: EGDMA iniciátor: benzylperoxid, *N*,*N*-dimetylanilín porogén: etanol:voda (9:1, v/v)	MSPE	potravinová	β-laktoglobulín, albumín, konalbumín	40
CfA:ChCl:EG, 1:5:5	*bloková polymerizácia* templát: kvercetín nosič: hexagonálny nitrid bóru monomér: DES sieťovacie činidlo: EGDMA iniciátor: AIBN	SPE	potravinová, rastlinná	kvercetín, izohamnetín, kempferol	41
CA:ChCl:FA, 1:3:1,5	*bloková polymerizácia* templát: levofloxacín monomér: DES sieťovacie činidlo: EGDMA iniciátor: AIBN porogén: etanol:voda (9:1, v/v)	SPE	rastlinná	levofloxacín	42
ChCl:Gl, 1:2	*bloková polymerizácia* templát: kyselina chlorogenová monomér: AAm + DES (modifikátor) sieťovacie činidlo: EGDMA iniciátor: AIBN porogén: metanol:voda (9:1, v/v)	SPE	rastlinná	kyselina chlorogenová	73

[a] AA: kyselina akrylová, AAm: akrylamid, AcA: kyselina octová, CA: kyselina kávová, ChCl: cholínchlorid, DES: hlboko eutektické rozpúšťadlo, DM-SPME: disperzná magnetická mikroextrakcia tuhou fázou, EG: etylénglykol, FA: kyselina mravčia, Gl: gkycerol, MAA: kyselina metakrylová, MEPS: mikroextrakcia tuhou fázou v striekačke, MSPE: magnetická extrakcia tuhou fázou, *ns*: neuvádza sa, U: močovina

a uplatnili sa aj ako modifikátory tradičných monomérov, akrylamidu alebo kyseliny metakrylovej (zmes cholín chloridu a glycerolu, 1:2 mol/mol)[17] alebo zmes cholín chloridu a močoviny (1:2, mol/mol)[21]). Výhodou DES-MIP je aj mechanická pevnosť, čím sa môže zabrániť zmršteniu alebo napučiavaniu polyméru[43]. Navyše, kvapalný charakter DES je vhodný v prípade potreby nahradenia média alebo rozpúšťadla zložiek polymerizačnej zmesi. DES a IL majú niekoľko spoločných vlastností, nízka prchavosť, vysoká tepelná stabilita či vodivosť, dobrá rozpustnosť pre mnohé látky. Rozdiel je v tom, že v IL sú zložky viazané prostredníctvom iónových väzieb, kým DES zložky sú schopné vzájomnej interakcie prostredníctvom vodíkových väzieb[44]. Väčšina DES v porovnaní s IL je biologicky odbúrateľná a netoxická, lepšie navrhovateľná a má nižšiu cenu.

Tekutiny v nadkritickom stave (nadkritický oxid uhličitý, $scCO_2$) sa používajú ako „zelená alternatíva" k typickým organickým rozpúšťadlám používaným pri polymerizačných reakciách, akými sú metanol[45], toluén či dichlórmetán[46].

V posledných rokoch sa do popredia dostáva biomasa (biologicky rozložiteľná zložka výrobku alebo zvyšku rastlinných materiálov) získavaná z poľnohospodárskych zvyškov, odpadu z ľudskej činnosti, rybného hospodárstva, drevárskeho priemyslu, odpadu z hospodárskych zvierat a iných zdrojov. Je to prírodný zdroj uhlíka, ktorý obsahuje hlavne celulózu, hemicelulózu, lignín, chitín, chitozán, popol a proteíny. Celulóza je využiteľná pri príprave MIP ako ekonomicky výhodný, ekologický, obnoviteľný a biokompatibilný nosič polymérnej MIP vrstvy. Vďaka reaktivite hydroxylových skupín ľahko reaguje s rôznymi funkčnými skupinami (napr. metakrylátmi[47], silánmi[48]), aby sa dosiahla vhodná modifikácia pre následné viazanie MIP. Modifikáciu celulózy možno dosiahnuť aj metódami iniciovanými enzýmami[49]. Výhodou celulózových nosičov je pórovitá štruktúra, ktorá vytvára väčšiu špecifickú plochu povrchu v porovnaní s tradičnými materiálmi na báze oxidu kremičitého. Karboxymetylcelulóza (derivát celulózy s karboxymetylovými skupinami viazanými na hydroxylové skupiny glukopyranózových monomérov) bola použitá ako nosič pre polymerizáciu MIP vrstvy pri príprave materiálov pre medicínske účely ako napr. pomalé uvoľňovanie liečiva furosemid[50], environmentálnu analýzu[51] alebo ako elektrochemický senzor pre detekciu pyrazínamidu[52]. Tab. III sumarizuje prehľad vybraných príkladov použitia zlúčenín získaných z biomasy v procese prípravy MIP pre templáty zo skupín liečiv (nesteroidné protizápalové lieky[53], chemoterapeutiká[52], sulfónamidové diuretiká[50]) alebo iných organických polutantov[51], ktoré sa následne použili pri extrakcii analytov z reálnych biologických, potravinových a environmentálnych vzoriek.

Tabuľka III
Prehľad vybraných príkladov využitia rôznych zdrojov biomasy pri príprave MIP

Zložka biomasy	MIP štruktúra [a]	Spôsob prípravy MIP	Templát	Použitie Typ vzorky	Lit.
Celulóza	CMC/AAm/2-hydroxy--etylmetakrylát	bloková polymerizácia	furosemid	použitie: uvoľňovanie liečiva typ vzorky: farmaceutická	50
Cyklo-dextríny	MMIP MAA-β-CD	bloková polymerizácia	bisfenol A	použitie: sorpčný materiál pre extrakciu typ vzorky: environmentálna	51
Citrónová šťava	grafén	polymerizácia na povrchu nosiča	pyrazínamid	použitie: elektro-chemický senzor typ vzorky: farmaceutická, biologická	52
Extrakt eukalyptu	MMIP- nanočastice železa s použitím eukalyptového extraktu	polymerizácia na povrchu nosiča	nesteroidné protizápalové liečivá	použitie: magnetický sorpčný materiál typ vzorky: farmaceutická	53
Chitozán	MIP na povrchu magnetických častíc na báze chitozánu	polymerizácia na povrchu nosiča	akrylamid	použitie: sorpčný materiál pre extrakciu typ vzorky: potravinárska	74
Mangové šupky	kvantové bodky zapuzdrené do MIP	sol-gel polymerizácia	mezotrion	použitie: fluorescenčný biosenzor typ vzorky: potravinárska	75
Listy rozmarínu	β-CD zabudovaný do MIP	polymerizácia na povrchu nosiča	tiabendazol	použitie: optický senzor typ vzorky: potravinárska	76

[a] β-CD: β-cyklodextrín, CMC: sodná soľ karboxymetylcelulózy, MMIP: magnetický polymér s odtlačkom molekuly

2.4. Odstránenie templátu z polymérnych adsorbentov s odtlačkom molekuly

Bez ohľadu na použitý spôsob prípravy MIP, vo finálnej fáze je potrebné odstrániť z polyméru molekuly templátu. Tento krok je nákladovo najmenej efektívny pri vývoji MIP. Polymérna štruktúra MIP a afinita dutín k templátu sťažujú jeho odstránenie, pričom neúplné odstránenie môže znižovať účinnosť opätovného viazania analytu a prípadne aj uvoľňovanie zvyškového templátu počas analýzy reálnej vzorky. Odstránenie templátu rozpúšťadlom alebo zmesou rozpúšťadiel často zahŕňa použitie príliš drastických podmienok v konvenčných extrakčných technikách (napr. vysoká teplota), čo môže viesť k poškodeniu, deformácii alebo kolapsu odtlačených dutín a následne sa stanú menej účinnými pri opätovnom viazaní analytu. Využíva sa premytie polymérov organickým rozpúšťadlom pri laboratórnej teplote (opakované premytie niekoľkokrát dostatočným objemom rozpúšťadla; väčšinou používaný spôsob), prípadne aj pôsobením ultrazvuku či mikrovlnného žiarenia alebo kontinuálne premytie polymérov rozpúšťadlom pri zvýšenej teplote (napr. extrakcia v Soxhletovom extraktore). Uvedené spôsoby nie sú v súlade s požiadavkami zelenej chémie, keďže používajú veľké objemy organických rozpúšťadiel[54,55]. Testovali sa aj ďalšie techniky odstránenia templátu ako napr. extrakcia stlačenou horúcou vodou, ktorá je šetrná k životnému prostrediu, avšak náklady spojené s požadovaným prístrojovým vybavením zabránili jej širokému použitiu[53]. Extrakcia nadkritickou vodou (SWE – Supercritical Water Extraction) sa použila na odstránenie templátov chlorofyl, kvercetín a ftalocynín z MIP. Extrakcia trvala 70 min (5 MPa, 220 °C pre chlorofyl a ftalocynín a 235 °C pre kvercitín) a získané MIP boli schopné znovu naviazať 99,6–100 % templátu, čo naznačuje, že sa dutiny počas odstraňovania templátu nezmenili a účinnosť vymytia templátu bola vysoká. Porovnanie odstránenia templátu pomocou SWE, Soxhletovej a ultrazvukovej extrakcie ukázalo, že tradičné metódy používali výrazne väčší objem extrakčného rozpúšťadla a čas extrakcie bol až 16 hodín pri teplote 70 °C. SWE bola výhodnou z hľadiska času a účinnosti, čo sa prejavilo oveľa nižšími koncentráciami templátu z „krvácania“ (0,02 %, alebo v niektorých prípadoch nedetekovateľné) v porovnaní s inými testovanými spôsobmi odstránenia templátu (pri Soxhletových a ultrazvukových metódach odstraňovania boli koncentrácie templátu z „krvácania“ vyššie ako 0,1 %)[56].

Na odstránenie templátu z MIP je možné použiť extrakciu tekutinou v nadkritickom stave (SFE – Supercritical Fluid Extraction), najčastejšie $scCO_2$. SFE sa testovala pre odstránenie klenbuterolu a 2,4,6-trinitrotoluénu z MIP. Aj napriek dlhému času extrakcie (do 18 h), sa nedosiahla úplná extrakcia templátu. Kombináciou Soxhletovej extrakcie a SFE s $scCO_2$ za miernych podmienok (15 MPa, 50 °C) sa dosiahla vyššia účinnosť odstránenia templátu (> 99,7 % templátu v prípade MIP-2,4,6-trinitrotoluén). Okrem toho si častice adsorbentu po spracovaní zachovali svoj tvar a pórovitosť[55].

3. Využitie polymérnych adsorbentov s odtlačkom molekuly v miniaturizovaných extrakčných technikách

Princípy zelenej chémie sú v analytických metódach implementované aj aplikáciou sorpčných materiálov s opakovaným využitím, a tiež miniaturizovaných metód, predovšetkým metód prípravy vzoriek. Miniaturizované extrakčné techniky využívajú malé množstvo adsorbentov pri extrakcii, aplikujú sa optimalizované postupy, redukujú sa objemy organických rozpúšťadiel na kondicionovanie, premývanie aj elúciu, redukuje sa objem vyprodukovaného odpadu. Inovatívne prístupy využívajú aj alternatívne rozpúšťadlá na elúciu látok alebo prípravu adsorbentov (tab. II a III). Techniky založené na rozdeľovacej rovnováhe látok medzi vzorkou a adsorbentom využívajú okrem časticových foriem MIP adsorbentu aj iné formáty, ako sú napr. vlákna, tyčinky, membrány a iné.

Miniaturizovaná SPE-MIP v pipetovacej špičke („pipette tip“ MIP-SPE) využíva niekoľko miligramov adsorbentu (zvyčajne menej ako 10 mg; SPE v kolónke 100 mg), ktorý je umiestnený v hrote pipetovacej špičky. Pre takéto aplikácie, už aj pre samotnú syntézu menšieho množstva MIP, sa redukuje množstvo polymerizačných činidiel a syntéza sa môže uskutočňovať aj *in situ*[57]. V porovnaní s konvenčnou SPE v kolónke, pri „pipette tip“ MIP-SPE sa znižuje spotreba organických rozpúšťadiel pre jednotlivé kroky postupu z pôvodných približne 5 ml na 1–1,5 ml a tiež aj objem vzorky (1–2 ml pri klasickej SPE v kolónke; ≤ 0,5 ml pri SPE v pipetovacej špičke; v prípade skoncentrovania analytu sú použité aj vyššie objemy vzoriek)[58]. Miniaturizovaná „pipette tip“ MIP-SPE bola využitá v analýze potravinárskych vzoriek[59–61] a biologických vzoriek[62] (tab. IV).

Z hľadiska ľahkej manipulácie a rýchlosti postupu je praktické použitie extrakcie s adsorbentom vo forme tablety (napr. z polyetylénu) s vrstvou MIP na povrchu. Tento prístup sa použil na extrakciu a skoncentrovanie metadónu a amfetamínu zo vzoriek ľudskej plazmy a moču. Sorpčné vlastnosti MIP vo forme tablety sa významne nezmenili (RSD 5–7 %) ani po dvadsaťnásobnom použití (za predpokladu, že templát/analyt bol po procese syntézy a extrakcie dokonale odstránený premývaním vhodným rozpúšťadlom, ktorého druh a objem je potrebné optimalizovať)[63–65].

Do skupiny mikroextrakčných techník možno zaradiť mikroextrakciu s MIP tuhou fázou v striekačke (MIP-MEPS; MEPS – Microextraction by Packed Sorbent), mikroextrakciu MIP tuhou fázou (MIP-SPME; SPME – Solid Phase Microextraction), sorpčnú extrakciu na miešadle s MIP vrstvou (MIP-SBSE; SBSE – Stir-Bar Sorptive Extraction), mikroextrakciu tenkým MIP filmom (MIP-TFME; TFME – Thin Film Microextraction) (tab. IV).

Tabuľka IV
Aplikácie miniaturizovaných techník s MIP adsorbentom pri analýze zložitých vzoriek

Cieľová zlúčenina	Vzorka	Technika úpravy vzorky [a]	Výťažnosť [%]	Separačná technika [b]	LOQ [μg l^{-1}]	Lit.
Kyselina galová	pomarančový džús	SPE s MIP-kyselina galová v pipetovacej špičke množstvo adsorbentu: *ns* [c], objem vzorky: 6 ml, objem elučného činidla: 250 μl	92,0–100,5	HPLC-UV	20	59
Difenokonazol	grepový džús	SPE s MIP- difenokonazol v pipetovacej špičke množstvo adsorbentu: *ns* [c], objem vzorky: 5 ml, objem elučného činidla: 60 μl metanolu	87,6–97,9	HPLC-DAD	1,7	60
Kumarín	víno	SPE s MIP-7-hydroxykumarín v pipetovacej špičke množstvo adsorbentu: 20 mg, objem vzorky: 0,5 ml, objem elučného činidla: 0,5 ml zmesi, metanol:kyselina octová (9:1, v/v)	82,5	HPLC-UV	0,5	61
Prednizolón	moč	SPE s MIP-betametazón v pipetovacej špičke množstvo adsorbentu: 10 mg, objem vzorky: 4,5 ml, objem elučného činidla: 110 μl metanolu	89,0–96,1	HPLC-UV	0,2	62
Metadon	ľudská plazma	SPE s MIP-metadon vo forme tablety veľkosť tablety: 6 × 1,2 mm, objem vzorky: 0,2 ml, objem elučného činidla: 210 μl metanolu	*ns* [c]	LC-MS	5	63
Amfetamín	moč	SPE s MIP-amfetamín vo forme tablety veľkosť tablety: 6 × 1,2 mm, objem vzorky: 0,2 ml, objem elučného činidla: 200 μl metanolu	80	LC-MS/MS	5	64
Diklofenak	environmentálne vody (pitná voda, minerálna voda), biologické tekutiny (ľudský moč, plazma)	SPME s MIP-diklofenak na dutom vlákne objem vzorky: 25 ml, objem elučného činidla: 210 μl metanolu	95,1–104,2	UV-VIS	2,3	68
Sarkozín	plazma, moč	MEPS s MIP-glycín množstvo adsorbentu: 2 mg, objem vzorky: 0,2 ml, objem elučného činidla: 0,1 ml zmesi acetonitril:voda (80:20, v/v)	87–89	LC-UV	3	69
Diazepam	prírodná voda	SBSE s MIP-diazepam objem vzorky: 200 ml, objem elučného činidla: 5 ml 5% kyseliny octovej v metanole (v/v)	>84	UHPLC-MS/MS	0,0012	77

[a] SBSE: sorpčná extrakcia na miešadle, SPME: mikroextrakcia tuhou fázou, [b] HPLC-UV: vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s UV detekciou, LC-MS: kvapalinová chromatografia s hmotnostne spektrometrickou detekciou, MS/MS: tandemová hmotnostná spektrometria, UHPLC: ultravysokoúčinná kvapalinová chromatografia, [c] *ns* – neuvádza sa

MIP-MEPS bol aplikovaný pri stanovení prednizolónu[62] a sarkozínu[69] vo vzorkách moču; metadonu[63] a sarkozínu[69] v plazme a sulfónamidov[66] v riečnej vode. MIP-SPME bola použitá v analýze biologických a environmentálnych vzoriek napr. na extrakciu luteolínu a metabolitov[67] či diklofenaku[68]. V porovnaní s komerčnými SPME vláknami sa vlákna na báze MIP pripravujú jednoducho a s nízkymi nákladmi. Doteraz boli pripravené MIP nielen ako povlaky vlákien (napr. z nehrdzavejúcej ocele[67]), ale aj MIP pre in-tube SPME, monolitické MIP vlákna pre SPME, membránové MIP pre SPME (cit.[70–72]).

4. Záver

Technológia odtláčania molekúl je vhodná pre vývoj vysoko selektívnych materiálov pre izoláciu a separáciu látok a pre cielené použitie. Cieľom práce bolo zostaviť prehľad súčasných trendov zameraných na implementovanie ekologicky prijateľných riešení do postupov prípravy MIP a ich použitia hlavne pre účely chemických analýz. Teoretické prístupy, ktoré využívajú kvantové výpočty a modelovanie pre výber optimálnych zložiek polymerizačnej zmesi, aplikovanie ultrazvukového a mikrovlnného žiarenia pri syntéze MIP, ako aj mikroextrakčné postupy pre prípravu zložitých vzoriek na analýzu sa úspešne aplikujú v analytických metódach na báze MIP. Aj keď použitie rozpúšťadiel zo skupiny tekutín s nízkou teplotou prechodu (DES, IL) a zložiek biomasy ako náhrady prípadne modifikácie porogénov, funkčných a sieťovacích monomérov alebo iných zložiek polymerizačnej zmesi napomohlo transformovať polymerizačné postupy na ekologickejšie, vyžaduje si to ešte dôkladné prešetrenie mechanizmov syntézy a ich vplyvu na vlastnosti pripravených MIP.

Táto publikácia vznikla vďaka finančnej podpore grantu č. 1/0412/20 z Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaŠ SR a SAV a vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: „Podpora výskumných činností excelentných laboratórií STU v Bratislave“, Kód ITMS2014+: 313021BXZ1, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Autorka A. Špačková ďakuje finančnej podpore v rámci projektu Mladých výskumníkov na FCHPT STU v Bratislave (Príprava, hodnotenie niektorých vlastností a aplikovanie polymérnych sorbentov v analýze kozmetických výrobkov).

LITERATÚRA

1. Polyakov M. V.: Zh. Fiz. Khim. *2*, 799 (1931).
2. Wulff G., Vesper W., Grobe-Einsler R., Sarhan A.: Makromol. Chem. *178*, 2799 (1977).
3. Mosbach K.: Trends Biochem. Sci. *19*, 9 (1994).
4. Whitcombe M. J., Rodriguez M. E., Villar P., Vulfson E. N.: J. Am. Chem. Soc. *117*, 7105 (1995).
5. https://www.affinisep.com/products/ready-to-use-kits-spe-and-mips/, stiahnuté 30.1.2023.
6. https://www.sigmaaldrich.com/SK/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/solid-phase-extraction/supelmip, stiahnuté 30.1.2023.
7. https://www.allergyamulet.com/blog/2018/6/19/a-brief-history-of-molecularly-imprinted-polymers-the-heart-of-allergy-amulets-technology, stiahnuté 24.1.2023.
8. Baker Z. K., Sardari S.: Iran. Biomed. J. *25*, 68 (2021).
9. Sun, J., Guo W., Ji J., Li Z., Yuan X., Pi F., Zhang Y., Sun X.: LWT- Food Sci. Technol. *118*, 108854 (2020).
10. He S., Zhang L., Bai S., Yang H., Cui Z., Zhang X., Li Y.: Eur. Polym. J. *143*, 110179 (2021).
11. Banan K., Hatamabadi D., Afsharara H., Mostafiz B., Sadeghi H., Rashidi S., Beirami A. B., Shahbazi M. A., Keçili R., Hussain C. M., Ghorbani-Bidkorbeh F.: Trends Food Sci. Technol. *119*, 164 (2022).
12. Machyňáková A., Hroboňová K.: Chem. Listy *110*, 609 (2016).
13. Sádecká J., Polonský J.: Chem. Listy *99*, 222 (2005).
14. Suzaei F. M., Daryanavard S. M., Abdel-Rehim A., Bassyouni F., Abdel-Rehim M.: Chem. Pap. *77*, 619 (2023).
15. Madikizela L. M., Ncube S., Chimuka L.: Compr. Anal. Chem. *86*, 337 (2016).
16. Murdaya N., Triadenda A. L., Rahayu D., Hasanah A. N.: Polymers *14*, 4441 (2022).
17. Li G., Zhu T., Row K. H.: J. Sep. Sci. *40*, 625 (2016).
18. Liu Z., Xu Z., Wang D., Yang Y., Duan Y., Ma L., Lin T., Liu H.: Polymers *13*, 2657 (2021).
19. Lipkowitz K. B., Peterson M. A: Chem. Rev. *93*, 2463 (1993).
20. Sullivan M. V., Dennison S. R., Archontis G., Reddy S. M., Hayes J. M.: J. Phys. Chem. B *123*, 5432 (2019).
21. Li G., Wang X., Row K. H.: Molecules *22*, 1061 (2017).
22. Martín-Esteban A.: J. Sep. Sci. *45*, 233 (2022).
23. Svenson J.: Anal. Lett. *39*, 2749 (2006).
24. Phutthawong N., Pattarawarapan M.: Polym. Bull. *70*, 691 (2013).
25. Turner N. W., Holdsworth C. I., Donne S. W., McCluskey A., Bowyer M. C.: New J. Chem. *34*, 686 (2010).
26. Seifi M., Moghadam M. H., Hadizadeh F., Ali-Asgari S., Aboli J., Mohajeri S. A.: Int. J. Pharm. *471*, 37 (2014).
27. Sajini T., Mathew B.: Mater. Today: Proc. *63*, 1 (2022).
28. Hou J., Li H., Wang L., Zhang P., Zhou T., Ding H., Ding L.: Talanta *146*, 34 (2016).
29. Arabi M., Ostovan A., Li J., Wang X., Zhang Z., Choo J., Chen L.: Adv. Mater. *33*, 2100543 (2021).
30. Zhao M., Huang S., Xie H., Wang J., Zhao X, Li M., Zhao M.: Anal. Chem. *92*, 10540 (2020).

31. Figueiredo L., Erny G. L., Santos L., Alves A.: Talanta *146*, 754 (2016).
32. Viveiros R., Rebocho S., Casimiro T.: Polymers *10*, 306 (2018).
33. Gonçalves A. R. P., Paredes X., Cristino A. F., Santos F. J. V., Queirós C. S. G. P: Int. J. Mol. Sci. *22*, 5612 (2021).
34. Hernández-Fernández F. J., Bayo J., Peréz de los Ríos A., Vicente M. A., Bernal F. J., Quesada-Medina J.: Ecotoxicol. Environ. Saf. *116*, 29 (2015).
35. Fan J. P., Tian Z. Y., Tong S., Zhang X. H., Xie Y. L., Xu R., Qin Y., Li L., Zhu J. H., Ouyang X. K.: Food Chem. *141*, 3578 (2013).
36. Ma W., Row K. H.: J. Chromatogr. A *1559*, 78 (2018).
37. Zhu X., Zeng Y., Zhang Z., Yang Y., Zhai Y., Wang H., Liu L., Hu J., Li L.: Biosens. Bioelectron. *108*, 38 (2018).
38. Zhang X., Yang W., Wang N., Ni X., Wang H., Gu Z., Wu X., Xu W.: Adv. Polym. Technol. *36*, 220 (2015).
39. Meng J., Wang X.: J. Chem. *2019*, 4783432 (2019).
40. Fu N., Li L., Liu K., Kim C.K., Li J., Zhu T., Li J., Tang B.: Talanta *197*, 567 (2019).
41. Li X., Row K. H.: Microchim. Acta *186*, 753 (2019).
42. Li X., Row K. H.: J. Chromatogr. B *1068–1069*, 56 (2017).
43. Fu N., Li L., Liu X., Fu N., Zhang C., Hu L., Li D., Tang B., Zhu T.: J. Chromatogr. A *1530*, 23 (2017).
44. Jablonský M., Škulcová A., Šima J.: Molecules *24*, 3978 (2019).
45. Abdullah, Alveroglu E., Balouch A., Khan S., Mahar A. M., Jagirani M. S., Pato A. H.: Microchem. J. *162*, 105849 (2021).
46. Gladis J. M., Rao T. P.: Microchim. Acta *146*, 251 (2004).
47. del Sole R., Mele G., Bloise E., Mergola L.: Polymers *13*, 2430 (2021).
48. Shao G., Cao J., Wu X., Qin B., Wang Z., Wang Y., Zhang Y., Wang T., Fu Y.: Ind. Crops Prod. *188*, 115644 (2022).
49. Bao X., Dong F., Yu Y., Wang Q., Wang P., Fan X., Yuan J.: Int. J. Biol. Macromol. *164*, 1237 (2020).
50. Fareghi A. R., Moghadam P. N., Khalafy J.: Starke *69*, 1700002 (2017).
51. Mamman S., Suah F. B. M., Raaov M., Mehamod F. S., Asman S., Zain N .N. M: R. Soc. Open Sci. *8*, 201604 (2021).
52. Patra S., Roy E., Madhuri R., Sharma P. K.: Anal. Chim. Acta *918*, 77 (2016).
53. López A. S., Ramos M. P., Herrero R., López Vilariño J. M.: J. Environ. Chem. Eng. *8*, 103889 (2020).
54. Lorenzo R. A., Carro A. M., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A.: Int. J. Mol. Sci. *12*, 4327 (2011).
55. Ellwanger A., Berggren C., Bayoudh S., Crecenzi C., Karlsson L., Owens P. K., Ensing K., Cormack P., Sherrington D., Sellergren B.: Analyst *126*, 784 (2001).
56. Batlokwa B. S., Mokgadi J., Nyokong T., Torto N.: Chromatographia *73*, 589 (2011).
57. Madikizela L. M., Tavengwa N.T ., Tutu H., Chimuka L.: Trends Environ. Anal. Chem. *17*, 14 (2018).
58. Špačková A., Hroboňová K.: *21. Celoslovenská študentská vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou, chémia a technológie pre život, 06. November 2019, Bratislava*, str. 43.
59. Arabi M., Ghaedi M., Ostovan A.: J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. *1048*, 102 (2017).
60. Du T., Cheng J., Wu M., Wang X., Zhou H., Cheng M.: J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. *951*, 104 (2014).
61. Hroboňová K., Brokešová E.: Food Chem. *332*, 127404 (2020).
62. Arabi M., Ghaedi M., Ostovan A., Wang S.: J. Colloid Interface Sci. *480*, 232 (2016).
63. El-Beqqali A., Abdel-Rehim M.: Anal. Chim. Acta. *936*, 116 (2016).
64. El-Beqqali A., Andersson L. I., Jeppsson A. D., Abdel -Rehim M.: J. Chromatogr. B *1063*, 1305 (2017).
65. Abdel-Rehim M., Pedersen-Bjergaard S., Abdel-Rehim A., Lucena R., Moein M. M., Cárdenas S., Miró M.: J. Chromatogr. A *1616*, 460790 (2020).
66. Díaz-Álvarez M., Barahona F., Turiel E., Martín-Esteban A.: J. Chromatogr. A *1357*, 158 (2014).
67. Gao D., Wang D. D., Zhang Q., Yang F. Q., Xia Z. N., Zhang Q. H., Yuan C. S.: J. Agric. Food Chem. *65*, 1158 (2017).
68. Pebdani A. A., Shabani A. M. H., Dadfarnia S., Khodadoust S.: Spectrochim. Acta, Part A *147*, 26 (2015).
69. Moein M. M., Abdel-Rehim A., Abdel-Rehim M.: J. Sep. Sci. *38*, 788 (2014).
70. Sarafraz-Yazdi A., Razavi N.: TrAC, Trends Anal. Chem. *73*, 81 (2015).
71. Shao H. K., Zhao L. G., Chen J., Zhou H. T., Huang S. T., Li K.: J. Pharm. Biomed. Anal. *111*, 241 (2015).
72. Hu X. G., Cai Q. L., Fan Y. A., Ye T. T., Cao Y. J., Guo C. J.: J. Chromatogr. A *1219*, 39 (2012).
73. Li G., Wang W., Wang Q., Zhu T.: J. Chromatogr. Sci. *54*, 271 (2015).
74. Bagheri A. R., Arabi M., Ghaedi M., Ostovan A., Wang X., Li J., Chen L.: Talanta *195*, 390 (2019).
75. Sun X., Liu Y., Niu N., Chen L.: Anal. Bioanal. Chem. *411*, 5519 (2019).
76. Kazemifard N., Ensafi A. A., Rezaei B.: Food Chem. *310*, 125812 (2020).
77. Sorribes-Soriano A., Esteve-Turrillas F. A., Armenta S., Herrero-Martínez J. M.: Microchem. J. *186*, 108354 (2023).

A. Špačková and K. Hroboňová *(Institute of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia):* **Preparation and Application of Polymeric Molecularly Imprinted Adsorbents in Accordance with the Principles of Green Chemistry**

Molecularly imprinting technology is a suitable tool for the development of selective materials for the isolation and separation of substances, and targeted use. The aim of this paper was to compile an overview of current trends in the preparation of MIP (Molecularly Imprinted Polymers). We focused on the implementation of ecologically acceptable solutions in the procedures for the fabrication and application of MIP, mainly for the purposes of chemical analyses. Theoretical approaches and simulations for the selection of optimal components of the polymerization mixture, the application of ultrasonic and microwave light in MIP synthesis, as well as microextraction procedures for the preparation of complex samples for analysis are successfully applied in analytical methods based on MIP adsorbents. While the use of low transition temperature mixtures (deep eutectic solvents, ionic liquids) and biomass components as a replacement or modification of porogens, functional and cross-linking monomers or other components of the polymerization mixture can help to transform the polymerization processes into more environment-friendly ones, it still requires an investigation of the synthesis mechanisms and their influence on the properties of the prepared MIPs.

Keywords: molecularly imprinted polymers, environment-friendly alternatives in preparation, use of MIP

Acknowledgements

This article was written thanks to the financial support under the grant nr. 1/0412/20 of the Scientific Grant Agency VEGA of the Slovak Republic, and thanks to the generous support under the Operational Program Integrated Infrastructure for the project: "Support of research activities of Excellence laboratories STU in Bratislava, Project no. 313021BXZ1, co-financed by the European Regional Development Fund."

The author A. Špačková thanks to the financial support under the Project of Young researcher at FCHFT STU in Bratislava (Preparation, evaluation of some properties and application of polymer sorbents in the analysis of cosmetic products).

Chemické Listy

Referát

www.chemicke-listy.cz

PROBLEMATIKA HOŘKÝCH PEPTIDŮ VZNIKAJÍCÍCH V PROCESU ZRÁNÍ SÝRŮ

Jana Zemanová[a] a Květoslava Šustová[b]

[a] Ústav technologie potravin, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, [b] Katedra ekonomie a managementu, AMBIS vysoká škola, a.s., Lindnerova 575/1, 180 00 Praha 8
jana.zemanova@mendelu.cz

Došlo 10.11.22, přijato 2.2.23.

Hořké peptidy vznikají rozkladem bílkovin a vysokomolekulárních peptidů v průběhu proteolýzy. Jejich tvorba v sýrech souvisí s proteolytickou aktivitou syřidel v rovnováze s peptidasovou aktivitou mikrobiálních enzymů mlékařských kultur. Hořká chuť pak vzniká při disproporci mezi tvorbou a odbouráváním hořkých peptidů zvýšením jejich koncentrace nad prahovou hodnotu vnímání. Do jaké míry ovlivní hořké peptidy celkovou chuť sýra tak závisí na rovnováze mezi jejich vznikem a rozpadem na nehořké nižší peptidy a aminokyseliny. Pouze dokonale vyvážený proces proteolýzy umožňuje vznik jakostního vyzrálého sýra s charakteristickou chutí a vůní. Proto je žádoucí úplné objasnění mechanismu, a tím i možnost kontroly a regulace tohoto procesu.

Klíčová slova: hořké peptidy, zrání sýrů, proteolýza kaseinu, hořká chuť

Obsah

1. Úvod
2. Proteolýza kaseinu a tvorba hořkých peptidů
3. Hořké peptidy z hlediska senzorické analýzy
4. Složení hořkých peptidů
5. Analýza a stanovení hořkých peptidů v sýrech
6. Možnosti regulace výskytu hořkých peptidů u sýrů a proteinových hydrolyzátů
7. Závěr

1. Úvod

Jedním z nejdůležitějších procesů, probíhajících při výrobě a zrání sýrů, je proteolýza, jejíž vyvážený průběh podmiňuje vznik jakostního sýra s typickou chutí, vůní a konzistencí. Zastoupení proteolytických enzymů, které se podílejí na těchto pochodech, mohou představovat v sýrařské technologii přidávaná syřidla, proteolytický systém přidávaných zákysových bakterií mléčného kvašení i přirozeně kontaminujících bakterií mléčného kvašení a také endogenní proteasy mléka[1,2].

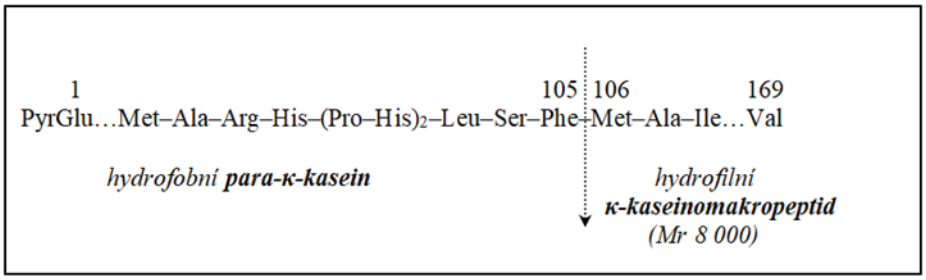
Průběh a produkty proteolýzy mléčné bílkoviny kaseinu jsou dále ovlivňovány nejenom koncentrací a specifitou působících enzymů, ale i fyzikálně-chemickými podmínkami při technologii výroby sýrů (pH, koncentrace solí a obsah vody v sýrech, teplota zrání). Jednotlivé frakce kaseinů jsou totiž odlišně náchylné ke změnám a rozsahu proteolýzy a v různých druzích sýrů mohou probíhat na odlišné úrovni. Současně se změnou textury kaseinové hmoty tak dochází i k tvorbě senzoricky významných látek, které dávají jednotlivým typům sýrů charakteristickou chuť a vůni. Vedle nich však mohou vznikat nežádoucí hořké peptidy[2–4].

2. Proteolýza kaseinu a tvorba hořkých peptidů

Proteolýza je považována za nejzásadnější biochemický proces při zrání sýrů u většiny druhů sýrů[5,6]. Proteolýza kaseinu začíná u sladkých sýrů při srážení mléka syřidlem (chymozinem), kdy dochází ke štěpení peptidické vazby κ-kaseinu mezi Phe_{105} a Met_{106} (obr. 1). Prvním z produktů tohoto štěpení je para-κ-kasein, jenž obsahuje hydrofobní část molekuly κ-kaseinu, a proto zůstává součástí kaseinových micel. Na rozdíl od nativního κ-kaseinu však nemá pro micelu ochrannou funkci. Druhým produktem je glykomakropeptid (κ-kaseinmakropeptid), složený ze 64 zbytků aminokyselin, který přechází do syrovátky díky obsahu hydrofilní části κ-kaseinu s vázanými oligosacharidy. Para-κ-kasein pak koaguluje v přítomnosti Ca^{2+} iontů s ostatními složkami kaseinu, přičemž vápník působí ve sraženině jako spojovací element[2,7–10].

Proteolýza kaseinu obecně probíhá ve třech základních stupních[3,8]. Z kaseinu se syřidlem, příp. proteolytickými enzymy čistých mlékařských kultur vytvoří peptidy o vysoké molekulové hmotnosti, které jsou převážně nehořké (obr. 2 – systém hydrolýzy 1, 1a). Molekulová hmotnost velkých peptidů je blízká hodnotě 20 000 Da.

Vysokomolekulární peptidy jsou hydrolyzovány proteasami čistých mlékařských kultur anebo syřidlem (obr. 2, způsob označený 2, 2a) na nízkomolekulární hořké peptidy. Ty ale mohou také vznikat přímou hydrolýzou

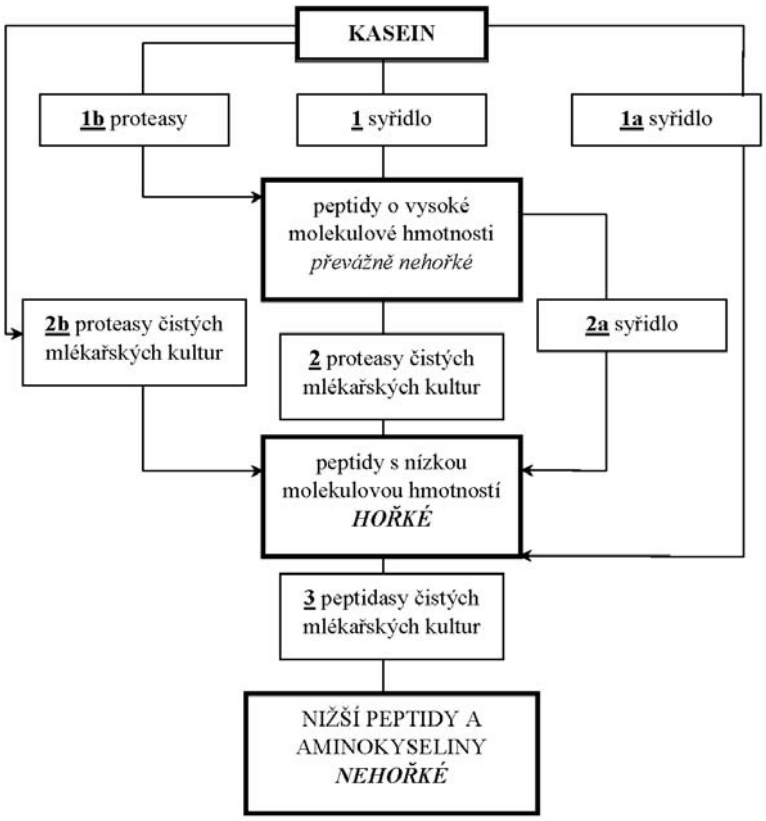


Obr. 1. **Schéma specifického štěpení kaseinu účinkem syřidla**[5,17,31]

kaseinu proteolytickými systémy čistých kultur (2b) nebo syřidlem (1a).

Následuje třetí stupeň proteolýzy, na kterém se podílejí peptidasy čistých mlékařských kultur, které hydrolyzují hořké peptidy na nižší nehořké peptidy a aminokyseliny. Ze schématu na obr. 2 je zřejmé, že pokud nemá hořkost přesáhnout postřehnutelnou mez, musí existovat rovnováha mezi rychlostí tvorby hořkých peptidů, tj. všech vstupů do druhého stupně proteolýzy, a jejich postupným odbouráváním, tj. rychlostí proteolýzy ve třetím stupni[9]. Je známo, že čisté mlékařské kultury, resp. jednotlivé druhy bakterií vyznačující se rychlou schopností prokysávání, jsou častou příčinou tvorby hořkých peptidů[5,7,10].

Procesu degradace se v různých fázích zrání sýrů účastní proteolytické enzymy pocházející z několika zdrojů[1,2,4,11]. Jedná se především o vlastní proteasy mléka, zbytkové enzymy syřidla a proteolytické enzymy bakterií mléčného kvašení přidávaných do mléka ve formě čistých mlékařských kultur neboli zákysu v důsledku podstatného zničení přirozené mikroflóry při pasteraci. U sýrů vyrábě-



Obr. 2. **Schéma vzniku hořkých peptidů podle Lawrieho a Lawrence**[7,10,34]

ných ze syrového mléka se pak jedná o enzymy původních mikroorganismů mléka. Proteolytické enzymy bakterií mléčného kvašení zahrnují proteasy i peptidasy, takže dlouhé hořké peptidy, které jsou substrátem pro peptidasy zákysových bakterií, jsou právě jimi štěpeny na krátké peptidy a aminokyseliny (obr. 3). Tento proces musí být dokonale vyvážen, protože disproporce mezi tvorbou a odbouráváním dlouhých peptidů vede ke vzniku nežádoucí hořké chuti[3,6,12–17].

Hlavní role syřidla při tvorbě hořkých peptidů a ve vývoji hořké chuti spočívá v produkci dlouhých peptidů, které jsou následně degradovány na krátké peptidy. Tvorba hořké chuti je vysvětlována tak, že v neporušených globulárních molekulách proteinu mohou být hlavní hydrofobní části řetězce ukryty uvnitř, a nemusí tak interagovat s buňkami chuťových receptorů. Pokud je protein enzymaticky hydrolyzován, dochází k odhalení postranních řetězců hydrofobních aminokyselin, které pak mohou interagovat s chuťovými buňkami receptorů. Současně se mění i velikost peptidů. Hydrofobní postranní řetězce dlouhých peptidů jsou ještě maskovány vůči některým typům hydrofobních interakcí. Nejčastější je struktura α-helix, která závisí na pH a na charakteru postranních řetězců. Po další hydrolýze je odhalováno stále více hydrofobních postranních řetězců, hořkost se tak vyvíjí a je maximální, jestliže karboxylové skupiny a aminoskupiny hydrofobních aminokyselin jsou součástí peptidové vazby[3,17–20].

Účinkem syřidla vznikají hořké peptidy jak z α_{s1}-kaseinu, tak z β-kaseinu, zatímco vlivem proteas bakterií mléčného kvašení se hořké peptidy tvoří většinou z β-kaseinu[5,6,22–25]. Vzhledem k tomu, že β-kasein má významnou úlohu i pro soudržnost kaseinových micel, je požadavek jeho regulované proteolýzy oprávněný (cit.[5,12,22,26,27]).

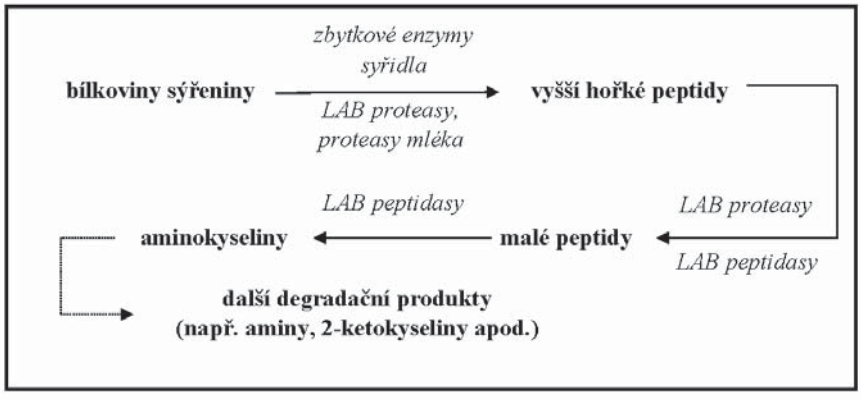
Také různé typy syřidel mohou být příčinou nadměrné tvorby hořkých peptidů, k jejichž odbourávání pak nestačí běžná aktivita přítomných enzymových systémů čistých mlékařských kultur. Vývoj hořké chuti má přímou souvislost i se zbytkovou koncentrací syřidla v sýřenině. Vyšší množství syřidla, zachyceného v sýřenině, způsobuje vjem hořkosti sýra[14,17,23].

3. Hořké peptidy z hlediska senzorické analýzy

Některá senzorická hodnocení peptidů poukazují na vztah mezi aminokyselinovým složením, strukturou, velikostí a chutí[28–30]. Mnoho L-aminokyselin chutná hořce, např. tyrosin, arginin, prolin, leucin, fenylalanin, tryptofan, isoleucin, přičemž jako nejvíce hořké jsou uváděny fenylalanin, tryptofan a tyrosin, jiné vyvolávají chuť sladkou, jako například alanin či serin. Peptidy tak mohou vyvolávat chuť hořkou i sladkou, ale také kyselou či umami[10,15,31,32]. Často bývá kyselá chuť spojována právě s chutí hořkou nebo hořkou a svíravou[33]. Ta bývá ovlivněna kaseinovými frakcemi o molekulové hmotnosti 2000–18 000 Da (cit.[34]).

Hořká chuť v sýrech se tak zdá být způsobena akumulací krátkých hořkých peptidů, vznikajících enzymovou hydrolýzou kaseinu, kdy jejich vznik je ovlivněn celou řadou faktorů – kvalitou výchozí suroviny a syřidla, použitou mikroflórou, solením atd. (cit.[17,32,35,36]). Poudel a spol.[37] uvádí, že výskyt hořkých peptidů je častým problémem zejména při urychlování procesu zrání sýra čedar účinkem endoproteas.

Celková hladina hořkosti sýra závisí na relativní rychlosti, jakou jsou hořké peptidy formovány a jakou štěpeny na nehořké produkty. Akumulace hořkých peptidů probíhá velmi pomalu, ale postupně může překonat prahovou hodnotu pro vnímání hořké chuti. Tyto peptidy, pokud jsou v podprahové koncentraci, přispívají k plnějšímu chuťovému profilu sýra, což je potvrzeno skutečností, že byly izolovány jak z hořkých, tak nehořkých sýrů[17,32,33,35].



Obr. 3. **Obecná dráha proteolýzy při zrání sýrů**[7,8]; LAB = bakterie mléčného kvašení (*Lactic Acid Bacteria*)

4. Složení hořkých peptidů

Hořké peptidy obsahují různý počet vázaných aminokyselin, obvykle 2–23 (cit.[38]). Více hořkých peptidů bylo izolováno z enzymatických hydrolyzátů kaseinu než ze samotných sýrů (tab. I, cit.[17,22]).

Hořké peptidy pocházejí přednostně z hydrofobních oblastí kaseinu. U α_{s1}-kaseinu jsou to frakce 14–34, 91–101 a 143–151, zatímco u β-kaseinu se většinou jedná o sekvenci 46–90 nebo potom hydrofobní C-konec řetězce (tj. fragmenty 196–209, 193–209, 202–209). Nejčastěji zmiňovaným hořkým peptidem v sýrech (většinou čedaru) je frakce 193–209 (Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Agr-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln) z β-kaseinu[24,25,39–42].

Hořkost peptidů obvykle klesá spolu se snižující se hodnotou hydrofobicity na C-konci řetězce, zejména, je-li na N-konci peptidu umístěna bazická aminokyselina (např. arginin). Naopak intenzita hořkosti je u peptidů posilována přítomností leucinu, fenylalaninu a tyrosinu[8,20], obzvláště jsou-li napojeny na C-konci peptidu[8,41].

Peptidy obsahující ve své struktuře prolin jsou často označovány jako hořké. Pro hořkou chuť je důležité, aby postranní řetězec aminokyseliny obsahoval nejméně 3 atomy uhlíku[3,8,14].

Z publikovaných výzkumů dále vyplývá, že v hořkých peptidech bývají nejvíce obsaženy hydrofobní L-aminokyseliny leucin, isoleucin, prolin, valin, fenylalanin, tyrosin a tryptofan, často je přítomna i kyselina glutamová, zatímco sirné aminokyseliny cystein a většinou methionin chybí[24,25,43].

Na hořkou chuť nemá vliv specifická sekvence aminokyselin[28–30]. Hořké peptidy jsou odštěpovány z určitých oblastí kaseinových řetězců, které se vyznačují zvýšenou hodnotou hydrofobicity, takže hořkost peptidů často souvisí právě s přítomností vysokého obsahu aminokyselin s hydrofobním postranním řetězcem, popř. aromatických aminokyselin[12,20,44].

Pro určení, zda je daný peptid hořký či ne, lze aplikovat tzv. Neyovo pravidlo (též značené jako Q-pravidlo), které je definováno následující rovnicí (*1*)[10]:

$$Q = \frac{\sum \Delta f_t}{n} \quad \left[\mathrm{J\ mol^{-1}}\right] \qquad (1)$$

kde Q je průměrná hodnota hydrofobicity peptidů, Δf_t volná energie přenosu postranního řetězce aminokyseliny z vody do organického rozpouštědla (tabelováno) a n počet aminokyselinových zbytků v peptidu. Hodnoty Δf_t pro 17 aminokyselin znázorňuje tab. II (cit.[8,10]).

Jedná se o empirické pravidlo, podle něhož hořké kaseinové peptidy mají průměrnou hydrofobicitu vztaženou na jednu aminokyselinu vyšší než 5860 J mol^{-1}, zatímco fragmenty s hodnotou této veličiny nižší než 5440 J mol^{-1} hořké nejsou. Platnost tohoto pravidla byla ověřena do molekulové hmotnosti 6000 Da. Peptidy nad touto hodnotou vnímány jako hořké nejsou, neboť nemohou interagovat s chuťovými receptory[3,8,14,21,23]. Mezi chuťovými receptory a hořkou látkou totiž dochází ke dvoubodové interakci, která je realizována velkou a výrazně hydrofobní částí molekuly a polární skupinou, jež mají navzájem určité sterické uspořádání[24,39,41]. Intenzita hořkosti je slabší, jsou-li hydrofobní aminokyseliny lokalizovány v koncových pozicích, a nejslabší, když jsou aminokyseliny volné. Tripeptidy jsou více hořké než dipeptidy a dipeptidy jsou více hořké než odpovídající volné aminokyseliny[25,40,41].

Tabulka I
Některé hořké peptidy, izolované z enzymatických hydrolyzátů kaseinu[24,25,39–42]

Peptid	Počet aminokyselin
Leu-Trp	2
cyklo-Leu-Trp-Leu-Trp	4
Gly-Pro-Phe-Pro-Val-Ile	6
Arg-Gly-Pro-Pro-Phe-Ile-Val	7
Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe	7
Pro-Ala-Leu-Pro-Glu-Tyr-Leu-Lys	8
Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tys-Leu-Lys	8
Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val	8
Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser	9
Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Pro-Gly-Ile-Asn-His	10
Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys	12
Pro-Gln-Agr-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln	14
Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile	15
Gly-Pro-Phe-Pro-Val-Ile-Pro-Pro-Val-Ala-Pro-Pro-Glu-Val-Pro-Gly-Lys	17
Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln	27

Tabulka II
Hodnoty Δf_t pro jednotlivé aminokyseliny[8,10]

Aminokyselina	Δf_t [J mol^{-1}]
Glycin (Gly)	0
Serin (Ser)	167
Threonin (Thr)	1841
Histidin (His)	2092
Kyselina asparagová (Asp)	2260
Kyselina glutamová (Glu)	2302
Arginin (Arg)	3055
Alanin (Ala)	3055
Methionin (Met)	5440
Lysin (Lys)	6277
Valin (Val)	7072
Leucin (Leu)	10 127
Prolin (Pro)	10 964
Fenylalanin (Phe)	11 089
Tyrosin (Tyr)	12 010
Izoleucin (Ile)	12 428
Tryptofan (Trp)	12 554

Samotný kasein vykazuje hodnotu hydrofobicity Q = 6697 J mol^{-1}, hořký není, principiálně však může štěpením na kratší řetězce hořké peptidy poskytovat[24,25].

5. Analýza a stanovení hořkých peptidů v sýrech

Technologická opatření vedoucí k zabránění tvorby hořké chuti v sýrech vycházejí z nezbytného posouzení, zda se vznikající hořký peptid v sýru akumuluje, nebo zda je dále hydrolyzován na nehořké fragmenty.

Pro kontrolu proteolýzy a celého zracího procesu sýrů je důležitý vhodně zvolený postup izolace a stanovení peptidů v jednotlivých stádiích zralosti sýrů. Stanovení peptidů se obecně skládá ze tří hlavních fází: extrakce dusíkatých látek ze sýra, jejich frakcionace a následné analýzy. Hořké peptidy přecházejí do vodného extraktu, který je obvykle frakcionován podle rozpustnosti nebo podle velikosti molekuly[45–47]. Pomocí RP-HPLC jsou separovány jednotlivé peptidy, které jsou finálně identifikovány Edmanovým odbouráváním nebo hmotnostní spektrometrií. Pokud jsou předmětem separace hořké peptidy, je intenzita hořké chuti jednotlivých frakcí porovnávána s chutí standardních roztoků chininu nebo kofeinu[48–51].

Izolace hořkých peptidů ze sýrů může být prováděna např. chloroform-methanolovou extrakcí a následným dělením peptidové frakce gelovou filtrací na Sephadexu G-25. Jednotlivé frakce se pak senzoricky ohodnotí. Michaelidou a spol.[52] publikovali závěr, kdy v hořké frakci zjistili významně vyšší podíl kyseliny glutamové a fenylalaninu.

Jiným řešením vedle této klasické metody je použití vodné extrakce podle Kuchrooa a Foxe[8,23,52–55] s následným oddělením vysokomolekulárních bílkovin srážením 70% ethanolem. Po odstředění bílkovin a vakuovém odpaření ethanolu lze takto získaný extrakt rozdělit gelovou chromatografií a jednotlivé frakce opět podrobit senzorickému hodnocení. Nejvyšší intenzitu hořkosti za daných podmínek vykazovala frakce odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 1400–2500 Da (cit.[56]).

V rámci jiné studie[57] byla pro identifikaci hořkých peptidů, vznikajících v průběhu zrání sýra Niva, aplikována metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Vodný extrakt, připravený výše zmíněným postupem podle Kuchrooa a Foxe a rozdělený na 7 frakcí, byl upraven extrakcí pevnou fází (SPE). Už z prvotního vyhodnocení naměřených hmotnostních spekter bylo zřejmé, že všechny peptidy se eluovaly hned na počátku extrakce. Z celkem 76 identifikovaných peptidů ve vodném extraktu sýra Niva bylo dle Neyova pravidla (*1*) vyhodnoceno 13 peptidů o 8–13 aminokyselinových zbytcích v řetězci jako hořkých. Z jednotlivých aminokyselin byly v hořkých peptidech nejčastěji zastoupeny prolin (25 %) a valin (12 %). Častější výskyt oproti ostatním aminokyselinám byl dále ještě zaznamenán u lysinu (10 %) a také u kyseliny glutamové (10 %). Zastoupen naopak vůbec nebyl tryptofan, přestože vykazuje vysokou hodnotu Δf_t, jeho chuť je popisována jako oříškově nahořklá[58] a v kaseinu se vyskytuje, i když v menší míře[10]. Další absentující aminokyselinou byla kyselina asparagová, jejíž chuť je definována jako sýrově nasládlá[58]. Metoda MALDI-TOF-MS je rychlá a vhodná pro analýzu specifických peptidů v sýru a může být efektivně využita pro hodnocení zrání sýra a screening aktivity kultur snižujících hořkost[59].

Kolektiv autorů Karametsi a spol.[60] při studiu látek odpovědných za hořkou chuť vyzrálého sýra čedar k frakcionaci kromě gelové permeační chromatografie využil též multidimenzionální semipreparativní HPLC na reverzní fázi. Následně bylo tandemovou hmotnostní spektrometrií identifikováno 5 peptidů s nejvyšší vnímanou intenzitou hořkosti, všechny pocházející z β-kaseinu. Senzorická analýza potvrdila, že hlavním přispěvatelem k intenzitě hořkosti studovaného čedaru byl peptid GPVRGPFPIIV (cit.[60]).

Výskyt nežádoucí hořké chuti byl zkoumán též u sýra Ragusano[61]. Kromě zavedených chromatografických metod byla využita i elektroforetická technika urea-PAGE. Primární proteolýza byla shledána významně vyšší u hořkých sýrů ve srovnání s referenčními vzorky. Peptidy separované RP-HPLC odhalily, že velké a významné rozdíly v peptidových profilech rozpustných frakcí mezi hořkými a referenčními sýry byly způsobeny hlavně mnohem vyšším podílem hydrofobních peptidů u hořkých sýrů. Rozsáhlá degradace kaseinů a primárních peptidů aktivitami proteas vedla k produkci významného množství malých a středně velkých hydrofobních peptidů, které nebyly uspokojivě rozštěpeny peptidasami mikroflóry, a hromadily se v sýru, což přispívalo k jeho hořké chuti. Bylo zjištěno, že přítomnost těchto sloučenin v hořkých sýrech vý-

znamně souvisí s vysokým obsahem soli a nízkou aktivitou vody, které snižují enzymatickou aktivitu mikroflóry, důležitou při sekundární proteolýze[61].

6. Možnosti regulace výskytu hořkých peptidů u sýrů

Peptidasy některých kmenů bakterií mléčného kvašení jsou v rámci této skupiny při degradaci hořkých peptidů významně účinnější[62–66], čehož lze využít již při prvotní volbě vhodných kultur ovlivňujících průběh zrání.

Do plísňových sýrů byly s úspěchem použity např. bakterie *Brevibacterium linens*, které vykazují vysokou proteolytickou aktivitu a hydrolyzují hořké peptidy[12,67].

Bakterie rodu *Lactococcus* se vyznačují tím, že produkují enzym laktocepin, který má tři frakce a který – stejně jako plazmin či chymozin – vykazuje hydrolytické vlastnosti. Právě rozdíly v přítomnosti a formě laktocepinů mohou částečně vysvětlit, proč některé laktocepin-pozitivní zákysové bakterie mléčného kvašení rodu *Lactococcus* mají vyšší tendence způsobovat hořkost sýra, a je tedy třeba věnovat řádnou pozornost výběru konkrétního kmene[68]. Také ultrafiltrace mléka před výrobou sýrů a použití kultur produkujících exopolysacharidy, s dobrou peptidolytickou aktivitou, vede k efektivnímu odstranění hořkosti ze sýrů[32].

Rovněž akceptovatelné snížení významného podílu soli v sýru je řešeno, neboť toto hraje klíčovou roli v rozvoji hořké chuti během procesu zrání sýrů. Z práce Khetra a spol.[69] se předpokládá snížení obsahu sodíku v sýru čedar použitím draselné alternativy soli v kombinaci se zvýrazňovači chuti a blokátory hořkosti. V rámci tohoto experimentu byl vyhodnocen sýr s nízkým obsahem sodíku (75% substituce chloridu sodného), 2 g l^{-1} hydrolyzovaného rostlinného proteinu a 300 mg l^{-1} adenosin-5′-monofosfátu jako nejlepší bez negativního vlivu na jeho senzorickou kvalitu[69].

7. Závěr

Problematika hořké chuti sýrů je poměrně složitá, a hlavně komplexní záležitost. Tato práce se zaměřila na skupinu tzv. hořkých peptidů jako na jeden ze zásadních faktorů v této oblasti. Hořké peptidy se formují během proteolýzy, která je považována za nejvýznamnější biochemický proces při zrání většiny druhů sýrů. Nelze však opomenout, že hořká chuť sýra může být způsobena a ovlivňována i řadou jiných složek, zejména rozkladnými produkty lipidů. Dokonale technologicky zvládnutý proces zrání je tedy nezbytný pro vznik jakostního sýra s charakteristickými a žádoucími senzorickými vlastnostmi.

LITERATURA

1. Pinheiro J. S., Siqueira Souza Sudré B. G., Silveira Alexandre A. C., Campolina G. A., Correia E. F., de Souza Costa Sobrinho P.: Int. J. Gastron. Food Sci. *24*, 100331 (2021).
2. Xia Y., Yuan R., Weng S.: Food Res. Int. *137*, 109657 (2020).
3. Tekin A., Hayaloglu A. A.: Int. Dairy J. *137*, 105508 (2022).
4. Khattab A. R., Guirguis H. A., Tawfik S. M., Farag M. A.: Trends Food Sci. Technol. *88*, 343 (2019).
5. Öztürk H., Akın N.: J. Dairy Sci. *104*, 3832 (2021).
6. Baptista D. P., Gigante M. L.: Appl. Food Res. *2*, 100107 (2022).
7. Fox P. F., McSweeney P. L. H.: Food Rev. Int. *12*, 457 (1996).
8. Ardö Y., McSweeney P. L. H., Magboul A. A. A., Upadhyay V. K., Fox P. F., v knize: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 4. vyd. str. 445. Academic Press, Amsterdam 2017.
9. Priyashantha H., Höjer A., Saedén K. H.: Food Control *130*, 108316 (2021).
10. McSweeney P. L. H.: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 3 vyd. Elsevier, Amsterdam 2022.
11. Gobbetti M., de Angelis M., di Cagno R., Mancini L., Fox P. F.: Trends Food Sci. Technol. *45*, 167 (2015).
12. Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H., O'Mahony J. A.: *Dairy Chemistry and Biochemistry*, 2. vyd. Springer, Cham 2015.
13. Faccia M., Natrella G., Gambacorta G., Trani A.: J. Dairy Sci. *105*, 140 (2022).
14. Fallico V., McSweeney P. L. H., Horne J.: J. Dairy Sci. *88*, 1288 (2005).
15. Wilkinson M. G., Doolan I. A., Kilcawley K. N., v knize: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, str. 166, Elsevier, Amsterdam 2022.
16. Nuñez M., v knize: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, str. 648, Elsevier, Amsterdam 2022.
17. Mayer H. K.: Int. Dairy J. *11*, 4 (2001).
18. Galli B. D., Baptista D. P., Cavalheiro F. G., Negrão F., Eberlin M. N., Gigante M. L.: Food Res. Int. *123*, 393 (2019).
19. Alim A., Song H., Raza A., Hua J.: Int. Dairy J. *110*, 104803 (2020).
20. Broadbent J. R., Strickland M., Weimer B. C., Johnson M. E., Steele J. L.: J. Dairy Sci. *81*, 327 (1998).
21. Yang W., Hao X., Zhang X.: LWT *141*, 110866 (2021).
22. Picon A., Gaya P., Nuñez M.: Int. Dairy J. *17*, 218 (2007).
23. Michaelidou A., Alichanidis E., Urlaub H., Polychroniadou A., Zerfiridis G. K.: J. Dairy Sci. *81*, 3109 (1998).
24. Murray N. M., O'Riordan D., Jacquier J. C.: J. Dairy Sci. *101*, 2826 (2018).
25. Charoenkwan P., Yana J., Schaduangrat N., Nantasenamat C., Hasan M. M., Shoombuatong W.: Genomics *112*, 2813 (2020).
26. Jaros D., Rohm H., v knize: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 4. vyd., str. 53. Academic Press 2017.

27. Li Q., Zhao Z.: Food Chem. *291*, 231 (2019).
28. Kato H., Rhue M. R., Nishimura T.: Flavour Chem. *388*, 158 (1989).
29. Roudot-Algaron F.: Lait *76*, 313 (1996).
30. le Quéré J. L., Septier C., Demaizières D., Salles C.: Flavour Sci. *325* (1996).
31. D'Incecco P., Hogenboom J. A., Rosi V., Cabassi G., Pellegrino L.: Food Chem. *370*, 131043 (2022).
32. Agrawal P., Hassan A. N.: J. Dairy Sci. *90*, 3110 (2007).
33. Chobert J. M.: Adv. Food Nutr. Res. *47*, 1 (2003).
34. Pihlanto A., Korhonen H.: Adv. Food Nutr. Res. *47*, 175 (2003).
35. Khetra Y., Kanawjia S. K., Puri R., Kumar R., Meena G. S.: Int. Dairy J. *91*, 165 (2019).
36. Rako A., Tudor Kalit M., Rako Z., Zamberlin S., Kalit S.: LWT *162*, 113506 (2022).
37. Poudel R., Thunell R. K., Oberg C. J.: J Dairy Sci. *105*, 2069 (2022).
38. Schäfer J., Sebald K., Dunkel A.: Int. Dairy J. *93*, 72 (2019).
39. Gao Y., Wu X., McClements D. J.: Food Chem. *386*, 132787 (2022).
40. Fan M., Guo T., Li W.: Food Sci. Hum. Wellnes *8*, 156 (2019).
41. Rajagopalan A., Aluru V., Omana Sukumaran B.: Int. Dairy J. *115*, 104934 (2021).
42. Sarabandi K., Sadeghi Mahoonak A., Hamishekar H., Ghorbani M., Jafari S. M.: J. Food Eng. *237*, 86 (2018).
43. Höhme L., Fischer C., Kleinschmidt T.: Food Chem. *404*, 134527 (2023).
44. Sutay Kocabaş D., Lyne J., Ustunol Z.: Trends Food Sci. Technol. *119*, 467 (2022).
45. Salvat-Brunaud D., Maubois J. L., le Graët Y.: Lait *75*, 239 (1995).
46. Lemieux L., Simard R. E.: Lait *72*, 335 (1992).
47. Salles C., Septier C., Roudot-Algaron F., Guillot A., Etiévant P. X.: J. Agric. Food Chem. *43*, 1659 (1995).
48. Bütikofer U., Baumann E., Sieber R., Bosset J. O.: LWT – Food Sci. Technol. *31*, 297 (1998).
49. Champion H. M., Stanley D. W.: Can. Inst. Food Sci. Technol. J. *15*, *283* (1982).
50. McSweeney P. L. H., Fox P. F.: Lait *77*, 41 (1997).
51. Gouldsworthy A. M., Leaver J., Banks J. M.: Int. Dairy J. *6*, 781 (1996).
52. Michaelidou A. M., Alichanidis E., Polychroniadou A., Zerfiridis G.: Int. Dairy J. *15*, 663 (2005).
53. Březina P., Cikánek D., Plocková M., Schovánková I., Kopečný J.: Mlékařské Listy *14*, 303.55 (1988).
54. Silva S., Malcata F. X.: J. Dairy Sci. *88*, 1947 (2005).
55. Silva D. D. da, Lima M. dos S. F. de, Silva M. F. da: LWT *108*, 97 (2019).
56. Cikánek D., Březina P., Pavlíková Š.: Mlékařské Listy *51*, 84.6 (1990).
57. Zemanová J.: *Stanovení látek bílkovinné povahy v potravinářských materiálech. Disertační práce.* Vysoké učení technické v Brně, Brno 2005.
58. Salles C., Hervé C., Septier C.: Food Chem. *68*, 429 (2000).
59. Soeryapranata E., Powers J. R., Hill H. H., Siems III W. F., Al-Saad K. A., Weller K. M.: J. Food Sci. *67*, 534 (2006).
60. Karametsi K., Kokkinidou S., Ronningen I., Peterson D. G.: J. Agric. Food Chem. *62*, 8034 (2014).
61. Fallico V., McSweeney P. L. H., Horne C., Pediliggieri C., Hannon J. A., Carpino S., Licitra G.: J. Dairy Sci. *88*, 1288 (2005).
62. Bergamini C., Hynes E. R., Candioti M. C., Zalazar C. A.: J. Dairy Sci. *92*, 2455 (2009).
63. Bergamini C. Hynes E. R., Palma S. B., Sabbag N. G., Zalazar C. A.: Int. Dairy J. *19*, 467 (2009).
64. Lee B. H., Laleye L. C., Simard R. E., Munsch M.-H., Holley R. A.: J. Food Sci. *55*, 391 (1990).
65. Arora G., Lee B. H.: J. Dairy Sci. *73*, 274 (1990).
66. Habibi-Najafi M. B., Lee B. H.: J. Dairy Sci. *77*, 385 (1994).
67. Croguennec T., Jeantet R., Schuck P.: *Handbook of Food Science and Technology 3: Food Biochemistry and Technology*. J. Wiley, Hoboken 2016.
68. Pillidge C. J., Crow V. L., Coolbear T., Reid J. R.: Int. Dairy J. *13*, 345 (2003).
69. Khetra Y., Kanawjia S. K., Puri R.: LWT *72*, 99 (2016).

J. Zemanová[a] and K. Šustová[b] *([a] Department of Food Technology, Faculty of AgriSciences, Mendel University of Brno; [b] AMBIS Prague):* **The Problem of Bitter Peptides Formed in the Process of Cheese Ripening**

Bitter peptides are formed by the breakdown of proteins and high-molecular peptides during proteolysis. Their formation in cheeses is related to the proteolytic activity of rennet in balance with the peptidase activity of microbial enzymes of lactic acid bacteria. The bitter taste then arises when there is a disproportion between the formation and degradation of bitter peptides by increasing their concentration above the perception threshold. The extent to which bitter peptides affect the overall taste of cheese depends on the balance between their formation and breakdown to non-bitter lower peptides and amino acids. Only a perfectly balanced proteolysis process enables the creation of quality matured cheese with a characteristic taste and aroma. Therefore, a complete clarification of the mechanism is desirable, and thus also the possibility of control and regulation of this process.

Keywords: bitter peptides, cheese ripening, casein proteolysis, bitter taste

Chemické Listy

Referát

www.chemicke-listy.cz

ZANEDBÁVANÉ APLIKACE MONOLITICKÝCH STRUKTUR: POČÁTKY PLANÁRNÍ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRICKOU DETEKCÍ

FRANTIŠEK ŠVEC

Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika
svecfr@faf.cuni.cz

Došlo 13.2.23, přijato 10.3.23.

Planární chromatografie neboli tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla poprvé popsána N. A. Izmailovem a M. S. Schreiberovou koncem 30. let minulého století. Kapalná mobilní fáze se obvykle pohybuje v pórech vrstvy nanesené na pevnou podložku umístěnou vertikálně v jednoduché nádobě, např. kádince. Tok je poháněn pouze kapilárními silami v pórech a není potřeba žádné sofistikované přístrojové vybavení. Jednotlivé složky směsi jsou separovány na základě rozdílů v jejich afinitě k pevné stacionární a kapalné mobilní fázi. Typický formát stacionární fáze představuje tenkou vrstvu sorbentu nanesenou na skleněné, hliníkové nebo plastové desce. Porézní sorbenty mohou být oxid křemičitý (silika), oxid hlinitý (alumina) či celulóza, držené pohromadě např. sádrou. Hlavními výhodami TLC jsou snadnost provádění separací, které mohou probíhat i v paralelních liniích na stejné vrstvě, jednoduché vybavení, stacionární fáze pro jednorázové použití, statická detekce a možnost archivace výsledku separace ve vysušené vrstvě. Typické vrstvy o tloušťce 100–250 μm však nejsou příliš vhodné pro kombinaci TLC s hmotnostní spektrometrií (MS). To vedlo ke komercializaci ultratenkých 10 μm silných monolitických vrstev oxidu křemičitého. Jejich výroba byla bohužel brzy ukončena. Alternativní řešení tohoto problému pocházela z akademického prostředí. Jeden přístup zahrnoval vrstvy vytvořené z nanovláken připravených elektrostatickým zvlákňováním. Alternativou byly porézní monolitické polymerní vrstvy vyrobené polymerací *in situ* a byla s nimi demonstrována řada separací jak malých, tak i velkých molekul. Použití MS detekce pak umožnilo zjištění molekulové hmotnosti látek v separovaných skvrnách. Přestože se příprava tenkých monolitických vrstev původně jevila jako jednoduchá, bylo nutné vyřešit některé neočekávané problémy. Tento přehled podrobně popisuje problémy související s historií monolitické TLC a představuje přístupy vedoucí k vrstvám vhodným pro požadované separace.

Klíčová slova: planární chromatografie, tenkovrstvá chromatografie, monolitické vrstvy, separace, hmotnostní spektrometrie

Obsah

1. Úvod
2. Tenké vrstvy pro monolitickou planární chromatografii
   2.1. Monolitické ultratenké vrstvy z oxidu křemičitého
   2.2. Polymerní vrstvy připravené elektrostatickým zvlákněním
3. Trocha historie
4. Rané doby organo-monolitické planární chromatografie
5. Zvláštnosti přípravy tenkých vrstev
6. Závěry

1. Úvod

Pro připomenutí: Monolity jsme již dříve definovali jako pevnou látku ve formě jednoho kusu porézního anorganického materálu nebo organického polymeru, nejčastěji připravenou chemickou reakcí, jako je polykondenzace, polymerizace, či „click“ reakce uvnitř vhodného kontejneru nebo na povrchu nosiče. Přehledné referáty týkající se porézních polymerních monolitů nejsou v tomto časopise neobvyklé. Sluší se připomenout, že tento formát separačních medií se narodil na konci osmdesátých let minulého století v Praze a jeho historie byla podrobně popsána v obsáhlém referátu[1]. Pěkný přehledný referát týkající se této problematiky byl publikován nedávno[2]. Monolity byly původně vyvinuty jako alternativa ke kolonám plněným drobnými částicemi sloužícími jako stacionární fáze v kapalinové chromatografii. Nicméně, v průběhu doby se zjistilo, že monolitické struktury lze použít i jinde a paleta aplikací se začala rozšiřovat. Byly s úspěchem aplikovány v dalších chromatografických technikách, jako jsou tenkovrstvá a plynová chromatografie[3], chromatografie

s použitím tekutiny v superkritickém stavu[4], elektrochromatografie[5], v přípravě vzorků včetně extrakce pevnou fází[6] a metalo-organickými stavebními prvky[7], či reaktivní filtrace[8], jako nosiče pro kombinatoriální chemii[9], jakož i pro přípravu účinných bioreaktorů a heterogenních katalyzátorů[10], mikrofluidních zařízení[11], senzorů, podložek pro povrchem zesílený Ramanův rozptyl[12] a detektorů[13]. Rozsáhlejší přehled mnohých těchto méně rozšířených použití monolitických struktur byl v Chemických listech shrnut v dalším přehledném referátu[14]. Zatímco onen referát popsal mnohé aplikace ve velmi zhuštěné formě, tento příspěvek se soustředí na jedinou techniku, planární chromatografii též zvanou tenkovrstvou chromatografií (thin layer chromatography, TLC) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (mass spectrometry, MS), a předvede, že tato jednoduchá, leč v dnešních dnech zanedbávaná separační metoda může sloužit v řadě zajímavých aplikací.

TLC patří mezi nejstarší šířeji používané chromatografické techniky a byla poprvé popsána Izmailovem a Šrajberovou už v roce 1938 (cit.[15]). Kupodivu je tato separační metoda mnohem častěji používaná v organické chemii pro sledování reakcí a určování čistoty produktů než v dnešních analytických separacích. Kapalná mobilní fáze se většinou pohybuje v pórech vrstvy na desce postavené vertikálně v jednoduché nádobě např. kádince, a je poháněna pouze kapilárními silami v pórech. Roztok jednotlivých komponent dělené směsi je nakápnut na spodní část vrstvy a k separaci dojde na základě rozdílů v jejich afinitě k pevné stacionární a kapalné mobilní fázi. Typické provedení se děje na skleněné, hliníkové nebo plastové desce potažené tenkou vrstvou stacionární fáze, jíž může být oxid křemičitý (silika), oxid hlinitý (alumina) či celulosa, stmelené např. sádrou. Hlavními výhodami TLC jsou snadnost provedení separací, které mohou probíhat i v paralelních liniích na jedné desce, jednoduché vybavení, stacionární fáze k jednorázovému použití, statická detekce, a možnost archivování výsledku separace ve vysušené vrstvě. Detailní popis historie, metodiky a potřebného vybavení je popsán např. v obsáhlé monografii[16].

2. Tenké vrstvy pro monolitickou TLC

2.1. Monolitické ultratenké vrstvy z oxidu křemičitého

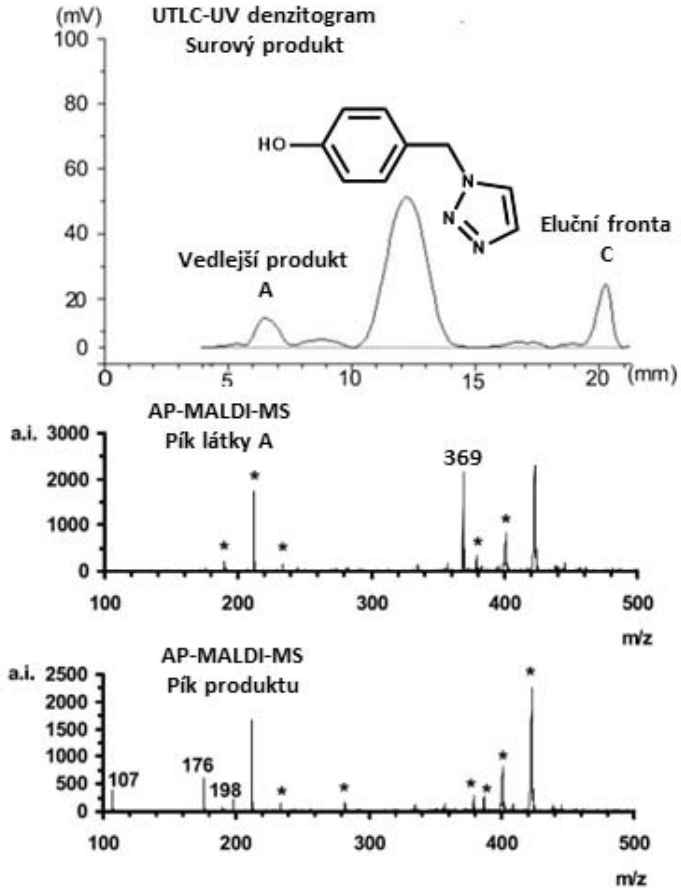
V polovině 90. let minulého století Gusev a spol. poprvé demonstrovali TLC separace velkých molekul proteinů a peptidů na standardních vrstvách oxidu křemičitého s použitím detekce hmotnostní spektrometrií s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) a konvenčního UV laseru produkujícího záření o vlnové délce 337 nm (cit.[17]). Kromě úspěšné separace a detekce také zjistili, že detekční limit nebyl příliš vysoký. Pochopili, že většina vzorku není lokalizována na povrchu, na který dopadá laserové záření, ale uvnitř ve 100–250 μm silné vrstvě. Aby tento problém alespoň z části vyřešili, převedli analyty na povrch vrstvy pomocí extrakce methanolem nakápnutým na separovanou skvrnu a následným přidáním roztoku konvenční MALDI matrice. Naproti tomu použití MALDI s infračerveným laserem se zářením o vlnové délce 2,54 μm, které proniká do větší hloubky separační vrstvy, zlepšilo detekční limit až desetkrát[18]. Je pravděpodobné, že ke špatné separační účinnosti přispělo i použití nevhodných komerčních vrstev z oxidu křemičitého. Proto bylo žádoucí vyvinout nové typy vrstev. Jednou z odpovědí na tuto výzvu bylo zavedení komerčních monolitických ultratenkých vrstev na bázi tohoto materiálu.

Tenké monolitické vrstvy na bázi oxidu křemičitého se poprvé objevily jako komerční produkt distribuovaný společností Merck KGaA (Darmstadt, Německo) na počátku třetího tisíciletí[19]. Způsob jejich výroby pochopitelně nebyl firmou nikdy odhalen. Tyto relativně malé desky (6 × 3,6 cm) nesly 10 μm silné monolitické vrstvy, které daly název této technice: ultratenkovrstvá chromatografie neboli UTLC. Separace pomocí této techniky byly nejprve demonstrovány s malými molekulami léčiv[20]. Tyto vrstvy byly později také použity v kombinaci s detekcí v módu hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s průletovým analyzátorem (time of flight-secondary ion mass spectrometry, TOF-SIMS)[21] a MALDI, a to jak ve vakuu, tak i za atmosférického tlaku[22,23]. Obr. 1 ilustruje MALDI spektra separovaných píků z monolitické vrstvy oxidu křemičitého získaná po aplikaci matrice α-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA).

Výroba a prodej těchto monolitických desek však byly záhy ukončeny. Důvody, které by mohly stát za tímto rozhodnutím, uvádí Poole a Poole na základě analýzy, byť i omezeného počtu publikovaných studií[24]: *„Ve srovnání se stabilizovanými částicovými vrstvami poskytují* (ultratenké vrstvy) *rychlejší separace, nižší limity hmotnostní detekce a nižší spotřebu rozpouštědel na úkor nižšího rozlišení a zvýšené složitosti manipulace. Aplikace vzorků je problematická kvůli malým objemům vzorků a malým aplikačním zónám potřebným pro optimální separace, což je přímý důsledek tenké vrstvy a krátkých migračních vzdáleností. Značná propustnost světla monolitickými vrstvami spolu s malými rozměry zón a krátkými migračními vzdálenostmi přispívá k problémům kvantitativních měření pomocí skenovací denzitometrie. Vzorky aplikované pomocí standardního laboratorního vybavení pro vysokoúčinnou tenkovrstvou chromatografii vedou spíše k méně uspokojivým výsledkům. Pro nízkomolekulární sloučeniny s hodnotami retenčního faktoru R_f mezi 0,1 a 0,5 byla získána zónová kapacita pouze 5–6 při tloušťce vrstvy 8–10 μm.“*

2.2. Polymerní vrstvy připravené elektrostatickým zvlákněním

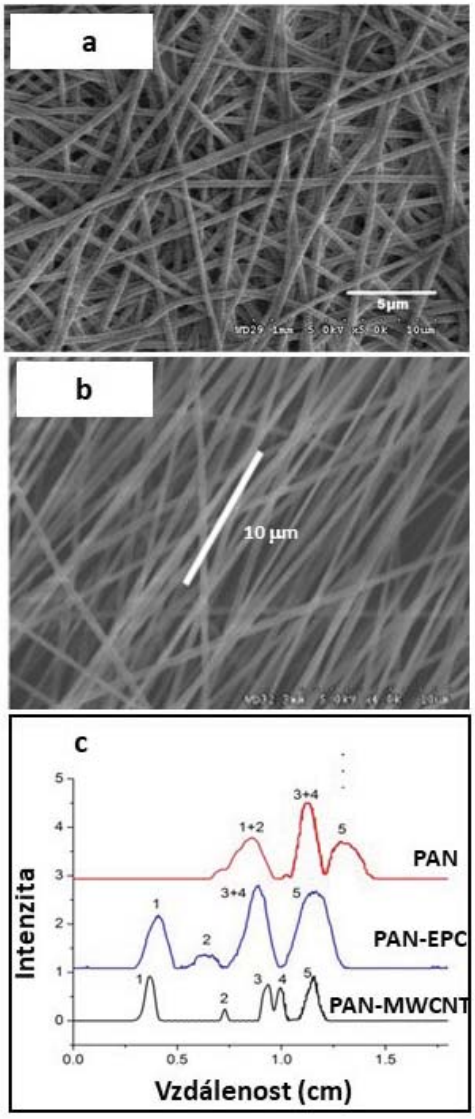
Skupina Susan Olesikové byla průkopníkem zcela odlišného přístupu k ultratenkým vrstvám s monolitickou strukturou. Nejprve byly zkoumány vrstvy elektrostaticky zvlákněných poly(akrylonitrilových) nanovláken nanesených na hliníkovou fólii[25]. Později byla připravena i čistě



Obr. 1. **Separace surových produktů syntézy substituovaného triazolu (*m*/*z* 175) s použitím mobilní fáze ethylacetát-hexan (1:2 v/v) obsahující 2 % octové kyseliny a prezentovaná jako UTLC-UV denzitogram surového vzorku po syntéze[23].** Identifikace píků byla provedena pomocí spekter vedlejšího produktu A (*m*/*z* 369, $[M+H]^+$) a produktu (*m*/*z* 198, $[M+Na]^+$ a *m*/*z* 176, $[M+H]^+$) získaných detekcí MALDI-MS při atmosférickém tlaku. Hlavní matricové ionty jsou označeny hvězdičkami

uhlíková vlákna cestou *in situ* pyrolýzy výše uvedených poly(akrylonitrilových) prekurzorů [26]. Struktura první z těchto vrstev je znázorněna na obr. 2a. Poole a Poole se k tomuto přístupu opět vyjádřili[24]: *„Vrstvy jsou dostatečně stabilní pro obecné použití v separacích bez nutnosti použití pojiva a byly připraveny o rozměrech 2 až 3 cm širokých a 6 cm dlouhých. Vrstvy z poly(akrylonitrilu) byly vyrobeny z vláken o průměru 400 nm a byly 25 μm silné. Vrstvy z uhlíku se skládaly z vláken o průměru 200–350 nm a tloušťce 13–16 μm. Roztoky vzorků o objemu 50 nl byly kapány injekční stříkačkou tak, aby vznikly počáteční zóny o průměru přibližně 0,25–0,50 mm, a po vyvolání kapilárním tokem byly odděleny zóny o průměru menším než 2,5 mm. Rychlosti pohybu mobilní fáze byly obecně vyšší, než se pozorovalo u vysoce účinných tenkovrstvých destiček. Pozoruhodnou vlastností těchto vrstev je, že pro mnoho sloučenin je rozšíření pásů minimální a byly pozorovány hodnoty výšky patra trvale pod 10 μm při vzdálenosti vyvolávání 1–6 cm. Tato separace je mnohem lepší než v případě stabilizovaných vrstev částic rovněž využívajících kapilární tok.“*

Tato skupina posléze rozšířila svou technologii a připravila vláknité vrstvy se srovnanými poly (akrylonitrilovými) nanovlákny znázorněnými na obr. 2b, jejichž účinnost byla prokázána při separacích léčiv[27]. Tyto vrstvy poskytovaly separace v kratším čase a s lepší reprodukovatelností. Kromě toho připravili také nanovlákenné vrstvy z roztoku poly(akrylonitrilu), ve kterých byly rozptýleny mnohovrstvé uhlíkové nanotrubičky (multi-walled carbon nanotubes, MWCNT) nebo uhlíkové nanotyčinky (edge-plane carbon nanorods, EPCN)[28]. Uhlíkové nanočástice ve vláknech přispívaly k selektivitě separace údajně díky silným π-π interakcím. Zvýšená selektivita a účinnost byla prokázána při separaci polycyklických aromatických uhlovodíků, která je znázorněna na obr. 2c. Otázkou zůstává, jak může tak malé množství nanouhlíku



Obr. 2. **Skenovací elektronové mikrofotografie zobrazující poly(akrylonitrilovou) vrstvu připravenou „konvenčním" elektrostatickým zvlákněním a zarovnaná polyakrylonitrilová nanovlákna vytvořená na rotujícím kolektoru při rychlosti otáčení 1250 ot/min (cit.[25,27]) (a,b). Porovnání chromatogramů znázorňujících separaci (1) benzo[a]pyrenu, (2) chrysenu, (3) pyrenu, (4) fluoranthenu a (5) fenantrenu při použití vrstvy ze samotných poly(akrylonitrilových) vláken (PAN) za použití mobilní fáze acetonitril-voda, 70:30, jakož i s použitím vláken obsahujících 0,5 % uhlíkových nanotyčinek (PAN-EPCN) a vláken obsahujících 0,5 % vícevrstvých uhlíkových nanotrubiček (PAN-MWCNT), obojí s mobilní fází acetonitril-voda, 60:40 (cit.[28]) (c)**

a ještě k tomu podle skenovací elektronové mikrofotografie schované uvnitř vláken mít tak značný vliv na TLC separace.

Arzenál polymerů pro přípravu elektrostaticky zvlákněných vrstev byl posléze rozšířen použitím poly(vinylalkoholu)[29] a acetátu celulosy[30]. V prvním případě jimi byly separovány aminokyseliny včetně jejich fluorescenčně značených derivátů v mobilní fázi methanol-butanol-voda. Později byly použity pro screening steroidů za účelem důkazu falšování tradičních léčivých přípravků.

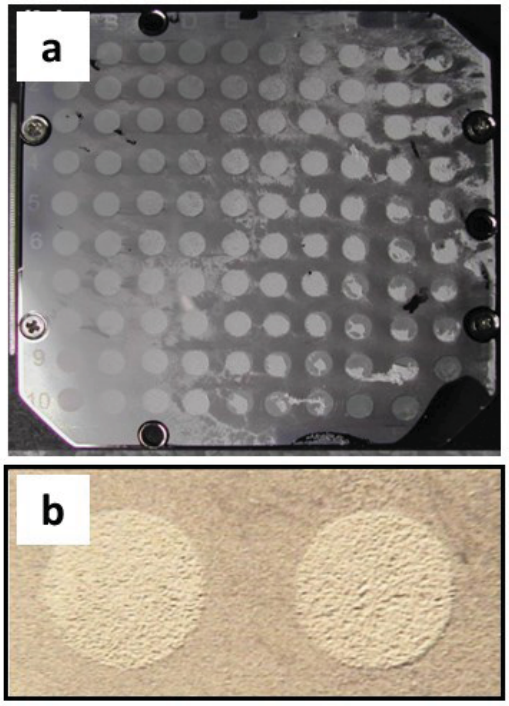
Nanovláknové vrstvy z polyakrylonitrilu a poly(vinylalkoholu) se rovněž ukázaly jako vynikající substráty pro hmotnostní spektrometrii malých i velkých molekul pomocí povrchem zesílené laserové desorpce/ionizace (surface-assisted laser desorption ionozation, SALDI) bez nebo s asistencí nízkomolekulární matrice[31]. Například poly(oxyethyleny) s molekulovou hmotností až 900 000 bylo možné detegovat v hmotnostních spektrech s dostatečným poměrem signálu k šumu. Ionizace polystyrenu s molekulovou hmotností 4000 bylo dosaženo v režimu SALDI bez přídavku jakékoliv matrice. Pro peptid angiotensin 1 však nebyl v tomto režimu pozorován žádný signál. Naopak při použití substrátu z nanovláken poly(vinylalkoholu) byl po aplikaci směsného roztoku peptidu a CHCA jako matrice zjištěn dobrý signál s malým pozadím. Síla tohoto signálu převyšovala sílu signálu získanou po aplikaci směsného vzorku přímo na MALDI desku z nerezové oceli.

3. Trocha historie

Jakkoliv se může zdát, že tenké monolitické vrstvy z organických polymerů byly zavedeny relativně nedávno, tedy až kolem roku 2007, jak bude uvedeno později, opak je pravdou. Není asi překvapením, že první zmínka týkající se použití monolitu podobné hydrogelové vrstvy opět pochází z Prahy[32] stejně jako první monolitu podobná kolona[33]. Miroslav Kubín z Ústavu makromolekulární chemie ČSAV připravil již v roce 1972 poly(2-hydroxyethyl-methakrylátový) hydrogel ve formě 1,5 mm silné a 1 × 2 cm velké vrstvy a použil jí pro separace myších, lidských a kuřecích erythrocitů. Tyto částice mají velikost 5,5, 7,2 a 11 µm a k jejich rozdělení došlo právě podle velikosti. I když výsledky této prvotní zprávy mají daleko do dnešní monolitické TLC, prvky této metody jsou v ní již obsaženy.

Ve skutečnosti prapředkem soudobých monolitických kolon zavedeném již na konci osmdesátých let minulého století, byly polymerní monolitické disky, které vlastně přestavovaly tenké vrstvy[34]. Jejich příprava spočívala v polymerizaci směsi glycidyl-methakrylátu, ethylendimethakrylátu, cyklohexanolu, dodekanolu a volnoradikálového iniciátoru ve formě sestávající ze dvou vyhřívaných hliníkových desek oddělených od sebe polypropylenovým těsněním a sešroubovaných dohromady. Z takto připravených 10 × 10 cm velkých a 2 mm silných monolitických vrstev porézního polymeru se pak manuálně vykrajovaly požadované disky.

Nová reinkarnace tohoto postupu se objevila po více než deseti letech, když Dominic Peterson v roce 2004

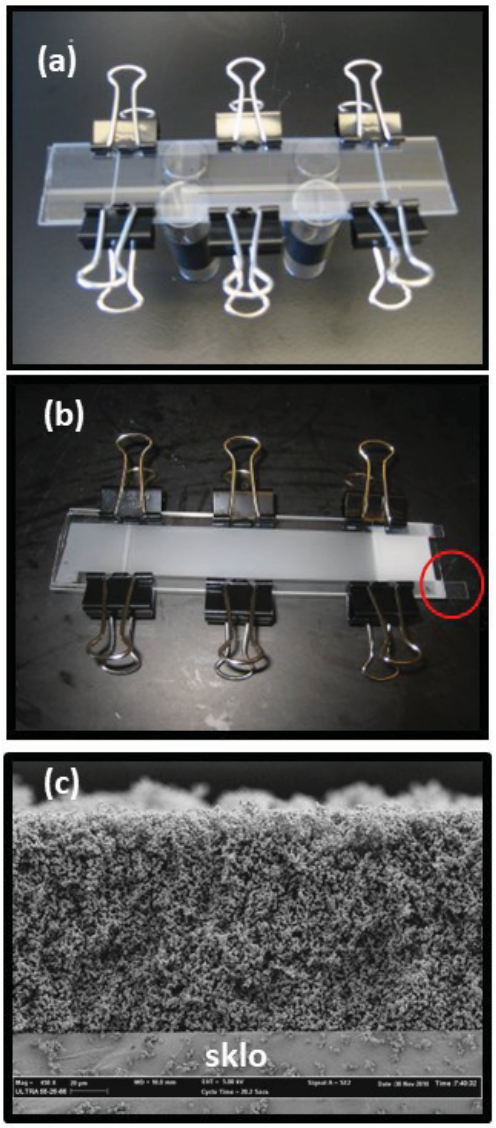


Obr. 3. **Pohled na tenké válcovité monolitické struktury na povrchu MALDI podložky (a) a pohled v optickém mikroskopu shora na monolitické válečky (b)**

připravil ze stejné směsi fotoiniciovanou polymerizační reakcí 10 μm vysoké disky o průměru 3 mm ve formě sestávající ze standartní nerezové MALDI podložky oddělené polyethylenovými páskami od stejně velké skleněné destičky[35]. Na krycí skleněné destičce byla nalepena maska z černě potištěné folie, na níž bylo ponecháno 100 průhledných kruhových ploch o požadovaném průměru 3 mm. Obsah formy byl pak ozařován UV světlem a jeho polymerizace vedla k válcovým strukturám prezentovaným na obr. 3. Ty byly pak použity pro povrchem zesílenou detekci látek v MALDI módu a fungovaly i bez přítomnosti jinak potřebné nízkomolekulární matrice.

4. Rané doby organo-monolitické TLC

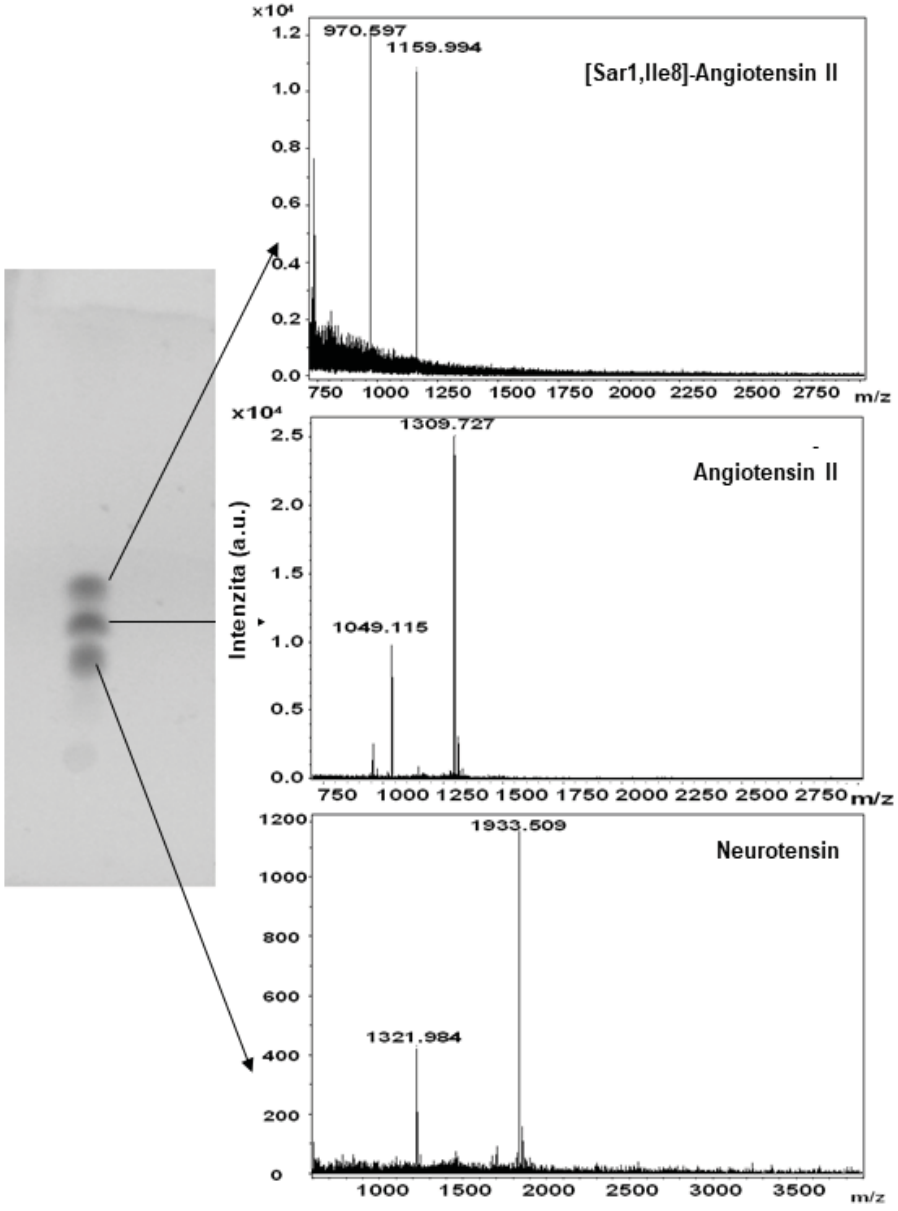
Žádná z „historických“ aplikací polymerních monolitů uvedených v přechozí části však nesloužila skutečné TLC. První vlaštovkou v oblasti monolitické planární chromatografie kombinované s hmotnostní spektrometrií byla v roce 2007 práce Ranii Bakry[36]. Ta připravila poly(butyl-methakrylát-*co*-ethylendimethakrylátovou) vrstvu na povrchu skleněné destičky s použitím jednoduché formy. Jak ukazuje obr. 4, tato forma držená pohromadě kancelářskými sponkami se skládala ze dvou skleněných destiček, mezi nimiž byla na podélných okrajích vložena teflonová páska, jejíž síla definovala tloušťku monolitické vrstvy. Polymerizační směs se do ní plnila působením kapilární síly a polymerizace se iniciovala UV zářením nebo zahříváním na vyšší teplotu. Po skončení polymerizace se uvnitř formy vytvořila bílá monolitická vrstva rovněž ukázaná na obr. 4. Forma se rozebrala tak, že se obě skleněné destičky mechanicky oddělily např. vsunutým nožem. Monolit na skleněné podložce byl pak použit k TLC separacím směsí obsahujících malé molekuly barviv, peptidy, či velké molekuly bílkovin, které byly detegovány hmotnostní spektrometrií v módu MALDI



Obr. 4. **Skleněná forma použitá k přípravě monolitické tenké vrstvy naplněná polymerizační směsí (a) a vzhled po skončení polymerizace (b). Zakroužkovaná část ukazuje teflonový pásek určující tloušťku vrstvy. Skenovací elektronová mikrofotografie vrstev po rozebrání skleněné formy potvrzuje porézní strukturu (c)**

s použitím CHCA matrice. Obr. 5 ukazuje separaci peptidů opatřených kvůli viditelnosti ve vrstvě a přesnému cílení MALDI laseru fluorescaminovou fluorescenční značkou. Vzhledem k přítomnosti značených i neznačených molekul peptidů, spektra obsahují dvě maxima lišící se v molární hmotnosti právě o příspěvek značky. Pro aplikaci matrice byly testovány jak protokoly rozprášení, tak i bodové analýzy, tzv. spottingu. Při tomto procesu byla po aplikaci kapky matricového roztoku pozorována nežádoucí radiální migrace sloučenin v tenké vrstvě. Tato migrace pak rozšířila skvrnu a vedla ke snížení rozlišení. Proto bylo v této studii používáno rozprašování roztoku matrice na povrch vrstvy a zvýšení účinnosti ionizace bylo pravděpodobně důsledkem extrakční funkce matricového roztoku, který zvýšil koncentraci peptidu na povrchu monolitické vrstvy, jak předpokládal již Gusev a spol.[17].

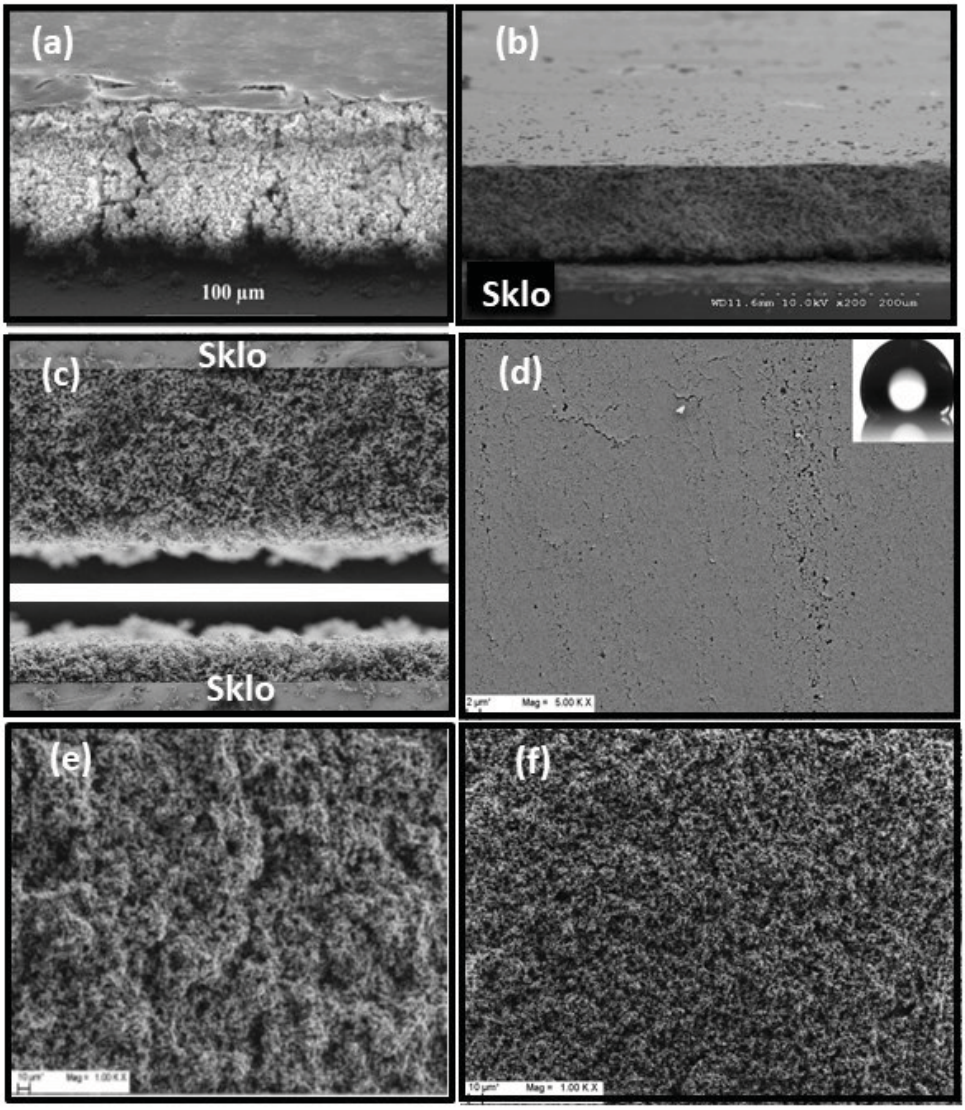
Podobně byly separovány i bílkoviny. Krátká optimalizace ukázala, že nejúčinnější mobilní fází pro tuto separaci byla směs 0,1% trifluoroctové kyseliny (TFA) v 55–60% vodném acetonitrilu. Fluorescenční značení proteinů



Obr. 5. **TLC separace směsi peptidů označených fluorescaminem na 50 μm tenké monolitické vrstvě s použitím mobilní fáze obsahující 0,1 % trifluoroctové kyseliny ve 40% vodném roztoku acetonitrilu a MALDI TOF spektra [Sar1,Ile8]-angiotensinu II, angiotensinu II a neurotensinu získaná ze skvrn ve vrstvě s použitím α-kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny jako matrice**

umožnilo jejich vizualizaci a skenování destičky pomocí fluorodenzitometru. Při značení však vznikla celá řada molekul lišících se počtem navázaných značek, což komplikovalo kvantifikaci. Aby se předešlo tomuto problému, byly separovány a detegovány neznačené bílkoviny. Bod aplikace vzorku byl označen tužkou na vrstvě a hmotnostní skenování probíhalo podél linie vyvolání.

Předchozí studie zahrnovala také přípravu monolitické vrstvy ze směsi sestávající ze styrenu, divinylbenzenu, dekan-1-olu a tetrahydrofuranu, přičemž iniciátorem byl azobisisobutyronitril. Motivací pro použití tohoto polymeru byl předpoklad, že aromatický charakter vrstvy může ovlivnit její hydrofobicitu, a také přispět k selektivitě prostřednictvím π-π interakcí. Tyto monomery ovšem absorbují UV záření, které se proto nedostane k molekulám iniciátoru tak, aby došlo k jeho rozpadu na volné radikály. Proto polymerace vyžadovala tepelnou iniciaci. Takto připravené vrstvy poly(styren-*co*-divinylbenzenu) byly nekvalitní a bylo možné pozorovat řadu defektů, jako jsou trhliny a nestejnoměrná tloušťka. Proto tato polymerní vrstva nebyla ve výše uvedeném projektu použita a bylo



Obr. 6. **Skenovací elektronové mikrofotografie monolitických tenkých vrstev. Poly(butyl-metakrylát-*co*-ethyléndimethakrylátová) vrstva získaná pomocí fotoiniciované polymerizace připravená mezi dvěma nemodifikovanými sklíčky[37] (a), a poly(4-methylstyren-*co*-chlormethylstyren-*co*-divinylbenzenové) vrstvy připravené pomocí tepelně iniciované polymerizace. Příčný řez vrstvou o tloušťce 50 µm připravené mezi dvěma sklíčky, z nichž jedno bylo modifikováno 3-(trimethoxysilyl)propylmethakrylátem (b) a její hladký povrch (d). Vrstva připravená ve formě sestávající ze dvou vinylizovaných skleněných desek lnoucí k oběma sklům (c), její drsný povrch (e) a vrstva s povrchem otevřeným pomocí lepící pásky Scotch® (f)**

třeba provést další experimenty k získání použitelné tenké vrstvy (vide infra).

5. Zvláštnosti přípravy tenkých vrstev

Jak bylo uvedeno výše, monolitická vrstva se tvoří většinou mezi dvěma skleněnými destičkami, většinou mikroskopickými sklíčky. Alternativně, leč méně často, pak mezi skleněnou destičkou a nerezovou MALDI podložkou. Nejjednodušší přístup spočívá v prostém použití nativního skla pro montáž formy. Například Wouters a spol. připravili 100 μm silnou porézní monolitickou vrstvu z poly(butyl-metakrylát-*co*-ethylendimethakrylátu) pomocí fotoiniciované polymerizace směsi monomerů umístěné mezi dvěma neupravenými komerčními mikroskopickými sklíčky[37]. Jejich problém spočíval v tom, že vzniklá vrstva měla hladkou povrchovou „slupku“ s občasnými trhlinami. Vlastnosti slupky se tedy lišily od vlastností vnitřního objemu vrstvy. To je dobře vidět na SEM snímku na obr. 6a. Vysvětlení tohoto jevu je třeba hledat v základech polymerizačních reakcí. Během reakce se monomerní jednotky spojují do řetězce, ve kterém jsou k sobě blíže ve srovnání se vzdáleností mezi nimi v roztoku monomerů. V důsledku toho dochází během polymerace ke smršťování objemu. UV záření, které proniká horní deskou, má největší intenzitu nejblíže u horní desky. Intenzita UV světla pak postupně slábne v důsledku samostínícího působení polymerizační směsi. Rychlost iniciace v blízkosti spodní desky je tedy o něco nižší. V důsledku toho monolit přilne k hornímu sklíčku, zatímco ze spodního sklíčka se uvolňuje již během procesu přípravy. Prostor mezi uvolněným monolitem a spodní skleněnou destičkou je pak vyplněn vzduchem obsahujícím kyslík, polymerizační podmínky jsou odlišné od podmínek v převážné části vrstvy a vzniká nepropustná tenká „slupka“ občas přerušená trhlinami zčásti otevírajícími přístup do vnitřní makroporézní struktury. To vysvětluje i některé anomálie, které tito autoři pozorovali.

Ačkoli to Wouters výslovně neuvádí, je pravděpodobné, že přilnavost monolitu k nativnímu povrchu skla nemusela být příliš silná a monolit se mohl rovněž odlupovat. Aby monolitická vrstva zůstala chemicky navázaná k povrchu skla, byl povrch jedné skleněné destičky ve formě modifikován 3-(trimethoxysilyl)propyl-methakrylátem, jehož dvojné vazby umožnily vznik kovalentní vazby mezi polymerem a povrchem skla. Naproti tomu, druhá skleněná destička funkcionalizovaná nebyla. Důvodem, proč by spodní skleněná deska neměla být funkcionalizována, bylo zabránění přilnutí vrstvy k této desce a usnadnění demontáže formy. Polymerní vrstva připravená za těchto podmínek je znázorněna na obr. 6b a 6d. Není překvapením, že opět vykazovala hladký povrch „slupky“ vzniklé na rozhraní polymeru a skla[38].

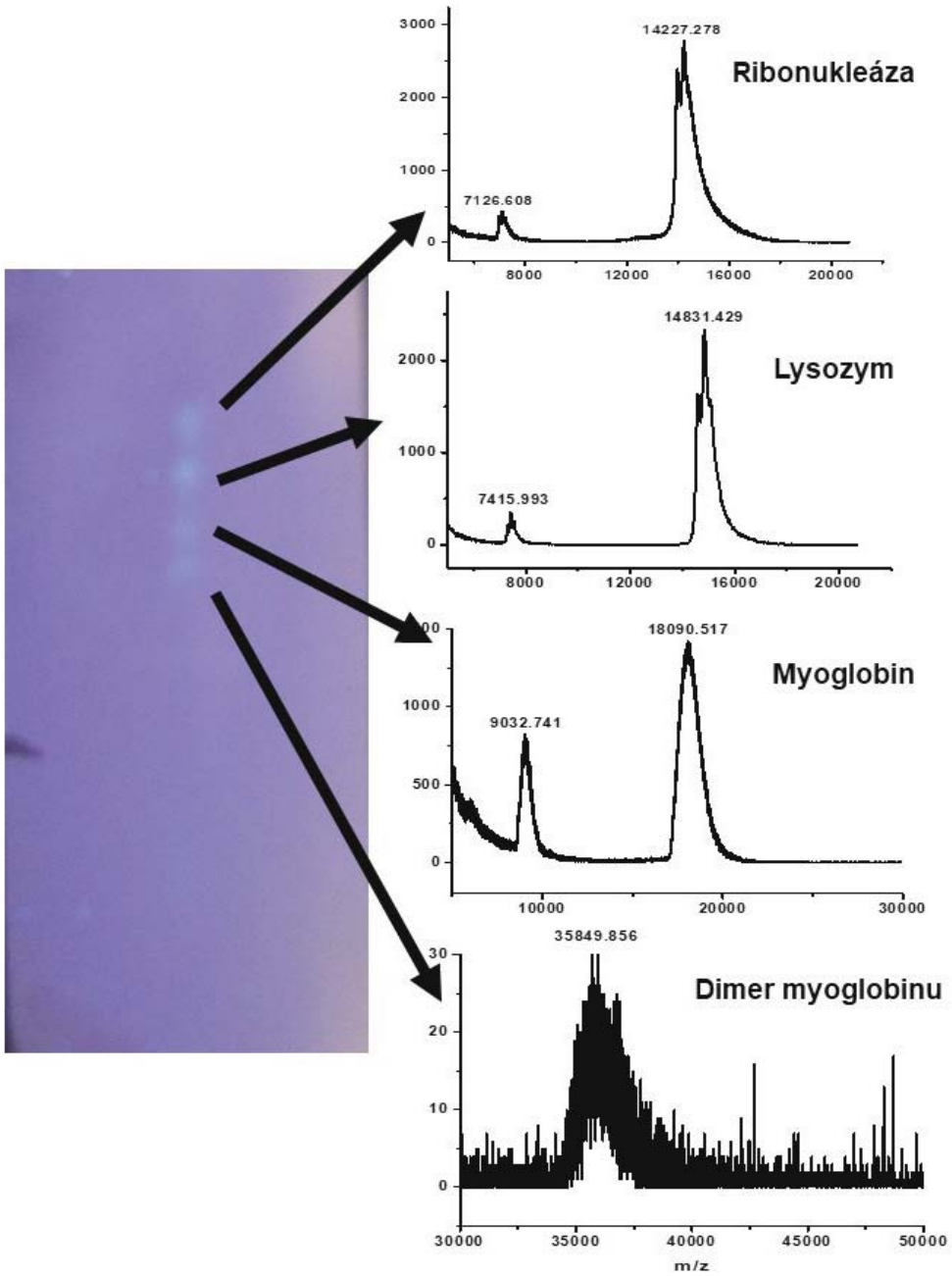
Situace se změnila, když bylo spodní sklo rovněž silylováno. Monolit při oddělování destiček, které bylo obtížné, lnul k oběma z nich, i když s různou pevností. Vrstva na skle, které bylo během ozařování UV světlem vespod, byla tenčí, což lze přičíst utlumení intenzity UV záření průchodem polymerizační směsí. Vznikal totiž gradient pevnosti vrstvy, neboť polymerizace ve spodní části formy probíhala o něco pomaleji. Na morfologii monolitu se však tento úkaz viditelně neprojevil (obr. 6c)[38] a žádná z vrstev neměla hladký povrch.

Přístup s oběma vinylizovanými skly, díky špatně definované tloušťce a drsnému povrchu, který ukazuje obr. 6e, očividně rovněž zcela nefungoval. Bylo proto vhodné se vrátit zpět k použití jedné nemodifikované destičky, na níž se monolitická polymerní vrstva nepřichytila a forma se dala snadno rozložit. Víme ale, že hladká povrchová „slupka“ na monolitu omezovala jeho použitelnost. Tento problém byl vtipně vyřešen pomocí jednoduchého triku. Pavel Levkin na hladký povrch připevnil proužky komerční lepící pásky Scotch® a po jejich odtržení se vrchní polymerní „slupka“ přichycená k pásce homogenně odstranila z celé vrstvy. Tím se odhalila požadovaná relativně hladká a dobře vyvinutá globulární struktura, kterou ukazuje obr. 6f, jejíž aplikace již neměla žádná omezení. Je zřejmé, že podobného účinku by bylo možné dosáhnout s jakoukoliv adhezivní páskou.

Zajímavostí je, že morfologie povrchu se projevila i v jeho zjevné hydrofobnosti. Zatímco u hladkého povrchu byl kontaktní úhel pro vodu pouze 77°, protože postrádal potřebné topografické prvky, „otevřený“ porézní povrch se pak vyznačoval zvýšenou „hrubostí“ a kontaktní úhel se zvýšil na superhydrofobní hodnotu 154°. Tato skutečnost mohla pak být využita pro vývoj vrstev pro dvoudimenzionální TLC.

Původní experimenty s polystyrenovými vrstvami ukázaly, že hlavním problémem byla špatně prodyšná „slupka“[36]. Odstranění této „slupky“, jak je popsáno výše, problém vyřešilo, a bylo možné se věnovat optimalizaci složení polymerizační směsi. Yongqin Lv použila polymerizační směs skládající se z 4-methylstyrenu, chlormethylstyrenu a divinylbenzenu, porogenů toluenu a dodekan-1-olu a iniciátoru azobisisobutyronitrilu[39]. V porovnání s předchozími methakrylátovými vrstvami vykazovaly tyto monolitické vrstvy vyšší hydrofobicitu, což bylo potvrzeno lepší separací a pomalejší migrací peptidů, a to i v mobilní fázi obsahující vyšší procento acetonitrilu. Za zmínku stojí, že příprava byla vysoce reprodukovatelná. Experimenty s osmi různými destičkami a dvojím vzorkováním směsí peptidů prokázaly vynikající opakovatelnost s RSD pro R_f menší než 2,5 %.

Tato vrstva byla také použita pro separaci tří fluorescenčně značených proteinů. Ribonukleasa A, lysozym a myoglobin byly separovány za 15 min do zřetelných skvrn znázorněných na obr. 7. Vzdálenost skvrn od startu se řídila hydrofobicitou jednotlivých bílkovin a MALDI hmotnostní spektra potvrdila identitu značených proteinů. Neočekávaná čtvrtá skvrna s *m*/*z* 34841,579, která měla nejmenší R_f, byla přiřazena dimeru myoglobinu, což je méně známá nečistota v komerční bílkovině. Ačkoli MS signál této skvrny byl slabý kvůli nízké koncentraci dimeru ve vzorku, obsahoval dvě fluorescenční značky, které zvýšily fluorescenci a umožnily jeho vizualizaci. Opako-



Obr. 7. **TLC separace směsi proteinů ribonukleasy A, lysozymu, myoglobinu a dimeru myoglobinu označených fluorescaminem s použitím 50 µm silné poly(4-methylstyren-*co*-chlormethylstyren-*co*-divinylbenzenové) monolitické vrstvy.** Separace byla uskutečněna v mobilní fázi obsahující 1% roztok trifluoroctové kyseliny v 65% vodném acetonitrilu a MALDI-TOF-MS spektra získaná za použití sinapové kyseliny jako matrice

vatelnost R_f byla opět vynikající s RSD menší než 2,4 %.

Další výhoda chemie těchto tenkých vrstev spočívala v jejich schopnosti hypersíťování. Je známo, že Friedelova-Craftsova alkylační reakce katalyzovaná chloridem železitým vytváří velké množství mezopórů a vede k výraznému zvýšení měrného povrchu. Hypersíťování monolitů obsahujících chlormethylstyrenové jednotky bylo zavedeno později[40], a proto se pro rané monolitické tenké vrstvy nepoužívalo. Nicméně, na rozdíl od původní vrstvy, byla její hyperzesítěná obdoba schopna rozdělit i malé molekuly, např. barviva[39].

6. Závěry

Předešlé řádky prokázaly, že monolitické vrstvy mohou skýtat značný potenciál i v separačních metodách odlišných od kapalinové či plynové chromatografie. Planární monolity od svých skromných začátků před dvaceti lety popsaných v tomto referátu dosáhly významného kvalitativního posunu a jejich vývojem se zabývalo několik akademických institucí i průmyslových producentů. Monolitická TLC byla použita pro rychlé a účinné separace jak malých molekul, tak i jejich velkých protějšků, jako jsou např. peptidy a bílkoviny. Významnou výhodou TLC je separace s použitím velice jednoduchých a snadno dostupných prostředků, která nevyžaduje žádné nákladné sofistikované přístroje. Zatímco tento přehled shrnuje rané práce v monolitické TLC oblasti, v jejím příštím pokračování budou popsány výzkumy týkající se pokročilých monolitických tenkých vrstev opět ve spojitosti s MS detekcí. Bude se jednat o vrstvy se zabudovanou MALDI matricí, vrstvy nesoucí na povrchu pórů nanočástice, či o přístupy umožňující snadnou TLC ve dvou dimenzích. Místo bude věnováno i nejnovějším trendům, které zahrnují 3D mikrotisk vrstev a monolitické tenké pásy v mikrofluidních čipech.

Tento referát vznikl za podpory projektu STARSS (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/ 0000465) co-financovaného ERDF.

LITERATURA

1. Švec F.: Chem. Listy *98*, 232 (2004).
2. Hefnawy M. M. a 10 spoluautorů: J. Chromatogr. A *1691*, 463819 (2023).
3. Sýkora D., Peters E. C., Švec F., Fréchet J. M. J.: Macromol. Mater. Eng. *275*, 42 (2000).
4. Zajičková Z., Nováková L., Švec F.: Anal. Chem. *92*, 11525 (2020).
5. Švec F., Deyl Z.: *Capillary Electrochromatography.* Elsevier, Amsterdam 2001.
6. Masini J. C., Švec F.: Anal. Chim. Acta *964*, 24 (2017).
7. Saeed A., Maya A., Xiao D. J., Najam-ul-Haq M., Švec F., Britt D. K.: Adv. Funct. Mater. *24*, 5790 (2014).
8. Tripp J. A., Stein J. A., Švec F., Fréchet J. M. J.: Org. Lett. *2*, 195 (2000).
9. Švec F., Wulff D., Fréchet J. M. J., v knize: *Chiral Separation Techniques* (Subramanian G., ed.), str. 57. Wiley-VCH, New York 2000.
10. Křenková J., Švec F.: J. Sep. Sci. *32*, 706 (2009).
11. Levkin P. A., Eeltink S., Stratton T. R., Brennen R., Robotti K., Yin H., Killeen K., Švec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr. A *1200*, 55 (2008).
12. Lv Y., Qin Y., Švec F., Tan T.: Biosens. Bioelectron. *80*, 433 (2016).
13. Luo J., Ma L., Švec F., Tan T., Lv Y.: Biotechnol. J. *14*, 1900028 (2019).
14. Švec F.: Chem. Listy *114*, 718 (2020).
15. Izmailov N. A., Shraiber M. S.: Farmatsiya *1938*, 1 (1938).
16. Poole C. F.: *Instrumental Thin-Layer Chromatography*. Elsevier, Amsterdam 2015.
17. Gusev A. I., Proctor A., Rabinovich Y. I., Hercules D. M.: Anal. Chem. *67*, 1805 (1995).
18. Gusev A. I., Proctor A., Rabinovich Y. I., Hercules D. M.: Fresenius′ J. Anal. Chem. *366*, 691 (2000).
19. Hauck H. E., Bund O., Fischer W., Schulz M.: J. Planar Chromatogr. - Mod. TLC *14*, 234 (2001).
20. Hauck H. E., Schulz M.: Chromatographia *57*, S/313 (2003).
21. Orinak A., Arlinghaus H. F., Vering G., Orinakova R., Hellweg S.: J. Chromatogr. A *1084*, 113 (2005).
22. Salo P. K., Vilmunen S., Salomies H., Ketola R. A., Kostiainen R.: Anal. Chem. *79*, 2101 (2007).
23. Salo P. K., Salomies H., Harju K., Ketola R. A., Kotiaho T., Yli-Kauhaluoma J., Kostiainen R.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. *16*, 906 (2005).
24. Poole S. K., Poole C. F.: J. Chromatogr. A *1218*, 2648 (2011).
25. Clark J. E., Olesik S. V.: Anal. Chem. *81*, 4121 (2009).
26. Clark J. E., Olesik S. V.: J. Chromatogr. A *1217*, 4655 (2010).
27. Beilke M. C., Zewe J. W., Clark J. E., Olesik S. V.: Anal. Chim. Acta *761*, 201 (2013).
28. Fang X., Olesik S. V.: Anal. Chim. Acta *830*, 1 (2014).
29. Lu T., Olesik S. V.: J. Chromatogr. B *912*, 98 (2013).
30. Rojanarata T., Plianwong S., Su-uta K., Opanasopit P., Ngawhirunpat T.: Talanta *115*, 208 (2013).
31. Lu T., Olesik S. V.: Anal. Chem. *85*, 4384 (2013).
32. Přistoupil T. I., Kramlová M., Kubín M., Špaček P.: J. Chromatogr. A *67*, 362 (1972).
33. Kubín M., Špaček P., Chromeček R.: Collect. Czech. Chem. Commun. *32*, 3881 (1967).
34. Tennikova T. B., Švec F., Belenkii B. G.: J. Liquid Chromatogr. *13*, 63 (1990).
35. Peterson D. S., Hilder E. F., Luo Q., Švec F., Fréchet J. M. J.: Rapid Commun. Mass Spectrom. *18*, 1504 (2004).
36. Bakry R., Bonn G. K., Mair D., Švec F.: Anal. Chem. *79*, 486 (2007).
37. Wouters B., Vanhoutte D. J. D., Aarnoutse P., Visser A., Stassen C., Devreese B., Kok W. T., Schoenmakers P. J., Eeltink S.: J. Chromatogr. A *1286*, 222 (2013).
38. Han Y., Levkin P. A., Abarientos I., Liu H., Švec F., Fréchet J. M. J.: Anal. Chem. *82*, 2520 (2010).
39. Lv Y., Lin Z., Tan T., Švec F.: J. Chromatogr. A *1316*, 154 (2013).
40. Urban J., Švec F., Fréchet J. M. J.: J. Chromatogr. A *1217*, 8212 (2010).

F. Švec *(Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic):* **Neglected Applications of Monolithic Structures: The Beginnings of Planar Chromatography with Mass Spectrometric Detection**

Thin layer chromatography (TLC) has been first reported by N. A. Izmailov and M. S. Schreiber in the late 1930s. The liquid mobile phase usually moves in pores of a layer supported by a rigid plate placed vertically in a simple container, e.g., a beaker. The flow is driven by capillary forces in the pores only and no sophisticated instrumentation is required. The individual components of the mixture are separated based on differences in their affinity for the solid stationary and the liquid mobile phases. The typical format of the stationary phase represents a thin layer coated on a glass, aluminium, or plastic plate. The porous sorbents can be silicon dioxide (silica), aluminium oxide (alumina), and cellulose, held together, e.g., with gypsum. The main advantages of TLC are the ease of carrying out the separations, which can also take place in parallel lines on the same plate, simple equipment, stationary phase for single use, static detection, and the possibility of archiving the separation result in a dried layer. However, the typical 100–250 μm thick layers are not well suited for combination of TLC with mass spectrometry (MS). This has led to the commercialization of ultrathin 10 μm thick monolithic silica layers. Unfortunately, their production was soon discontinued. Alternative solutions to that problem originated from the academic environment. In one approach, the layers were formed from nanofibers prepared by electrospinning. Alternatively, the layers were porous monolithic polymers produced by polymerization *in situ* and a variety of separations of both small and large molecules was demonstrated. The use of MS detection then enabled determination of molecular mass of the compounds in the separated spots. Although preparation of the thin monolithic layers originally appeared straightforward, some unexpected problems had to be solved. This review details issues related to the history of the monolithic TLC and presents approaches leading to well behaving layers suitable for the desired separations.

Keywords: planar chromatography, thin layer chromatography, monolithic layers, separation, mass spectrometry

Acknowledgement
The author gratefully acknowledges the financial support of the STARSS project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) co-funded by ERDF.

Chemické Listy

Referát

www.chemicke-listy.cz

KONJUGÁTY PROTILÁTKA-LÉČIVO, SPOJENÍ VELKÝCH A MALÝCH TERAPEUTICKÝCH MOLEKUL

Bohumil Kratochvíl[a] a Eva Benešová[b]

[a] Ústav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6; [b] Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
bohumil.kratochvil@vscht.cz, eva.benesova@vscht.cz

Došlo 14.3.23, přijato 18.4.23.

Konjugáty protilátka-léčivo (ADC) jsou velmi aktuální terapeutickou skupinou kancerostatik. Tvoří je monoklonální protilátka, nejčastěji typu IgG, na kterou je přes vhodný linker (kovalentní řetězec) konjugována jedna nebo více molekul cytotoxického léčiva. Konjugovaná forma léčiva má výrazně nižší toxicitu než forma volná, kterou v terapii nelze užívat samostatně. Databáze SÚKL registruje zatím 9 ADC přípravků pro použití v onkologii. Vzhledem k tomu, že možných kombinací párů protilátka-léčivo je obrovské množství, do roku 2025 se očekává „boom" této oblasti a až čtyřnásobný nárůst prodejů. V krevní cirkulaci směřuje ADC přípravek specificky k antigenu přítomnému na povrchu nádorové buňky. Linker mezi protilátkou a léčivem musí být stabilní v prostředí krevní cirkulace a teprve až po internalizaci konjugátu být v cílové nádorové buňce zcela degradován nebo zůstat vázaný na léčivo po degradaci proteinové části konjugátu (tzv. štěpitelné nebo neštěpitelné linkery). Následně léčivo způsobí různými mechanismy apoptózu nádorové buňky. Léčiva použitá v ADC přípravcích 2. generace byla až 1000krát toxičtější než chemoterapeutikum doxorubicin a jednalo se především o deriváty auristatinů a maytansinů. V současné 3. generaci vyvíjených konjugátů se zkouší i méně toxická léčiva na bázi kamptothecinů, amanitinů aj. Léčivo s linkerem je k mAb připojeno pomocí různých biokonjugačních metod. Zde se uplatňuje celá škála technik syntetické chemie, přičemž biokonjugace může být buď nespecifická nebo specifická. Konjugovatelné jsou především periferní aminokyseliny protilátky – cystein, lysin, histidin, tyrosin, glutamin a redukované disulfidové můstky mezi dvěma těžkými nebo mezi těžkým a lehkým řetězcem. Pro specifickou konjugaci byly vyvinuty např. techniky glykoinženýrství, založené na N-glykosylaci protilátky na asparaginu (N297). Konjugační techniky, ale i syntéza „nahé" humánní mAb jsou předmětem utajovaného „know-how" řady progresivních firem a laboratoří, které v oblasti ADC přípravků působí.

Klíčová slova: konjugáty protilátka-léčivo, kancerostatika, linker, biokonjugace

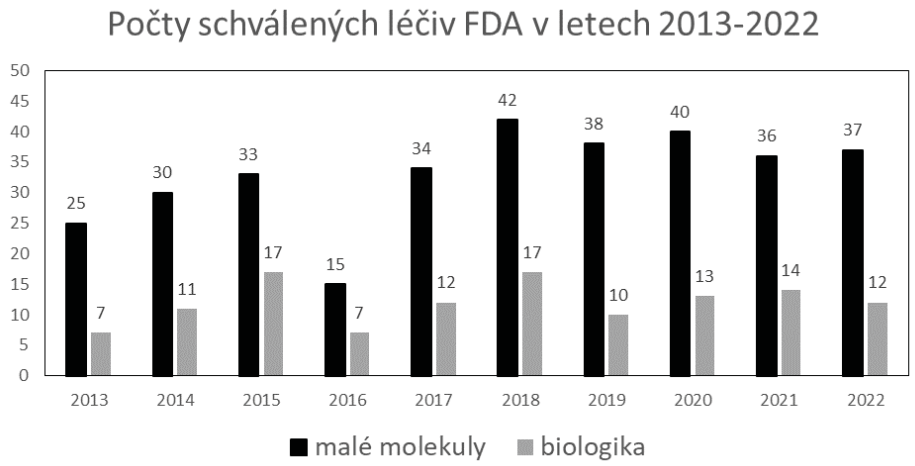
Obsah

1. Úvod
2. Molekulární struktura konjugátů protilátka-léčivo
   2.1. Linker
   2.2. Léčivo
3. Mechanismus terapeutického účinku
4. Příprava konjugátů protilátka-léčivo
   4.1. Biosyntéza proteinové části přípravku
   4.2. Biokonjugace
5. Závěr

1. Úvod

V roce 2022 publikoval Rádl a spol.[1] referát na téma: Budou léčivy budoucnosti malé molekuly nebo biologická léčiva? Odpovědí na tuto otázku je přesvědčení autorů tohoto článku, že do budoucna trh s léčivy opanuje rozumná rovnováha mezi oběma typy. S tím lze určitě souhlasit, ale výše uvedený referát nezahrnuje velmi aktuální terapeutickou skupinu kancerostatik, v nichž se právě synergicky kombinují velké a malé molekuly: konjugáty protilátka-léčivo, angl. Antibody-Drug Conjugates (ADC přípravky). Tento předložený referát lze chápat jako volné pokračování tématu o směřování vývoje léčiv do budoucna.

Proporce mezi každoročně nově schvalovanými léčivy obsahujícími buď pouze malé nebo pouze velké molekuly (bioléčiva) je v poslední dekádě ustálená. Podle statistik FDA (cit.[2]) připadají zhruba dvě třetiny na malé molekuly a jedna třetina na bioléčiva (obr. 1). Dnes se však na trhu velmi dynamicky prosazují kancerostatické ADC přípravky, ve kterých se spojuje jedna velká molekula s malými molekulami do jedné entity. Pokud pomineme teoretické koncepty a úvahy P. Ehrlicha, G. Mathého a dalších o budoucím směřování v léčbě rakoviny před mnoha desítkami let[3], tak historie ADC přípravků začíná v roce 2000, kdy byl firmou Wyeth na trh uveden přípravek Mylotarg pro léčbu leukémie. Ten byl však v roce 2010 dobrovolně v USA stažen firmou Pfizer (ta koupila



Obr. 1. **Poměr mezi terapeutickými malými a velkými molekulami (bioléčivy, biologiky) schválenými FDA za poslední dekádu**

firmu Wyeth v roce 2009), protože se neprokázal jeho terapeutický benefit ve srovnání s chemoterapií (léčba malými molekulami). Nicméně po přezkoumání, při změně dávkovacího režimu, v roce 2017 FDA a v roce 2018 EMA Mylotarg opět registrovaly[4].

O tom, že problematika je vysoce atraktivní, svědčí i připravované speciální číslo časopisu Molecules[5] věnované pouze ADC přípravkům a plánované k vydání v roce 2023.

Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL)[6] uvádí ve své databázi registrovaných léků v ATC skupině L: cytostatika a imunomodulační léčiva, a podskupině L01F: monoklonální protilátky a konjugáty protilátka-léčivo, celkem 55 registrovaných přípravků, z čehož 9 připadá na ADC přípravky (tab. I).

ADC přípravky se historicky dělí do tří generací, přičemž jednotlivé generace se od sebe liší jak typy použitých protilátek (viz dále), tak typy použitých malých molekul a specifitou a způsobem jejich umístění na molekule protilátky[7].

Formulace těchto přípravků jsou vesměs kapalné lékové formy pro injekční nebo infuzní aplikaci. Je evidentní, že možných kombinací párů protilátka-léčivo je obrovské množství a zdaleka ne všechny byly syntetizovány a terapeuticky testovány vzhledem k možným cílům. A to je bezesporu výzva a příležitost pro farmaceutický a biotechnologický výzkum. Vývoj dalších generací směřuje k vyšší homogenitě, stabilitě a účinku ADC přípravků[8].

Tabulka I
Přípravky typu konjugát protilátka-léčivo registrované v databázi SUKL[6 a]

Přípravek	Konjugát protilátka-léčivo	Léčba
Adcetris	brentuximab-vedotin	nádorové onemocnění lymfocytů
Besponsa	inotuzumab-ozogamicin	lymfoblastická leukémie
Blenrep	belantamab-mafodotin	sarkomy kostní dřeně
Enhertu	trastuzumab-deruxtekan	karcinom prsu
Kadcyla	trastuzumab-emtansin	karcinom prsu
Mylotarg	gemtuzumab-ozogamicin	myeloidní leukémie
Padcev	enfortumab-vedotin	karcinom močového měchýře
Polivy	polatuzumab-vedotin	difúzní velkobuněčný nádor B-lymfocytů
Trodelvy	sacituzumab-govitekan	karcinom prsu

[a] Ne všechny přípravky registrované FDA (ta jich schválila zatím 11) jsou registrované i v Evropě (EMA)

2. Molekulární struktura konjugátů protilátka-léčivo

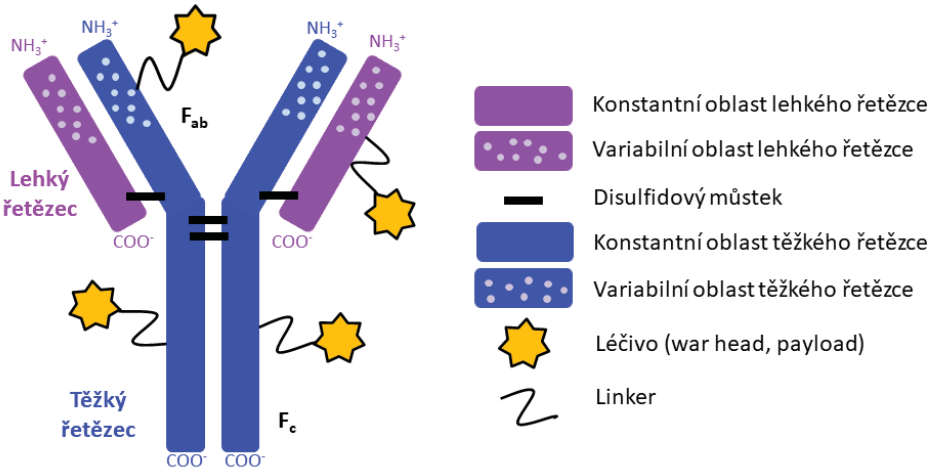
Jak vyplývá z názvu, ADC přípravek obsahuje velkou molekulu rekombinantní monoklonální protilátky (mAb). V současné době obecně ustupují do pozadí chimérní protilátky, obsahující variabilní oblasti původem z jiného organismu než lidského a konstantní oblasti lidského původu. Tento typ protilátky je využit například v přípravku Adcetris[9]. U většiny současných konjugátů se setkáváme s protilátkami humanizovanými (obsahujícími pouze hypervariabilní oblasti ze zvířete), přičemž vývoj směřuje k plně humánním protilátkám. Výsledkem těchto úprav je výrazně nižší imunogenita použitých protilátek, delší biologický poločas a zlepšení efektorových funkcí[10,11]. Tyto protilátky, především isotypy IgG, jsou konjugované v různých místech na lehkém nebo těžkém řetězci s jednou nebo více malými molekulami cytotoxického léčiva (M_r = 300–1000), obr. 2. Reálně se vždy jedná o statistický rozptyl, tzn., že na jednu molekulu mAb v léčivém přípravku průměrně připadá 1–8 molekul léčiva (hodnota DAR, Drug Antibody Ratio). Toto léčivo je v terapii někdy označováno jako bojová hlavice nebo užitečný náklad (war head, payload). Konjugovaná forma léčiva má výrazně nižší toxicitu než forma volná, kterou v terapii nelze užívat samostatně. Kovalentní spojka (konjugace) mezi protilátkou a léčivem se označuje jako linker, což je různě dlouhý a funkčně optimalizovaný molekulární řetězec[12]. Strukturně důležitými parametry ADC přípravků, z nichž každý má vliv na finální účinnost, jsou:

- sekvence aminokyselin v mAb,
- posttranslační modifikace mAb,
- pozice konjugace léčivo-linker na mAb,
- struktura linkeru a jeho stabilita,
- průměrné zatížení mAb léčivem (hodnota DAR).

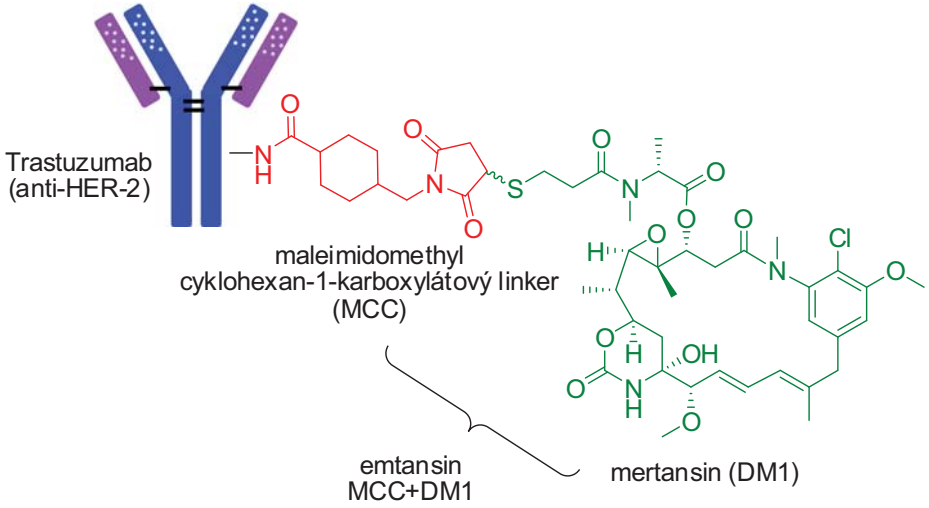
Tyto parametry lze určit na základě studia molekulární 3D struktury ADC přípravku. V současnosti jsou k dispozici dvě zásadní experimentální metodiky: RTG monokrystalová difrakce (SCXRD – Single Crystal X-Ray Diffraction) a hmotnostní spektrometrie (MS). U obou metod je však problémem velikost zkoumaných konjugátů. Proto se někdy strukturní studie omezují na fragmenty mAb a sice F_{ab} a F_c (viz obr. 2). Fragmentace ovšem neznamená omezení interpretace struktury zkoumaného konjugátu.

Nejlépe lze molekulární strukturu ADC přípravků studovat pomocí SCXRD (cit.[13]), a příp. dalšími difrakčními technikami (neutronová či elektronová difrakce[14]), pokud se podaří vykrystalizovat vhodný monokrystal. To ale není vůbec jednoduché a představuje to hlavní omezení difrakčních metod. V databázi PDB (cit.[15]) lze nalézt jen několik struktur celých protilátek, ale tisíce konjugátů léčiva s F_{ab} fragmentem, protože fragmenty krystalizují snadněji. Druhou metodou jsou různé techniky hmotnostní spektrometrie, např. ESI/LC/MS nebo CXL/MS, které asi nejlépe umožňují určit vazebné místo léčiva na protilátce a které jsou pro studium konjugátů nabízeny i komerčně[16]. Přehledovým článkem o současných strategiích LC/MS pro řešení struktury konjugátů je práce Xiaoyu a spol.[17]. Z dalších potenciálních metod přichází v úvahu NMR spektroskopie v roztoku[18] a kryoelektronová mikroskopie[19], ale tyto metody jsou většinou použity v tandemu s MS, protože jejich rozlišení je obecně nižší[20].

Ilustrací strukturní studie konjugátu trastuzumab-emtansin (přípravek Kadcyla[21]) metodou LC-MS je práce Chena a spol.[22] (obr. 3). Trastuzumab obsahuje 88 molekul lysinu a 4 N-koncové skupiny, které lze konjugačními kroky modifikovat. Výsledné konjugáty se skládají z dílčích populací, které se liší počtem připojených léčiv a také umístěním jejich linkerů na trastuzumab. Linker je tvořen



Obr. 2. **Schéma molekulární struktury ADC přípravku protilátka-léčivo**



Obr. 3. **Trastuzumab-emtansin (Kadcyla)**

stabilním thioetherovým můstkem označovaným jako MCC. Kovalentně připojené léčivo se nazývá mertansin (DM1). Pojem emtansin označuje komplex MCC-DM1, tzn. linker-léčivo. V Kadcyle připadá na jednu molekulu trastuzumabu v průměru ~3,5 molekuly léčiva (DAR). Přípravek Kadcyla je vráběn firmou Roche a byl schválen FDA i EMA v roce 2013.

2.1. Linker

Linker je vazebná spojka mezi protilátkou a léčivem (obr. 4). Po intravenózní aplikaci ADC přípravku musí linker vydržet nerozpojený v prostředí krevní cirkulace (působení enzymů). Jinak by došlo k nežádoucímu uvolnění cytotoxického léčiva v necílové tkáni. Teprve v cílové nádorové buňce se linker buď rozpojí (dekonjuguje) nebo zůstane vázaný na léčivo. Linkery proto dělíme na štěpitelné a neštěpitelné. Konstrukce linkeru výrazně ovlivňuje farmakokinetiku a farmakodynamiku, terapeutické parametry a selektivitu ADC přípravku[23].

Štěpitelné linkery jsou konstruovány tak, aby byly stabilní v extracelulárním a nestabilní v intracelulárním prostředí nádorové buňky. Citlivými parametry stability jsou pH, redoxní potenciál nebo přítomnost specifických lysozomálních enzymů. Nejčastějšími typy štěpitelných linkerů[23] jsou:

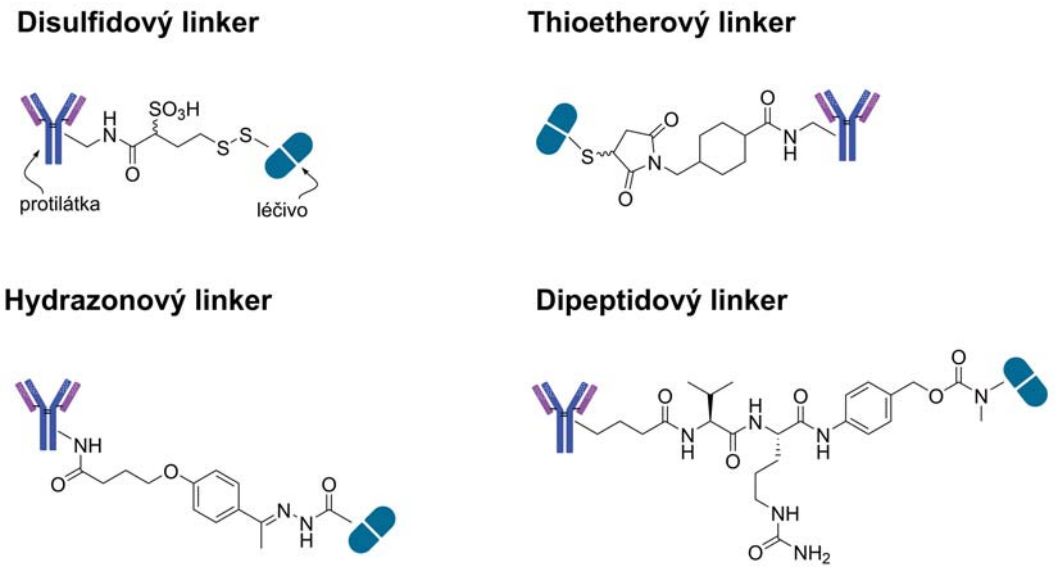
– hydrazonový linker (štěpitelná je hydrazonová vazba hydrolýzou v kyselém intracelulárním prostředí endozomů (pH 5–6) a lysozomů (pH 4,8)).
– disulfidový linker (štěpitelná je disulfidová vazba hydrolýzou při vyšší koncentraci intracelulárního glutathionu (1–10 mmol l^{-1})).
– dipeptidový linker (tento linker je štěpen katepsinem B – lysozomální proteasou, která je nadměrně produkována v některých typech nádorových buněk). Nejúspěšněji jsou štěpeny vazby Val-Cit a Val-Ala.

Dalším typem štěpitelných linkerů, který je však využívaný méně často než linkery uvedené výše, je β-glukuronidový linker, který je rozpoznáván a hydrolyzován β-glukuronidasou.

Příkladem neštěpitelného linkeru je substituovaný stabilní thioetherový řetězec, který odolává proteolytické degradaci, což zajišťuje vyšší stabilitu celého ADC přípravku. Neštěpitelné linkery ovšem musí být konstruovány tak, aby nesnižovaly účinek připojeného léčiva, příp. vhodně modifikovaly jeho vlastnosti. Po degradaci proteinové části ADC přípravku, tedy protilátky, je na vznikající molekule léčivo-linker zachována nejméně jedna aminokyselina, nejčastěji lysin nebo cystein[23]. Jednou z výhod neštěpitelných linkerů je možnost ovlivnění finálních vlastností malé molekuly (léčiva), například jejich hydrofility apod.[24]. Závěrem je nutné zdůraznit, že v současné době nelze jednoznačně soudit, které typy linkerů jsou pro ACD přípravky vhodnější, zda štěpitelné či neštěpitelné.

2.2. Léčivo

Požadavky kladené na malou cytotoxickou molekulu – léčivo, jsou vysoké a je náročné je všechny beze zbytku vyplnit. Jde především o dostatečnou účinnost a rozpustnost ve vodě, schopnost obcházet mechanismy způsobující multilékovou rezistenci, nízkou imunogenitu a možnost vytvoření vhodné chemické vazby (handle) pro připojení k linkeru. Během vývoje ADC přípravků se ukázala jako nevhodná např. chemoterapeutická léčiva na bázi doxorubicinu, methotrexátu, rostlinných Vinca alkaloidů (vincristin, vinblastin, vinorelbin) aj. U druhé generace byly jako cytotoxická léčiva použity hlavně deriváty odvozené od dvou skupin antimitotických látek: auristatinů a maytansinů[12].



Obr. 4. **Štěpitelné a neštěpitelné linkery**

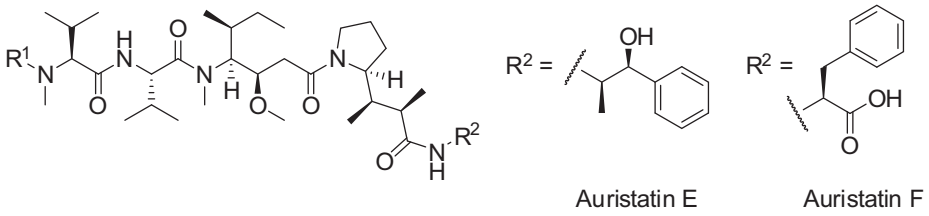
Auristatiny[25] jsou komplexní analoga dolastatinu 10. Tento pentapeptid je metabolitem mořského slimáka zeje ušatého (*Dolabella auricularia*), zvaného mořský zajíc, z kterého může být izolován. Jednotlivé deriváty rozlišujeme písmeny, např. auristatin E, auristatin F, apod. (obr. 5). Kromě toho existují i jejich deriváty, např. monomethylauristatin E, monomethylauristatin F apod. Škála těchto látek je tedy široká. Auristatiny patří mezi tzv. destabilizátory mikrotubulů, neboť svou vazbou rozvracejí potřebnou rovnováhu mezi neustálým přidáváním a odebíráním tubulinových jednotek, a tím zastavují možnost dělení nádorových buněk. To nakonec vede k apoptóze. Tyto látky jsou 100 až 1000krát toxičtější než doxorubicin.

Maytansiny[25,26] (viz obr. 3) neboli deriváty maytansinu, jsou látky odvozené od makrolidu maytansinu, který lze izolovat z kůry afrického keře *Maytenus ovatus*, ale také z mechů a mikroorganismů. Maytansin inhibuje polymeraci tubulinu, což vede k mitotickému bloku a apoptóze. Mechanismus účinku maytansinů je tedy podobný jako u auristatinů, stejně jako jejich toxicita vzhledem k doxorubicinu (200 až 1000krát toxičtější). Klinické zkoušky se samotnými maytansiny nebo auristatiny ukázaly, že jim někdy vzhledem k vysoké systémové toxicitě zcela chybí terapeutické okno, tzn., že minimální léčivá koncentrace je současně i minimální toxickou koncentrací.

Léčiva, která působí jiným mechanismem než jako inhibitory tubulinu, jsou kalicheamiciny nebo duokarmyciny, řazené mezi bakteriální protinádorová antibiotika. V obou případech se jedná o látky způsobující poškození DNA. Příkladem ADC přípravku, obsahujícího tento typ léčiv, může být již výše zmiňovaný gemtuzumab-ozogamicin (Mylotarg)[27,28].

Současný výzkum se zaměřuje na méně toxická léčiva než jsou inhibitory tubulinu. Slibnou skupinou jsou kamptotheciny (kamptothecin a deriváty topotekan, irinotekan a belotekan). Tyto inhibitory topoisomerasy jsou zhruba stejně toxické jako doxorubicin. Příkladem přípravku obsahujícího tento druh malé molekuly je nedávno schválený sacituzumab-govitecan (Trodelvy)[29], viz tab. I.

V dlouhodobé perspektivě budou nepochybně zkoumána všechna léčiva, která nějakým mechanismem ovlivňují buněčný cyklus a vedou k apoptóze. Jedná se např.



Obr. 5. **Auristatiny**[25]

o inhibitory topoisomerasy, inhibitory transkripce, Bcl-xl inhibitory, inhibitory tyrosinkinasy, inhibitory HSP90, inhibitory translace, inhibitory proteazomu, léčiva ovlivňující mitochondriální metabolismus aj.[30]. Testují se amanitiny (obsažené v muchomůrce zelené), pyrrolobenzodiazepiny, indolinobenzodiazepiny[31], thailanstatin, karmafyciny[32] aj.

Pro úplnost lze doplnit, že protilátky je možné použít i k cílení radionuklidů. Příkladem je přípravek Zevalin (ibritumomab-tiuxetan)[33], který reprezentuje první schválenou radioimunoterapii. V tomto případě je využívána myší protilátka cílená na antigen CD20, který je přítomen na B-lymfocytech. Jako radionuklid je v tomto případě využíváno yttrium 90 [^{90}Y]. Na rozdíl od konjugátů s léčivy není u konjugátů s radionuklidy nutná jejich internalizace do buňky a dochází k usmrcení jak buňky cílové (nádorové), na kterou se konjugát vázal, tak buněk v jejím blízkém okolí[33].

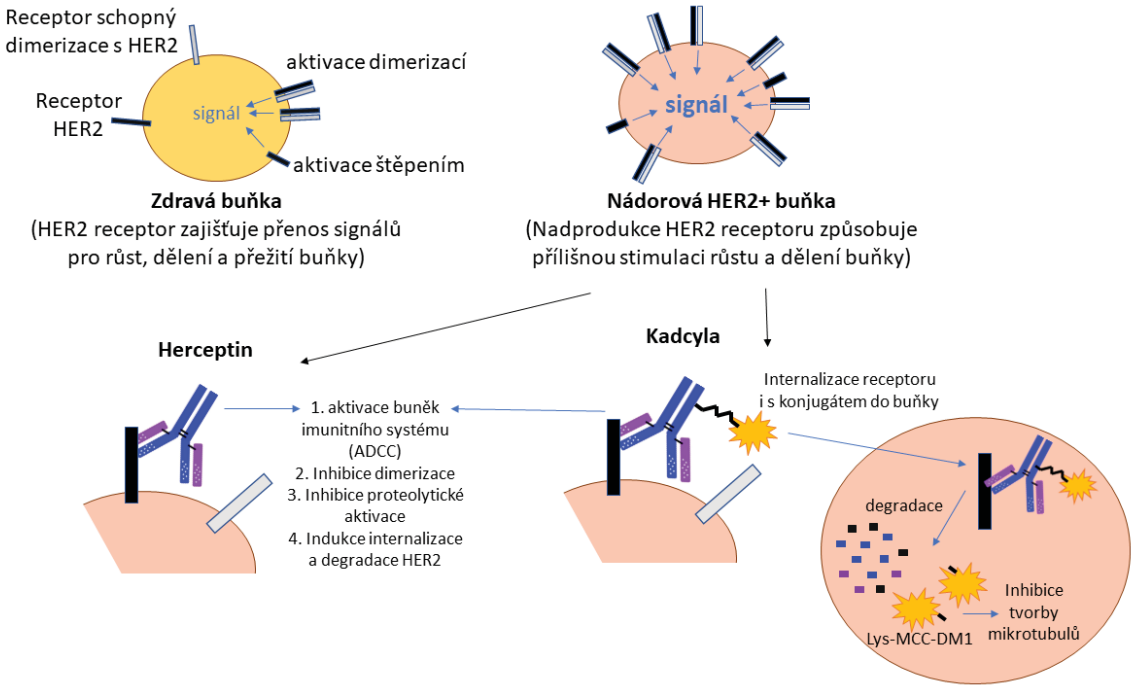
3. Mechanismus terapeutického účinku

Pro pochopení mechanismu účinku ADC přípravků je nutné si uvědomit, že protilátka zde hraje podstatně větší roli, než by se na první pohled mohlo zdát a není jen prostým nosičem léčiva do cílové nádorové buňky. Konjugát synergicky kombinuje vlastnosti cytotoxické malé molekuly léčiva s důležitými vlastnostmi protilátky, jako je např. selektivní vazba k vhodnému antigenu. Zároveň může být tímto způsobem vhodně ovlivněna stabilita, farmakokinetika či schopnost překonat mechanismy lékové rezistence. ADC přípravky jsou tedy skvělou kombinací imunoterapie a chemoterapie.

Z hlediska mechanismu účinku ADC přípravek v krevní cirkulaci specificky směřuje k cílovému antigenu, produkovanému na povrchu nádorových buněk. Cílový antigen protilátky musí mít v nádoru vysokou expresi, být na povrchu nádorové buňky snadno přístupný a konečně musí mít výrazné internalizační vlastnosti (umožňující konjugátu snadný vstup do buňky). Současné terapie míří na 8 různých antigenů a receptorů (viz jejich dělení v databázi SÚKL)[6]. Po internalizaci je protilátka degradována a v nádorové buňce působí léčivo volné nebo ve spojení s neštěpitelným linkerem.

Jako názorný příklad terapeutického účinku volné protilátky v kontrastu s mechanismem účinku ADC přípravku může sloužit dvojice sestávající ze samotné humanizované protilátky používané k léčbě HER-2 pozitivní rakoviny prsu a HER-2 pozitivního metastazujícího karcinomu žaludku (přípravek Herceptin, trastuzumab)[34] a z přípravku obsahujícího obdobnou protilátku, tentokrát však konjugovanou s cytostatickým léčivem (přípravek Kadcyla, trastuzumab-emtansin), viz obr. 6. I u přípravku Kadcyla je hlavní indikací terapie HER-2 pozitivní rakoviny prsu[21]. Pro tyto typy nádorových onemocnění je typická nadprodukce receptoru, který se účastní řady signálních drah ovlivňujících buněčnou proliferaci a apoptózu[35].

Z hlediska terapie je důležitá skutečnost, že není znám žádný extracelulární ligand pro receptor HER-2, který by byl zodpovědný za jeho aktivaci. K té dochází



Obr. 6. **Srovnání mechanismu účinku přípravků Herceptin a Kadcyla**

během jeho dimerizace s některým dalším členem této rodiny receptorů, přičemž dimerizaci indukují právě ligandy těchto receptorů. Druhou možnou cestou vedoucí k aktivaci receptoru HER-2 je odštěpení jeho extracelulární domény. Působením přípravku Herceptin[34], který se specificky váže na extracelulární doménu receptoru HER-2, dochází k zamezení možnosti jeho dimerizace a tím tedy k potlačení signálů směřujících k aktivaci proliferace a inhibici apoptózy. Inhibována je i aktivace receptoru HER-2 odštěpením extracelulární domény. Tím však funkce protilátky (trastuzumab) v přípravku Herceptin nekončí. Fc fragment trastuzumabu je schopen zprostředkovat buněčnou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC), jejíž aktivace vede ke zničení nádorové buňky. Dalším předpokládaným mechanismem působení Herceptinu je jeho vliv na internalizaci HER-2 receptoru a jeho degradaci[34,36].

V přípravku Kadcyla[21] je primární funkcí protilátky její vazba na HER-2 receptor, zároveň však je ale schopná zprostředkovávat všechny terapeutické účinky, které byly zmíněny výše pro Herceptin. Po vazbě ADC přípravku na HER-2 receptor dochází k internalizaci celé molekuly ADC endocytózou do nitra buňky a následně k proteolytické degradaci protilátky v lysozomu. Degradací této proteinové části celého ADC přípravku dochází k uvolnění cytotoxických produktů – katabolitů (primárně molekuly lysin-MCC-DM1), které inhibují tvorbu mikrotubulů (zabraňují polymerizaci tubulinu) a způsobují tedy apoptózu cílové buňky. Přítomná protilátka umožňuje cílený účinek cytotoxické látky pouze v nádorových buňkách, které nadměrně produkují receptor HER-2. Díky nízké permeabilitě nevykazuje katabolit lysin-MCC-DM1 nežádoucí vedlejší účinky.

Srovnání mechanismu účinku obou těchto terapeutik, tedy přípravků Herceptin a Kadcyla, je ilustrováno na obr. 6. Z něj mimo jiné jasně plyne základní rozdíl v působení, zatímco Herceptin do nádorové buňky nevstupuje, konjugát přítomný v přípravku Kadcyla ano.

4. Příprava konjugátů protilátka-léčivo

ADC přípravky zahrnují tři proměnné – protilátku, linker a léčivo a zjevně neexistuje univerzální strategie jejich přípravy. Během vývoje výrobního procesu je nutné se vypořádat s celou řadou otázek, například:

Jak vybrat správnou protilátku? Kde a jak připojit linker k protilátce? Jaký druh linkeru použít? Kolik molekul léčiva připojit? Jak propojit linker a léčivo? Připojit nejdříve linker k léčivu a potom konjugovat s mAb nebo dříve konjugovat linker a mAb a teprve potom na něj připojit léčivo? Jaká je optimální léková zátěž?

Kromě toho je zřejmé, že pro každý ADC přípravek budou odpovědi odlišné. V následujících řádcích budou nastíněny příklady možných strategií syntézy ADC přípravků.

4.1. Biosyntéza proteinové části přípravku

Dříve než je možné přikročit k přípravě ADC přípravku, je nutné vyrobit „nahou“ monoklonální protilátku, což vyžaduje značnou znalost moderních technologií. Podrobný popis všech metod, v současné době využívaných v přípravě chimérních, humanizovaných či plně humánních protilátek, by přesahoval rámec tohoto příspěvku, proto odkazujeme na příslušnou literaturu[37]. Pro představu uvedeme alespoň jeden z možných přístupů, a to propojení hybridomové technologie a genového inženýrství. Na začátku celého procesu je nezbytné vhodným antigenem imunizovat laboratorní zvíře, obvykle myš. Následuje fúze slezinných buněk, schopných produkovat protilátky, s buňkami nádorovými, které vzniklému hybridomu poskytnou schopnost nekonečného dělení. Tato etapa vývoje protilátky je zakončena výběrem hybridomu produkujícího protilátku o požadované specifitě. V této fázi se stále jedná o protilátku plně myšího původu. Pomocí sekvenování je následně možné zjistit pořadí nukleotidů v sekvenci, kterou je tato myší protilátka kódována[11].

V následující fázi je využito skutečnosti, že je známá kompletní nukleotidová sekvence lidského genomu[38]. Metodami genového inženýrství je pak možné připravit kombinovanou nukleotidovou sekvenci, která obsahuje jak části myšího původu, odvozené od sekvence získané hybridomovou technologií, tak části původu humánního[39]. Takto získaná sekvence je vložena do buněk vhodných pro produkci. Nejčastěji jsou využívány buňky z vaječníků křečíka čínského (CHO buňky)[40].

Výše zmiňovaným způsobem je možné získat protilátky chimérní či humanizované. Pro přípravu protilátek plně humánních bylo nutné vyvinout metody ještě sofistikovanější, mezi které patří například metoda fágového displaye či produkce v myších, jejichž genom byl pozměněn tak, aby nebyly schopné produkce myších protilátek, ale pouze protilátek lidských[41].

4.2. Biokonjugace

Následným procesem je biokonjugace (zkráceně konjugace), což je chemická strategie umožňující kovalentní spojení dvou molekul, z nichž alespoň jedna je biomolekula (v případě ADC přípravků monoklonální protilátka). Vývoj těchto metod probíhá již přibližně dvě desetiletí a stále jsou zaváděny techniky nové, které umožňují přesnou kontrolu počtu malých molekul zaváděných do konjugátu a zároveň i míst, ve kterých k vazbě dochází[42,32]. K dispozici je aktuálně mnoho strategických variant a pestrá škála nástrojů syntetické chemie. Hlavní využívané přístupy zahrnují strategie klasické chemické syntézy a moderní metody biologické katalýzy pomocí specificky působících enzymů[43].

Biosyntéza ADC přípravků se potýká s celou řadou specifických problémů, které souvisí mimo jiné se selektivitou procesu. Chemoselektivní modifikace jednoho či více míst na protilátce je tak předmětem „know-how“ řady vývojových a servisních biotechnologických laboratoří,

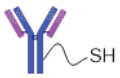
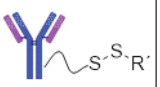
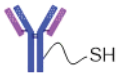
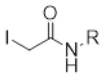
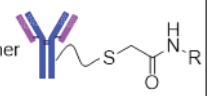
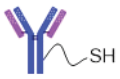
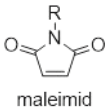
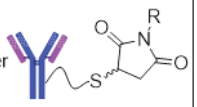
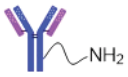
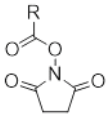
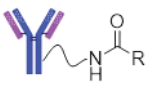
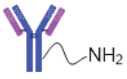
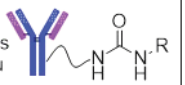
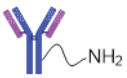
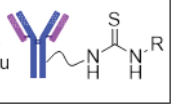
které svoje služby nabízejí na webu: Seattle Genetics, Genentech, ImmunoGen, Regeneron, Abzena, Arco Biosystems, Wuxibiologics, Lonza molecules, Spirogen, Synthon, Medchemexpres aj.

Atraktivními místy pro biokonjugaci na protilátce jsou aminokyseliny situované na vnějším povrchu molekuly proteinu, především tedy aminokyseliny s ionizovatelnou skupinou v postranním řetězci, jako jsou lysin, cystein, histidin nebo tyrosin. Nejčastěji jsou modifikovány skupiny: $–NH_2$, –NH, –SH, –COOH, $–NC(NH_2)_2$ atd. U lysinu může nukleofilní skupina $–NH_2$ například reagovat s elektrofilním *N*-hydroxysukcinimidovým činidlem za vzniku amidu (tab. II)[44]. V tomto případě se jedná o nespecifickou konjugaci, protože molekul lysinů je v protilátce několik desítek (uvádí se, že průměrná protilátka obsahuje cca 80 lysinů) a z toho je přibližně 10 přístupných pro modifikační reakce. Zároveň není možné zaručit, že nebudou modifikovány molekuly lysinů nezbytné pro interakci antigenu a protilátky. Přesto patří tato metodika k jedněm z nejpoužívanějších a byla využita například při přípravě přípravků Besponsa, Mylotarg nebo Kadcyla[43,45].

Jiná syntetická strategie cílí v protilátce IgG1 na čtyři disulfidové můstky tvořené thiolovými skupinami v postranních řetězcích cysteinů, dva spojující lehký a těžký řetězec a dva umístěné v pantové oblasti těžkých řetězců (viz obr. 2). Redukce těchto čtyř můstků, např. tris(2-karboxyethyl)fosfinem (TCEP), generuje osm thiolových skupin, které jsou schopné reagovat např. s maleimidovým linkerem (tab. II), což umožňuje vazbu až osmi molekul léčiva (maximální hodnota DAR = 8). Tato technologie byla využita například při výrobě přípravku Adcetris[43]. Ještě modernějším přístupem je pak produkce protilátek, do jejichž sekvence je pomocí genetické úpravy vnesen nový cystein, který může být cíleně modifikován za vzniku ADC přípravku (THIOMAB)[43,46].

Vzhledem k tomu, že všechny monoklonální protilátky jsou N-glykosylované buď na asparaginu (N297) nebo v jeho nejbližším okolí (jedná se tedy o umístění na Fc fragmentu), tak technika tzv. glykoinženýrství umožňuje

Tabulka II
Modifikace postranních řetězců vnějších cysteinů a lysinů v protilátce[44]

Funkční skupina v postranním aminokyselinovém řetězci	**Činidlo**	**Produkt**
sulfhydrylová (thiolová) skupina Cys 	disulfid	S-S můstek 
sulfhydrylová (thiolová) skupina Cys 	 jodacetamidové činidlo	thioether 
sulfhydrylová (thiolová) skupina Cys 	 maleimid	thioether 
aminoskupina Lys 	 *N*-hydroxysukcinimidový ester (NHS)	amid 
aminoskupina Lys 	O=C=N–R isokyanát	vazba přes močovinu 
aminoskupina Lys 	S=C=N–R isothiokyanát	vazba přes thiomočovinu 

konjugaci s léčivem na sacharidové části protilátky[47]. V tomto případě se jedná o polohově-specifickou konjugaci a její výhody jsou nasnadě – možnost kontroly DAR a heterogenity vznikajícího produktu. Právě v průběhu těchto procesů jsou často využívány vysoce specifické katalytické schopnosti enzymů[43]. Lze zvolit přímou konjugaci léčiva spojeného s linkerem na protilátku nebo nejdříve syntetizovat tzv. bioortogonální vazbu, která je potom funkcionalizována léčivem. Běžným příkladem bioortogonálních reakcí jsou ketonové a aldehydové modifikační reakce[44]. V tomto scénáři se ketonová nebo aldehydová funkční skupina spojí s proteinem pomocí aminooxy skupiny (H_2N–O–) nebo karbohydrazidové skupiny (–C(=O)–NH–NH_2) za vzniku stabilních oximových nebo hydrazonových vazeb.

V předcházejících odstavcích byly představeny jen některé z možných metod biokonjugace. Pro ucelenější výčet a podrobnější popis doporučujeme souhrnné publikace[32,43].

Závěrem popisu technologie ADC přípravků je nutné připomenout, že samotnou syntézou proces nekončí. Výsledný produkt je nutné vhodně purifikovat, aby splňoval požadavky kladené na léčivé přípravky. Vzhledem k rozdílným vlastnostem jednotlivých ADC přípravků bylo vyvinuto jen velmi málo obecných technik pro čištění produktů biokonjugačních reakcí. Používány bývají různé chromatografické techniky (gelová permeační chromatografie, afinitní či ionexová chromatografie, chromatografie s hydrofobní interakcí apod.), obvykle v kombinaci s tangenciální filtrací. V řadě případů je však třeba vyvinout purifikační metody jedinečné pro zvolenou biokonjugační reakci[32,40,48].

5. Závěr

ADC konjugáty představují „boom“ v léčbě rakoviny. V současnosti je ve vývoji asi 200 ADC přípravků a do roku 2025 se očekává jejich až čtyřnásobný nárůst prodejů[49]. To však neznamená konec chemoterapeutik a dalších úspěšných kancerostatik široce používaných v současné terapii. Účelem je léčbu co nejpřesněji zacílit pouze na nádorové buňky a vyhnout se poškození buněk zdravých, tzn. omezit velmi nepříjemné vedlejší účinky. A v tomto ohledu jsou ADC konjugáty významným krokem vpřed. I proto se uvažuje v budoucnu o jejich využití i v dalších indikacích (ateroskleróza, bakterémie apod.)[50]. Vývoj v nejbližší době ukáže, zda naděje vkládané do ADC přípravků budou naplněny.

Seznam zkratek

ADC	Antibody-Drug Conjugate
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
API	Active Pharmaceutical Ingredient
ATC	Anatomicko-terapeuticko-chemická
Bcl-xl	transmembránový protein
CD20	B-lymfocytární antigen CD20
CXL-MS	Chemical Crosslinking-Mass Spectrometry
DAR	Drug Antibody Ratio
DM1	maytansine derivative
ECI-LC-MS	Electrospray-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
F_{ab}	fragment antigen-binding region
F_c	fragment crystallizable region
HER-2	Human Epidermal Growth Factor receptor 2
HSP90	Heat shock protein 90
mAb	monoclonal antibody
MCC	4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexan-1--carboxylate
PDB	Protein Data Bank
SCXRD	Single Crystal X-Ray Diffraction
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TCEP	tris(2-carboxyethyl) phosphine
Val-Cit	valin-citrulin
Val-Ala	valin-alanin

LITERATURA

1. Rádl S., Dammer O., Ridvan L.: Chem. Listy *116*, 471 (2022).
2. https://www.fda.gov/, staženo 20. 1. 2023.
3. Advances in the Pharmaceutical Sciences Series 17. Antibody-Drug Conjugates (Wang J., Shen W.-C., Zaro J. L., ed.) Springer, Berlin 2015.
4. Miletín M.: Klin. Farmakol. Farm. *32*, 32 (2018).
5. https://www.mdpi.com/journal/molecules/special_issues/ADC_Cancer, staženo 30. 1. 2023.
6. https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/, staženo 20. 4. 2023.
7. https://www.biochempeg.com/article/125.html, staženo 5. 3. 2023.
8. Khongorzul P., Ling C. J., Khan F. U., Ihsan A. U., Zhang J.: Mol. Cancer Res. *18*, 3 (2020).
9. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/adcetris-epar-product-information_cs.pdf, staženo 19. 2. 2023.
10. Fu Z., Li S., Han S., Shi C., Zhany Y: Signal. Transduct. Target. Ther. *7*, 93 (2022).
11. Si Y., Melkonian A. L., Curry K. C., Xu Y., Tidwell M., Liu M., Zaky A. F., Liu X.: Chin. J. Chem. Eng. *30*, 301 (2021).
12. Beck A., Goetsch L., Dumontet C., Corvaïa N.: Nat. Rev. Drug Discovery *16*, 315 (2017).
13. Wlodawer A.: FEBS J. *288*, 5786 (2021).
14. Palatinus L., Kratochvíl B.: Chem. Listy *115*, 368 (2021).
15. https://www.rcsb.org/, staženo 23. 1. 2023.
16. https://www.enovatia.com/antibody-drug-conjugate-ms/?gclid=EAIaIQobChMInPenv6zW_AIVAjcYCh1FVQgsEAAYBCAAEgJ0qvD_BwE, staženo 21. 1. 2003.
17. Xiaoyu Z., Shihan H., Chao X., Bo A., Jun Q.: J. Pharm. Anal. *10*, 209 (2020).

18. Orts J., Gossert A. D.: Methods *3*, 138 (2018).
19. Pal S., Ganesan K., Eswaran S.: IUBMB Life *70*, 947 (2018).
20. Singh S. B.: J. Nat. Prod. *85*, 666 (2022).
21. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kadcyla-epar-product-information_cs.pdf, staženo 20. 12. 2022.
22. Chen L., Wang L., Shion H., Yu C., Yu Y. Q., Zhu L., Li M., Chen W., Gao K.: MABS *8*, 1210 (2016).
23. https://adc.bocsci.com/resource/linkers-a-crucial-factor-in-antibody-drug-conjugates.html?gclid=EAIaIQobChMIptboosjg_AIVj9CyCh2OaAATEAAYAiAAEgKpm_D_BwE, staženo 25. 1. 2023.
24. Kovtun Y. a 18 spoluautorů: Cancer Res. *70*, 2528 (2010).
25. Maderna A., Leverett C. A.: Mol. Pharmaceutics *12*, 1798 (2015).
26. https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/maytansinoid, staženo 26. 1. 2023.
27. Bouchard H., Viskov C., Garcia-Echeverria C.: Bioorg. Med. Chem. Lett. *24*, 5357 (2014).
28. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mylotarg-epar-product-information_cs.pdf, staženo 9. 3. 2023.
29. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trodelvy-epar-product-information_cs.pdf, staženo 9. 3. 2023.
30. Conilh L., Sadilkova L., Viricel W., Dumontet C.: J. Hematol. Oncol. *16*, 3 (2023). doi.org/10.1186/s13045-022-01397-y.
31. Baath S., Laws M., Rahman K. M.: Molecules *26*, 2943 (2021).
32. Kostova V., Désos P., Starck J.-B., Kotschy A.: Pharmaceuticals *14*, 442 (2021).
33. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zevalin-epar-product-information_cs.pdf, staženo 14. 2. 2023.
34. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/herceptin-epar-product-information_cs.pdf, staženo 20. 12. 2022.
35. Neves H., Kwok H. F.: BBA Clin. *3*, 280 (2015).
36. Gutierrez C., Schiff R.: Arch. Pathol. Lab. Med. *135*, 55 (2011).
37. https://www.proteogenix.science/scientific-corner/antibody-production/how-are-mouse-monoclonal-antibodies-humanized-current-approaches-and-limitations/, staženo 31. 1. 2023.
38. https://www.hugo-international.org/history/, staženo 14. 2. 2023.
39. https://www.sinobiological.com/resource/antibody-technical/chimeric-monoclonal-antibody, staženo 14. 2. 2023.
40. Matsuda Y.: J. Sep. Sci. *45*, 27 (2022).
41. https://medium.com/techskill-brew/antibody-engineering-fully-human-monoclonal-antibodies-part-3-b7d87d45aab8, staženo 5. 3. 2023.
42. Stephanopoulos N., Francis, M. B.: Nat. Chem. Biol. *7*, 876 (2011).
43. Tsuchikama K., An Z.: Protein Cell *9*, 33 (2018).
44. https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Reactions/Introduction_to_Bioconjugation, staženo 1. 2. 2023.
45. Chen Y., Kim M. T., Zheng L., Deperalta G., Jacobson F.: BioconjugChem *27*, 2037 (2016).
46. https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/ra/c7ra04606e), staženo 22. 3. 2023.
47. https://www.acrobiosystems.com, staženo 1. 2. 2023.
48. https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/pharmaceutical-and-biopharmaceutical-manufacturing/downstream-processing/tangential-flow-filtration-antibody-drug-conjugate-manufacturing, staženo 9. 3. 2023.
49. Gavenda A.: Chemagazín *XXXII (5)*, 8 (2022).
50. Pettinato M. C.: Antibodies *10*, 42 (2021).

B. Kratochvíl[a] and E. Benešová[b] *([a] Department of Solid State Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague, [b] Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology Prague, Czech Republic):* **Antibody-Drug Conjugates, the Combination of Large and Small Therapeutic Molecules**

Antibody-drug conjugates are a promising therapeutic class of cytostatic agents. They consist of a monoclonal antibody, usually of the IgG type, to which one or more molecules of a cytotoxic drug are conjugated via a suitable linker (covalent chain). The conjugated form of the drug has significantly lower toxicity than the free form, which cannot be used alone in therapy. The Czech State Institute for Drug Control database has so far registered 9 antibody-drug conjugates for use in oncology. Given the vast number of possible combinations of antibody-drug pairs, a boom in sales is expected by 2025. In the blood circulation, the antibody-drug conjugate specifically targets the antigen expressed on the surface of the tumour cell. The linker between the antibody and the drug must be stable in the blood circulation environment and only be completely degraded in the target tumour cell after internalization of the conjugate or remain bound to the drug after degradation of the protein part of the conjugate (the so-called cleavable or non-cleavable linkers). Subsequently, the drug causes apoptosis of the tumour cell by various mechanisms. The drugs used in the 2nd generation antibody-drug conjugates were up to 1,000 times more toxic than the chemotherapeutic drug doxorubicin and were mainly auristatin and maytansine derivatives. Less toxic drugs based on camptothecins, amanitins, etc. are also being tested in the current 3rd generation of conjugates under development. The linker drug is attached to the antibody by various bioconjugation methods. Here, a range of synthetic chemistry techniques are applied, and bioconjugation can be either non-specific or specific. In particular, the peripheral amino acids of the antibody – cysteine, lysine, histidine, tyrosine, glutamine and reduced disulfide

bridges between the two heavy chains or between the heavy and light chains – are conjugated. For a specific conjugation, e.g. glycoengineering techniques based on N-glycosylation of antibody on asparagine (N297) have been developed. Conjugation techniques, as well as the synthesis of "naked" human antibodies are the subject of classified "know-how" of a number of commercial progressive companies and laboratories.

Keywords: antibody-drug conjugates, cancerostatics, linker, bioconjugation

Chemické Listy

Původní a metodické práce

www.chemicke-listy.cz

APLIKACE INTELIGENTNÍ MEMBRÁNOVÉ SEPARACE

Jan Stárek[a,b], Zoran Zwaan[a,b], Martin Zlámal[a], Martin Paidar[a], Aleš Černín[b], Lukáš Malý[d], Jan Kinčl[d] a Vladimír Sýkora[c]

[a] *Ústav anorganické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice,* [b] *New Water Group s.r.o., Nádražní 312, 407 56 Jiřetín pod Jedlovou,* [c] *Ústav technologie vody a prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice,* [d] *Alad CZ s.r.o., Pod Holým vrchem 358, 470 01 Česká Lípa, Česká republika*
starekj@vscht.cz

Recyklace vody a výroba pitné vody se stává poslední dobou velmi aktuálním tématem. Tlakové membránové procesy umožňují produkovat vodu s kvalitou vyšší či srovnatelnou s produktem konvenčně využívaných procesů jako je například písková filtrace a flotace. Provozování membránových technologií ovšem vyžaduje odbornou znalost. Správnou analýzou vstupních parametrů vody a kontrolou provozních parametrů procesu je technologie schopná dosáhnout vysoké návratnosti s velmi vysokou kvalitou produktu za současné nízké spotřeby energie. Inteligentní software IQ-MINT dokáže v reálném čase analyzovat tyto parametry a je schopný okamžitě měnit provozní parametry technologie s důrazem na získání co nejvyšší návratnosti a s ohledem na bezpečnost provozu a životnost membrány. Software byl validován na příkladu čištění reálné povrchové vody v jednotce UF60-MINT. Při zapnutí software upravoval provozní parametry technologie tak, aby na úkor návratnosti s důrazem na bezpečnost provozu prodloužil životnost membrány a snížil spotřebu chemikálií a energie. Použití softwaru IQ-MINT tedy umožňuje autonomní funkci technologie na jakémkoliv typu vstupní vody bez nutnosti stálé kontroly a regulace obsluhou.

Klíčová slova: membránová technologie, membránová separace, membrána, ultrafiltrace, inteligentní řízení, permeabilita, transmembránový tlak, inteligentní software

Obsah

1. Úvod
   1.1. Membránové tlakové procesy
   1.2. Ultrafiltrace
   1.3. Konfigurace ultrafiltrace
   1.4. Čištění membrány
   1.5. Samooptimalizace
   1.6. Využití inteligentního řízení samooptimalizace v procesu ultrafiltrace
2. Praktická část, výsledky
   2.1. Optimalizace na reálném typu vod
   2.2. Nastavení hodnot in-line koagulace
   2.3. Validace inteligentního řízení v reálné aplikaci
   2.4. Hodnocení funkce softwaru IQ-MINT
3. Závěr

1. Úvod

Aplikací moderní membránové technologie je možno eliminovat nedostatky konvenčních separačních technologií nebo umožnit realizaci jejich požadovaných optimalizací. Konkrétně se jedná např. o zvýšení výtěžku produkce vody, snížení množství použitých chemikálií, snížení energetické náročnosti procesu, snížení nároků na rozměry technologie, zvýšení stability procesu i produktu a zejména jeho kvality.

V současnosti moderní membránové technologie již zcela nahradily původně uplatňované konvenční postupy nebo je efektivně doplňují do integrovaných technologických celků jako další procesní stupeň, s cílem zvýšení jejich účinnosti a produkované kvality. Díky širokému spektru separačních vlastností různých typů membrán tyto technologie nabízí širokou škálu využití v konkrétních aplikacích[1]. Ve vodohospodářství nachází uplatnění zejména při výrobě pitné vody z povrchových či podzemních zdrojů, z brakických a mořských vod, při recyklaci odpadních vod, nebo při dočištění odpadních komunálních i průmyslových vod jako terciární stupeň čistíren odpadních vod. Jejich většímu aplikačnímu rozšiřování a stabilnímu, provozně bezpečnému a efektivnímu provozu často brání dodržení předepsaných provozních a operačních podmínek[2]. To je přímo závislé na kvalitě a odpovědném přístupu provozovatele včetně nedostatku kvalifikované obsluhy na pracovním trhu. Budoucí směr, jak tyto provozní nedostatky účinně řešit, je opatření membránové technologie softwarem s umělou inteligencí, která by uměla autonomně reagovat na variabilitu nátoku a systematicky upozorňovat obsluhu na eliminaci technologických rizik[1].

1.1. Membránové tlakové procesy

Membránové tlakové procesy umožňují pomocí gradientu tlaku, jako hnací síly, účinnou separaci jednotlivých složek z nátoku podle funkčního typu použité membrány. Tato hnací síla se nazývá transmembránový tlak (TMP). Produktem membránové filtrace je tzv. permeát, představující filtrát a zbytek filtrace tzv. retentát, představující koncentrát složek neprocházejících skrze membránu. Kromě efektivní separace látek umožňují také fyzikální dezinfekci vod bez použití chemických činidel, protože jsou schopny odstranit některé bakterie a viry. Podle velikosti hnací síly a typu použité membrány lze tlakové membránové procesy rozdělit na mikrofiltraci (MF), ultrafiltraci (UF), nanofiltraci (NF) a reversní osmózu (RO). Mikrofiltrace a ultrafiltrace separují složky na základě sítového efektu, kdežto nanofiltrace s reversní osmózou využívají separace látek na základě rozpustnostně-difuzního mechanismu[1,2]. Tato studie se bude nadále zabývat pouze ultrafiltrací.

1.2. Ultrafiltrace

Velikost pórů v ultrafiltrační membráně je dostatečná k zachycení nerozpuštěných látek, makromolekulárních látek, koloidů, bakterií a většiny virů. Ionty anorganických solí nejsou ultrafiltrací separovány. Intenzita toku skrze membránu je pak přímo úměrná velikosti působícího tlakového rozdílu, který odpovídá daným tlakům na jednotlivých stranách membrány[1]:

$$J_\mathrm{P} = \frac{1}{A}\frac{\mathrm{d}V_\mathrm{P}}{\mathrm{d}\tau} = \frac{Q_\mathrm{P}}{A} \quad \left[\mathrm{dm^3 \cdot m^2 \cdot h^{-1}}\right] \tag{1}$$

kde J_P je intenzita toku permeátu, A je aktivní plocha membrány, V_P je proteklý objem permeátu a t je čas. Q_P je pak objemový tok permeátu za jednotku času.

Transmembránový tlak (TMP) je definován jako rozdíl mezi průměrným tlakem v nástřiku p_F a retentátu p_R a tlakem permeátu p_P. TMP je hnací silou toku membránou a používá se k indikaci znečištění membrány[1]:

$$\mathrm{TMP} = \frac{p_\mathrm{F} + p_\mathrm{R}}{2} - p_\mathrm{P} \quad \left[\mathrm{bar}\right] \tag{2}$$

Dalším důležitým faktorem popisujícím tok membránou je permeabilita P. Permeabilita určuje specifický tok membránou neboli velikost hnací síly potřebné k vyvolání daného toku permeátu na jednotku plochy povrchu membrány. Permeabilita klesá ve vazbě na stupeň znečištění membrány[1]:

$$P = \frac{J_\mathrm{P}}{\mathrm{TMP}} \quad \left[\frac{\mathrm{dm^3}}{\mathrm{m^2 \cdot h \cdot bar}}\right] \tag{3}$$

V membránové terminologii se k vyjadřování permeability využívá jednotka LMH/bar, která vyjadřuje výše uvedenou jednotku permeability.

Z hlediska udržitelnosti celkového procesu filtrace se sleduje parametr zvaný „Recovery“, nebo návratnost, regenerace či výtěžek, který určuje, kolik procent objemu nátoku proteče membránou do permeátu. Obecně tento parametr určuje celkovou účinnost systému. Provoz se zvýšenou výtěžností však může mít za následek zvýšení rychlosti znečištění, zvýšení četnosti mechanického a chemického čištění a tím snížení životnosti membrány[1]:

$$R = \frac{V_\mathrm{P} - V_\mathrm{BW}}{V_\mathrm{F}} \cdot 100\ \% \tag{4}$$

kde V_F je objem proteklého nátoku a V_BW je objem vody použité ke zpětnému proplachu. Všechny veličiny se počítají za minimální časové období jednoho filtračního cyklu[1,3,4].

Často využívanou veličinou je hodnota P_{20}, která vyjadřuje hodnotu permeability přepočítanou na odpovídající hodnotu při 20 °C. Tento přepočet se využívá hlavně z důvodu lepší orientace v naměřených hodnotách permeability za rozdílných teplot. P_{20} lze vyjádřit následující rovnicí[1]:

$$P_{20} = \frac{P \cdot \eta_\mathrm{T}}{\eta_{20\,^\circ\mathrm{C}}} \quad \left[\frac{\mathrm{dm^3}}{\mathrm{m^2 \cdot h \cdot bar}}\right] \tag{5}$$

kde η_T značí viskozitu vody při měřené teplotě a $\eta_{20\ ^\circ\mathrm{C}}$ viskozitu vody při 20 °C.

1.3. Konfigurace ultrafiltrace

Proces ultrafiltrace může být provozován ve dvou základních režimech, a to v režimu „dead-end“ a v režimu „cross-flow“. Tyto anglické termíny představují zavedenou terminologii v problematice membránových procesů, proto bude těchto výrazů využíváno i v následujícím textu.

Nejčastěji využívaným uspořádáním toku je režim „cross-flow“, při kterém, na rozdíl od klasické filtrace, proudí nástřik velkou rychlostí podél povrchu membrány. Permeát prochází membránou a je odváděn v kolmém směru vůči povrchu membrány, naopak zbylý nástřik je odváděn podélně ve formě tzv. retentátu. Nedochází tak k významné akumulaci filtrované složky na povrchu membrány a k tvorbě filtračního koláče (filmu), protože nástřik kolem membrány proudí vysokou rychlostí a filtrační koláč je proudem strháván do retentátu. Retentát je buď odváděn do dalšího stupně nebo vracen do nástřiku k recirkulaci. Při režimu „dead-end“ proudí nástřik kolmo na povrch membrány. V tomto režimu dochází k akumulaci filtrované složky na povrchu membrány, což přispívá k růstu filtračního koláče na membráně, a tím i k poklesu permeability. Tento režim je možné využít např. při filtraci méně znečištěných vod[5,6].

1.4. Čištění membrány

Příčinou poklesu intenzity toku filtrovaného média membránou v průběhu filtrace je soubor jevů probíhajících na povrchu membrány a uvnitř jejich pórů. V případě, kdy je velikost částic separované složky srovnatelná s velikostí pórů, může docházet k jejich blokování, čímž dochází k postupnému zanášení povrchu membrány a jevu tzv. koncentrační polarizace (obr. 1). Koncentrace částic na povrchu membrány může dosahovat až takových hodnot, kdy dojde k vytvoření tzv. gelové vrstvy (gelová polarizace). Je-li velikost separovaných částic menší než velikost pórů membrány, může naopak docházet k vzájemným interakcím částice – povrch póru, jako je např. adsorpce.

Koncentrační polarizace a adsorpce částic na povrchu póru jsou děje vratné. Naopak gelová polarizace je děj nevratný a membrána musí být vyměněna.

V průběhu technologického procesu ultrafiltrace dojde dříve nebo později k postupnému snížení průtoku permeátu k nepřípustným hodnotám (hlavně z hlediska efektivity a tím i ekonomické výhodnosti procesu). Z tohoto důvodu je nutné membrány pravidelně čistit nebo aktivně předcházet jejich rychlému zanášení. V praxi se využívají dva typy metod intenzifikace procesu, a to metody vyžadující přerušení procesu, jako je např. zpětné promývání a chemické čištění, a metody, které přerušení procesu nevyžadují, např. předúprava vstupní vody[2,6,7].

1.5. Samooptimalizace

Prvním stupněm inteligentního řízení každého membránového provozu je jeho automatizace. Řízení pomocí PID „proportional-integral-derivative“ regulátoru je standardní proces řízení průmyslových strojů a zajišťuje tak jeho automatizaci. Využití PID regulátoru je jedna z nejčastěji využívaných forem regulace řízených veličin. PID regulátor se skládá ze tří složek:

– proporcionální – P – určuje reakci regulátoru na velikost regulační odchylky,
– integrační – I – určuje reakci regulátoru na dobu trvání regulační odchylky,
– derivační – D – určuje reakci regulátoru na rychlost změny hodnoty regulační odchylky.

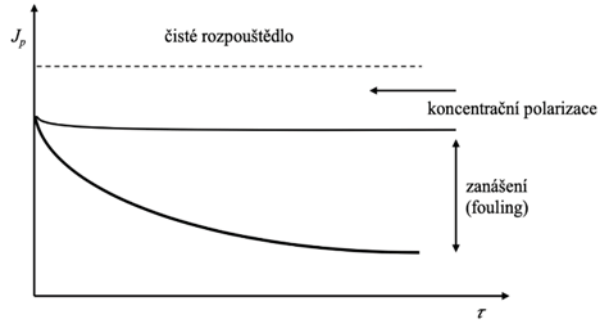
Charakteristickým rysem PID regulátoru je schopnost využívat všechny tři regulační členy, tedy proporcionální, integrální a derivační vliv na výstupu z regulátoru k optimální a co nejpřesnější regulaci procesu. Blokové schéma na obr. 2 zobrazuje princip PID regulace. Zobrazuje PID regulátor, který nepřetržitě počítá hodnotu regulační odchylky $e(t)$ jako rozdíl mezi požadovanou nastavenou hodnotou $r(t)$ a měřenou výstupní proměnnou hodnotou $y(t)$; $e(t) = r(t) – y(t)$ a provede opravu dle proporcionální, integrální a derivační podmínky. Regulátor se snaží odchylku v průběhu času minimalizovat úpravou řídicí proměnné $u(t)$ změnou stavu regulačního členu na novou hodnotu určenou váženým součtem řídicích členů[8].

Člen P je tedy přímo úměrný aktuální hodnotě odchylky $e(t)$. Pokud je chyba velká, bude regulační výstup úměrně velký při použití faktoru zesilovací konstanty K_p. Samotné použití proporcionálního řízení bude mít za následek chybu mezi nastavenou hodnotou a procesní hodnotou, protože regulátor vyžaduje chybu pro generování odezvy proporcionálního výstupu. V podmínkách procesu v ustáleném stavu je dosaženo rovnováhy s ustáleným „offsetem“ odchylky $e(t)$ (cit.[8–10]).

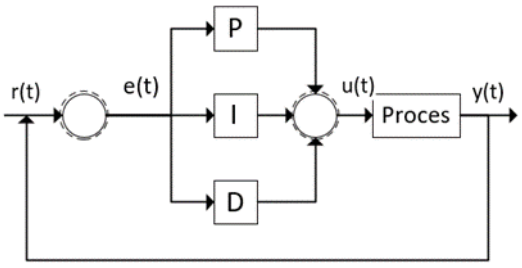
Člen I zohledňuje minulé hodnoty regulační odchylky $e(t)$ a integruje je dále v čase. Pokud zde existuje zbytková odchylka po aplikaci proporcionálního řízení, integrální člen se snaží eliminovat zbytkovou odchylku přidáním regulačního efektu v důsledku historické kumulativní hodnoty regulační odchylky. Ve chvíli, kdy je tato chyba odstraněna, integrální člen přestane narůstat. To bude mít za následek zmenšování proporcionálního vlivu se snižující se odchylkou, což však bude kompenzováno rostoucím integrálním členem.

Člen D slouží jako odhad budoucího trendu regulační odchylky $e(t)$ na základě aktuální rychlosti její změny. Čím je změna rychlejší, tím se zvyšuje regulační nebo tlumící účinek.

Vyvážení všech efektů jednotlivých členů je dosaženo laděním smyčky pro vytvoření optimální funkce ovládání. Ladicí koeficienty (níže uvedeny jako K) jsou odvo-



Obr. 1. **Závislost intenzity toku membránou na čase; znázornění koncentrační polarizace a zanášení membrány,** převzato z cit.[1]



Obr. 2. **Schéma funkce PID regulátoru**

zeny vždy pro konkrétní řídicí aplikaci, protože závisí na charakteristice odezvy kompletní smyčky vně regulátoru. Koeficienty jsou závislé na chování měřicího čidla koncového regulačního prvku (např. regulačního ventilu), případných zpožděních řídicích signálů a na samotném procesu. Přibližné hodnoty koeficientů lze obvykle zpočátku zadat s odvozením od typu aplikace a zpřesňují se v průběhu procesu po obdržení prvních dat[8,10].

Funkce PID regulátoru je popsána dle následující rovnice (*6*) (cit.[8]):

$$u(t) = K_p e(t) + K_i \int_0^t e(\tau)\mathrm{d}\tau + K_d \frac{\mathrm{d}e(t)}{\mathrm{d}t} \qquad (6)$$

kde K_p, K_i a K_d označují všechny nezáporné koeficienty, proporcionální, integrální a derivační člen (označované jako P, I a D). Standardně jsou tyto členy vyjadřovány koeficientem K_p ve tvaru, $K_i = K_p/T_i$ a $K_d = K_p T_d$. Výhoda tohoto tvaru je, že T_i a T_d mají srozumitelný fyzikální význam, protože reprezentují integrační a derivační čas. $K_p T_d$ je tedy časová konstanta, se kterou se regulátor pokusí přiblížit nastavené hodnotě a K_p/T_i určuje, jak dlouho bude regulátor tolerovat výstupní hodnotu nad nebo pod nastavenou vstupní hodnotou. Rovnice PID regulátoru tedy přejde do následujícího tvaru[8]:

$$u(t) = K_p \left(e(t) + \frac{1}{T_i} \int_0^t e(\tau)\mathrm{d}\tau + T_d \frac{\mathrm{d}e(t)}{\mathrm{d}t} \right) \qquad (7)$$

Přestože má PID regulátor tři regulační členy, některé aplikace umožňují k zajištění vhodného řízení pouze jeden nebo dva členy. Toho je dosaženo nastavením nepoužitých parametrů na nulu a regulátor se následně nazývá PI, PD, P nebo I regulátor v nepřítomnosti jiných regulačních akcí. PI regulátory jsou poměrně běžné v aplikacích, kde by derivační akce byla citlivá na šum měření, ale integrální člen je často potřebný k tomu, aby systém dosáhl své cílové hodnoty[8–10].

1.6. Využití inteligentního řízení samooptimalizace v procesu ultrafiltrace

V rámci řešení výzkumného projektu s názvem Membránové inteligentní systémy 4.0, ev.č. FW01010020, podpořený Technologickou agenturou ČR v rámci programu TREND, byl společností New Water Group s.r.o. ve spolupráci s řešiteli ze společnosti Alad CZ s.r.o. vytvořen unikátní řídicí software IQ-MINT, pracující na principu PID regulace a hromadném sběru a sdílení dat, umožňující inteligentní a autonomní řízení procesu ultrafiltrace, použitelný na libovolný typ nátoku zpracovávané vody. Následnou vývojovou fázi pak představovala aplikační validace tohoto softwaru IQ-MINT na reálném zdroji surové vody s cílem potvrdit inteligentní a samooptimalizační řízení procesu ultrafiltrace v reálném čase s důrazem na prodloužení životnosti membrány, zvýšení celkového recovery a snížení provozních nákladů. Toto aplikační ověření probíhalo v širším řešitelském konsorciu projektu, tedy za aktivní účasti dalších řešitelů z VŠCHT Praha a společnosti Ircon s.r.o.

V obecném pohledu na filtrační režim lze proces ultrafiltrace (jeden filtrační cyklus) rozdělit na 3 základní operační kroky:

– filtrace,
– zpětný proplach (Backwash – BW),
– chemicky podpořený zpětný proplach (Chemically Enhanced Backwash – CEB).

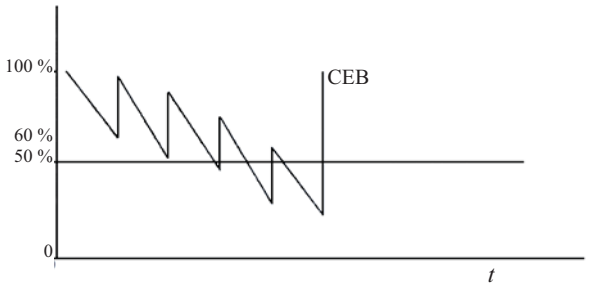
Každý krok filtračního cyklu má své opodstatnění, přičemž jejich délka, četnost a intenzita zpětného proplachu přímo ovlivňuje účinnost a stabilitu ultrafiltračního procesu. V obecném pohledu na inteligentní řízení cyklu filtrace lze předpokládat, že uvedené procesní kroky můžeme optimalizovat „samostatně“ a hodnotit jejich vliv na požadovanou hodnotu a trend permeability *P*, resp. permeability P_{20} přepočtené na hodnotu odpovídající teplotě 20 °C.

Při inteligentním řízení dále nutno zohlednit některé protichůdné technologické skutečnosti. Je-li membrána zanesená, pak permeabilita klesá a je nutné provést zpětný proplach (BW). Pokud přestává být zpětný proplach účinný, je nutné přistoupit k chemicky podpořenému proplachu (CEB). Každý chemický proplach ovšem razantně snižuje životnost materiálu membrány. Jedná se tedy až o poslední technologický proces k vyčištění membrány a je snaha jeho frekvenci co nejvíce snížit. Rychlost zanášení membrány je závislá na charakteru vstupní vody, který je v praxi často proměnný.

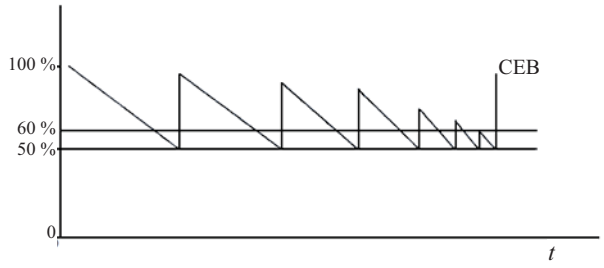
Při zohlednění výše uvedených skutečností lze konstatovat, že software IQ-MINT, vyvinutý společností New Water Group s.r.o. a Alad CZ s.r.o. je schopný okamžitě reagovat na změnu charakteru vstupní vody a tím přizpůsobit procesní nastavení uváděných operačních kroků tak, aby hodnota permeability dosahovala maximálních hodnot v požadovaném „neměnném“ časovém trendu, ale s ohledem na bezpečnost provozu a životnost použitých membrán.

Na obr. 3 je znázorněn typický pokles permeability v rámci manuálního řízení ultrafiltrace s fixní dobou filtrace.

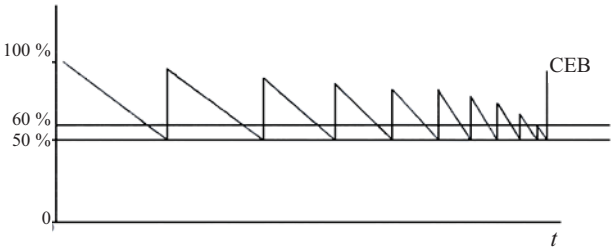
Na obr. 4 lze pozorovat výsledný efekt optimalizačního softwaru IQ-MINT na hodnotu a trend permeability. Jeli zpětný proplach proveden ihned při poklesu permeability pouze pod určitou procentuální hodnotu, dochází



Obr. 3. **Standardní řízení procesu s fixní hodnotou délky filtračního cyklu, y = P_{20}**



Obr. 4. **Optimalizované řízení podle poklesu P_{20}, $y = P_{20}$**



Obr. 5. **Optimalizované řízení podle poklesu P_{20} s adaptivním zpětným proplachem, $y = P_{20}$**

k účinnějšímu proplachu membrány a tím např. i k prodloužení intervalu mezi chemicky podpořenými proplachy.

Na obr. 5 lze pozorovat efekt delší doby a vyšší intenzity zpětného proplachu. Dochází-li k nedokonalému zpětnému proplachu, nastává prodloužení jeho délky. Pokud prodloužení doby zpětného proplachu nemá zásadní vliv na zvýšení hodnoty permeability, dochází pomocí navržených algoritmů ke zvýšení intenzity jeho toku. Optimalizací parametrů zpětného proplachu tedy dochází k účinnějšímu prodloužení intervalu mezi chemickými proplachy.

Hlavní výhodnou samooptimalizačního software IQ-MINT je skutečnost, že toto inteligentní řízení procesu ultrafiltrace pracuje na základě aktuálně hodnocených provozních parametrů a umožňuje okamžitou úpravu relevantních provozních parametrů nezávisle na kvalitě nátoku nebo produktu.

Použití softwaru IQ-MINT tedy umožňuje dosažení požadovaného optimálního provozního režimu technologie bez nutnosti hlubší znalosti procesu i kvalitativních parametrů jednotlivých procesních proudů.

2. Praktická část, výsledky

2.1. Optimalizace na reálném typu vod

V rámci testování funkce softwaru IQ-MINT byl tento implementován do technologického zařízení ultrafiltrace UF60-MINT, navrženého společností New Water Group s.r.o. Cílem testování bylo potvrdit funkci samooptimalizačního softwaru IQ-MINT na reálném zdroji povrchové vody s důrazem na optimalizaci celkového recovery (resp. jeho maximálního zvýšení), snížení rizika nevratného zanesení membrány (resp. maximalizace dlouhodobé hodnoty permeability) a na přínos při snižování provozních nákladů.

Jako vhodná lokalita pro validaci funkce softwaru IQ-MINT byla zvolena Úpravna vody v Bedřichově. Zdroj surové vody zde představuje povrchová voda z Josefova Dolu, která je dle analytického rozboru značně kontaminována organickými látkami, konkrétně směsí huminových látek. Protože rozptyl velikosti organických molekul huminových látek přesahuje schopnost jejich účinného odstranění pouze pomocí ultrafiltrace, bylo nutno aplikovat v rámci použitého zařízení UF60-MINT kombinaci ultrafiltrace s in-line koagulací.

2.2. Nastavení hodnot in-line koagulace

V konvenčním procesu úpravy vod se využívá koagulace jako technologický proces, který vede ke zvýšení účinnosti odstraňovaní organického znečištění. V případě membránového procesu se využívá proces tzv. in-line koagulace, kdy je koagulační činidlo dávkováno přímo do nátoku surové vody s kontinuální úpravou pH na požadovanou hodnotu. V proudu surové vody před vstupem na membránu se tak po úpravě pH a nadávkování koagulačního činidla tvoří mikrovločky, které je ultrafiltrační membrána schopna účinně zachytit.

V laboratoři VŠCHT Praha byly před spuštěním pilotního provozu nejprve provedeny standardní kádinkové testy se síranem hlinitým v simulovaných podmínkách s odebranou surovou vodou při teplotě vody nátoku 2,5 °C. Koagulační činidlo i teplota odpovídala podmínkám na Úpravně vody v Bedřichově. Počáteční dávka koagulantu pro kádinkové testy byla zvolena 7,6 ml h^{-1}, tedy 2,1 ml m^{-3}, což odpovídá průměrné dávce koagulantu dávkované na ÚV v Bedřichově při pH 5,9–6,0. Při kádinkových testech nedocházelo za výše uvedených podmínek k tvorbě viditelných vloček ani při zvolené dávce ani při dávkách nižších či vyšších. Viditelné vločky začaly vznikat až při vyšších hodnotách pH, konkrétně 6,9–7,1, kde vločky ovšem tvoří primárně produkty hydrolýzy koagulantu bez organických molekul. Přítomné organické látky by měly koagulovat při pH právě 5,9–6,1, ovšem nízká teplota (< 5 °C) zhoršuje schopnost tvořit vločky, to ovšem neznamená, že by v roztoku neměly vznikat mikrovločky. Bylo tedy nutné přistoupit k testům v realném provozu. Nejprve byly provedeny testy dávek 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 2,7 a 3,0 ml m^{-3} při hodnotě pH 6,1 a byla měřena absorbance

produktu při 387 nm a následně koncentrace hliníku a zákal. Dávka koagulantu pro vzorek s nejnižšími hodnotami absorbance a zákalu produktu (tedy 2,7 ml m^{-3}) byla zvolena jako vhodná a následně bylo při aplikaci zvolené dávky měněno pH s cílem zvýšení účinnosti koagulace. Jako vhodné pH byla nakonec zjištěna hodnota pH 6,8. I přes dosažení vysoké účinnosti koagulace měl produkt UF stále vyšší hodnoty absorbance při 387 nm než produkt ÚV Bedřichov, což odpovídá vyšší koncentraci organického znečištění. V dalším kroku byl snižován průtok filtrace z důvodu zvýšení doby zdržení mezi hodnoty 1,8 a 2,4 $m^3 h^{-1}$.

Finální návrhové parametry in-line koagulace byly tedy následující:

– dávka koagulantu 2,7 ml m^{-3};
– pH 6,8;
– průtok filtrace 1,8–2,4 $m^3 h^{-1}$.

2.3. Validace inteligentního řízení v reálné aplikaci

Jednotka UF60-MINT s jedním membránovým modulem o aktivním povrchu 60 m^2 ve formě multikanálového dutého vlákna v dead-end uspořádání byla testována na příkladu vody odpovídající kvalitě povrchové vody neboli surové vody upravované ÚV Bedřichov. Teplota nátoku byla přibližně v rozmezí 5–2 °C.

Před zahájením pilotního provozu byly nastaveny následující počáteční parametry pro filtrační cyklus:

– filtrace: průtok 3,6 m^3 h^{-1} (60 l m^{-2} h^{-1}) po dobu 40 min,
– BW: průtok 13,8 $m^3 h^{-1}$ (240 l $m^{-2} h^{-1}$) po dobu 50 s,
– CEB zásaditý: 1× denně, dávkován 33% NaOH na pH 12,5, plnění 7,2 $m^3 h^{-1}$ po dobu 45 s, loužení po dobu 30 min, výplach 13,8 $m^3 h^{-1}$ po dobu 45 s,
– CEB kyselý: 1× denně, dávkována 37% H_2SO_4 na pH 1,5, plnění 7,2 m^3 h^{-1} po dobu 45 s, loužení po dobu 30 min, výplach 13,8 $m^3 h^{-1}$ po dobu 45 s,
– CEB dezinfekce: 1× denně, dávkován 1% NaClO, pH max. 12, plnění 7,2 m^3 h^{-1} po dobu 45 s, loužení po dobu 60 s, výplach 13,8 $m^3 h^{-1}$ po dobu 45 s.

Dále byly nastaveny počáteční a limitní hodnoty procesních parametrů pro validaci SW samooptimalizace včetně podmínek pro spouštění BW a CEB. Ty respektovaly doporučení výrobce membrány ve vazbě na kinetiku zanášení membrány.

Na počátku testovací fáze před spuštěním samooptimalizačního softwaru se permeabilita P_{20} pohybovala v rozmezí 270–390 $dm^3 m^{-2} h^{-1} bar^{-1}$. Chemicky podpořené proplachy se v průběhu samooptimalizace ustálily v intervalu jeden za dva dny. Těsně před spuštěním samooptimalizace byly provedeny testy in-line koagulace. Od tohoto okamžiku byla spuštěna in-line koagulace, vlivem které bylo nutné snížit průtok filtrace. Díky sníženému průtoku a probíhající in-line koagulaci se snížila hodnota permeability z hodnoty okolo 370 $dm^3 m^{-2} h^{-1} bar^{-1}$ na 230–340 $dm^3 m^{-2} h^{-1} bar^{-1}$.

V případě transmembránového tlaku, tedy hnací síly filtrace, byly stanoveny následující průběhy. Hodnoty TMP se pohybovaly v rozmezí 0,22–0,26 bar před zapnutím samooptimalizace a při objemovém průtoku 3,6 $m^3 h^{-1}$, resp. v rozmezí 0,145–0,155 bar po zapnutí in-line koagulace při aplikovaném snížení objemového průtoku na 1,8 $m^3 h^{-1}$. Tento rozsah zůstal zachován i v případě aplikace softwaru samooptimalizace. Při procesu in-line koagulace byla hodnota pH upravována na konstantní hodnotu 6,8 pomocí dávkování 1–5% roztoku NaOH.

Dále byla hodnocena závislost výtěžku, doby filtrace a zpětného proplachu BW a CEB procesu ultrafiltrace na parametrech v průběhu validovaného provozu. Z pohledu optimalizace doby filtrace lze konstatovat, že v případě, kdy nebyl zapnut samooptimalizační software, byla doba filtrace srovnatelná s případem, kdy byl software zapnut. Samooptimalizační software tedy primárně ovlivňoval objemový průtok filtrace. Doba filtrace se nezměnila ani v případě, kdy byla spuštěna in-line koagulace. Samooptimalizace opět měnila hodnoty průtoku v rozmezí průtoků ideálních pro funkci in-line koagulace. Délka zpětného proplachu se nejprve zvýšila na 60 s, poté se zvýšila intenzita jeho průtoku na 14,2 m^3 h^{-1}, kdy následně došlo k jeho zkrácení zpět na 50 s. To samé platí i v případě veličiny recovery, která byla značně ovlivněna vyšším počtem kratších filtračních cyklů, a tedy i zvýšeným počtem zpětných proplachů. Ihned po zapnutí samooptimalizačního softwaru při průtoku 2,4 $m^3 h^{-1}$ veličina recovery skokově vzrostla, což bylo způsobeno zvýšením hodnoty průtoku, doba jednoho filtračního cyklu se mírně zkrátila. Poté si samooptimalizace upravila průtok filtrace na 1,8 $m^3 h^{-1}$ a veličina recovery se úměrně snížila. Snížení veličiny recovery ovlivnila hlavně spuštěná in-line koagulace. V následující tab. I je uvedeno srovnání provozních

Tabulka I
Srovnání provozních parametrů před a po zapnutí samooptimalizace

Fáze	P_{20} [$dm^3 m^{-2} h^{-1} bar^{-1}$]	TMP [bar]	Průtok filtrace [l h^{-1}]	R [%]
1.1[a]	334,2	0,28	3600	87,5
1.2 [b]	336,8	0,19	1800	84,7
2 [c]	297,8	0,18	2400; 1800	72,4

[a] Filtrace bez in-line koagulace, vypnutý samooptimalizační software, [b] Filtrace s in-line koagulací, vypnutý samooptimalizační software, [c] Filtrace s in-line koagulací, zapnutý samooptimalizační software

Tabulka II
Souhrn analytických parametrů

Parametr	Vzorek	Vypnutý SW	Zapnutý SW
$CHSK_{Mn}$, mg l^{-1}	nátok	4,14	4,07
	produkt	1,53	1,49
pH	nátok	6,24	6,31
	produkt	6,58	6,52
RL_{105}, mg l^{-1} [a]	nátok	50,50	53,00
	produkt	43,50	46,00
NL_{105}, mg l^{-1} [b]	nátok	7,00	7,50
	produkt	0,00	0,00
Dusičnany, mg l^{-1}	nátok	0,76	0,79
	produkt	0,78	0,76
Hliník, mg l^{-1}	nátok	0,04	0,02
	produkt	0,03	0,02

[a] Rozpuštěné látky měřené při 105 °C, [b] Nerozpuštěné látky měřené při 105 °C

parametrů při zapnuté samooptimalizaci z testovacího provozu ve formě celkového průměru P_{20}, TMP, průtoku filtrace a recovery *R*.

Velmi důležité je zmínit, že technologie splňovala kvalitativní parametry provozu. V tab. II jsou uvedené průměry měřených kvalitativních hodnot při vypnutém a zapnutém softwaru IQ-MINT.

2.4. Hodnocení funkce softwaru IQ-MINT

Parametry funkce samooptimalizačního softwaru IQ-MINT byly hodnoceny dle dvou hlavních kritérií. V první řadě byly pomocí softwaru nastaveny provozní parametry ultrafiltrace tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší hodnoty recovery. V druhém případě byly pomocí softwaru upravovány provozní parametry tak, aby co nejúčinněji prodlužovaly životnost membrány, tj. zvyšovaly účinnost zpětných proplachů, zvyšovaly interval mezi CEB a udržovaly permeabilitu ve filtračním cyklu s nízkou mírou rozptylu. Tyto dva přístupy optimalizace provozu jdou logicky proti sobě.

V kontextu tohoto přístupu inteligentního řízení bylo pomocí aplikovaného softwaru upřednostněno snížení četnosti chemicky podpořených proplachů oproti maximálnímu zvýšení hodnoty recovery. Snížení hodnoty recovery bylo zapříčiněno aplikací vyšší četnosti zpětných proplachů, čímž byl eliminován klesající trend permeability. Z dat lze dále pozorovat, že v tomto režimu byly zpětné proplachy mnohem účinnější. Souhrnně lze konstatovat, že před spuštěním softwaru IQ-MINT byla četnost CEB 11,6 CEB/1000 m^3 a po spuštění samooptimalizačního softwaru se četnost CEB ustálila na 5,8 CEB/1000 m^3. Touto úpravou provozních parametrů bylo pomocí softwaru dosaženo poloviční spotřeby chemikálií potřebných na údržbu membrány.

3. Závěr

Pilotní provoz integrovaného procesu in-line koagulace a ultrafiltrace při zpracování povrchové vody na Úpravně vody Bedřichov potvrdil, že bez aplikace inteligentního řízení dosahoval průměrné výtěžnosti na úrovni 84,7 %. Toto však bylo dosaženo za provozních podmínek, kdy ultrafiltrační membrána byla daleko více chemicky zatížena větší frekvencí zpětných proplachů CEB. Při tomto provozním režimu rovněž docházelo k vyššímu poklesu hodnoty permeability v rámci jednoho filtračního cyklu i k postupně klesajícímu trendu permeability mezi jednotlivými zpětnými proplachy membrány.

V případě aplikovaného samooptimalizačního softwaru IQ-MINT došlo ke snížení průměrné výtěžnosti na úroveň 72,4 %, což bylo způsobeno zvýšením intenzity zpětného proplachu BW ve vazbě na jeho četnost, průtok i délku. Tento režim však docílil zvýšenou účinnost zpětného proplachu BW ve vazbě na požadovanou konstantní a co nejvyšší hodnotu permeability a zároveň snížil frekvenci zpětného proplachu CEB. Tímto způsobem tedy dochází k efektivnější filtraci za minimalizace poklesu hodnot průměrné permeability při podmínkách, které zaručují delší životnost membrány. Tento režim dále jednoznačně prokázal vyšší účinnost zpětného proplachu BW ve vazbě na nežádoucí pokles permeability, což snižuje spotřebu energie, spotřebu chemikálií a zejména minimalizuje riziko nevratného zanesení membrány. To jednoznačně vede k optimalizaci celkových provozních nákladů a k eliminaci rizika nevratného zanesení membrány. Na základě získaných výsledků a kvalitativního hodnocení provozu lze tedy spolehlivě potvrdit správnou funkci optimalizačního softwaru IQ-MINT.

Potenciál využití softwaru IQ-MINT u procesu ultrafiltrace není pouze při výrobě pitné vody, ale je využitelný

i v dalších aplikacích. Je rovněž zřejmý i v jeho použitelnosti na některé další typy tlakových membránových procesů.

Vypracováno v rámci projektu ev.č. FW01010020, Membránové inteligentní systémy 4.0, který je spolufinancován se státní podporou Technologické agentury ČR, Programu TREND.

LITERATURA

1. Mikulášek P., Doleček P., Jiránková H., Kinčl J., Kočiřík M., Pospíšil P., Schauer J.: *Tlakové membránové procesy*, 1. vyd. VŠCHT Praha, Praha 2013.
2. Pabby A. K., Rizvi S., Requena A.: *Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications. Section II*. Taylor&Francis Group, Boca Raton 2008.
3. Boda R., Bates W. T., Bartels C. R.: *Use of Color Removal Membranes on Waste Water Treatment in Pulp and Paper Industry.* NTNU, Trondheim 2010.
4. Mulder M.: *Basic Principles of Membrane Technology*, 2. vyd. Kluwer Academic, Dordrecht 1996.
5. Pienemann K. V., Nunes S. P.: *Membrane Technology, Vol. 4: Membranes for Water Treatment*. Wiley-VCH, Weinheim 2010.
6. Strathmann H.: J. Membr. Sci. *246*, 113 (2005).
7. Mikulášek P., Velikovská P., v knize: *Expanding Issues in Desalination*, str. 181. InTech, Rijeka 2011.
8. Bucz Š., Kozáková A., v knize: *Introduction to PID Controllers: Theory, Tuning and Application to Frontier Area*. InTech, Rijeka 2012.
9. Araki M.: *Control Systems, Robotics and Automation, Vol. 7: PID Control.* 2009.
10. Zhang J., Guo L.: IEEE Control Systems Letters *3*, 643 (2019).

J. Stárek[a,b], Z. Zwaan[a,b], M. Zlámal[a], M. Paidar[a], A. Černín[b], L. Malý[d], J. Kinčl[d], and V. Sýkora[c] *([a] Department of Inorganic Technology, University of Chemistry and Technology, Prague, [b] New Water Group s.r.o., Jiřetín pod Jedlovou, [c] Department of Water Technology and Environmental Engineering, University of Chemistry and Technology, Prague, [d] Alad CZ s.r.o., Česká Lípa, Czech Republic):* **Application of Intelligent Membrane Separation**

Water recycling and the production of drinking water have recently become a very actual topic. Pressure membrane processes make it possible to produce water with a quality higher than or comparable to the product of conventionally used processes such as sand filtration and flotation. The operation of membrane technologies requires specialist knowledge. By correctly analysing the input parameters of the water and controlling the operating parameters of the process, the technology is capable of achieving a very high recovery with a very high product quality while simultaneously using low energy. The IQ-MINT intelligent software can analyze these parameters in real time and is able to immediately change the operating parameters of the technology with an emphasis on obtaining the highest possible recovery with regard to operational safety and membrane life. The software was validated on the example of cleaning real surface water in the UF60-MINT unit. When switched on, the software adjusted the operating parameters of the technology in such a way that – to the expense of the recovery – the lifetime of the membrane was extended and the consumption of chemicals and energy was reduced, with an emphasis on operational safety. The use of the IQ-MINT software thus enables the autonomous function of the technology with any type of incoming water without the need for a constant control and regulation by the operator.

Keywords: membrane technology, membrane separation, membrane, ultrafiltration, intelligent control, permeability, transmembrane pressure, intelligent software

Miesto konania:

GRAND HOTEL BELLEVUE
Horný Smokovec 21
062 01 Vysoké Tatry
Slovenská republika

Dôležité termíny:

30. jún Koniec registrácie
30. jún Posledný termín platby
30. jún Nahratie abstraktov

Súťaže

Cena Marty Sališovej
Cenu Marty Sališovej udeľuje Slovenská chemická spoločnosť a je určená doktorandom a mladým vedeckým pracovníkom do 30 rokov, ktorí sú členmi Slovenskej chemickej spoločnosti alebo Českej chemickej spoločnosti. Témy súťažiacich prác môžu byť zo všetkých oblastí chémie v súlade s odbornými sekciami zjazdu. Vybraných 10 prác bude prezentovaných v súťažnej sekcii a prvé tri miesta sú ocenené diplomom a aj finančne ohodnotené.

IUPAC poster award
Ocenenie IUPAC v podobe diplomu a finančnej poukážky sa udeľuje PhD. študentovi a mladému vedeckému pracovníkovi do 35 rokov za najlepšiu posterovú prezentáciu.

Ceny dekanov fakúlt s chemickým zameraním a rektorov pre najlepšie prezentácie študentov v posterovej sekcii

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

nabízí pro akademický rok 2023/2024

DOKTORSKÉ STUDIJNÍ PROGRAMY

(standardní doba studia 4 roky)

- Analytická chemie
- Anorganická chemie
- Anorganická technologie
- Biochemie
- Ekonomika a management podniků s procesními výrobami
- Fyzikální chemie
- Chemické a procesní inženýrství, specializace Environmentální inženýrství; Chemické inženýrství
- Chemie a technologie anorganických materiálů
- Inženýrství energetických materiálů
- Organická chemie
- Organická technologie
- Povrchové inženýrství

Všechny nabízené doktorské studijní programy je možné studovat v prezenční i kombinované formě. Přihlášky k doktorskému studijnímu programu musí být doloženy písemným souhlasem potencionálního školitele s návrhem tématu disertační práce, životopisem, potvrzením o zdravotní způsobilosti, doklady o dosaženém vzdělání.

Přihlášku lze podat buď elektronicky na adrese http://eprihlaska.upce.cz nebo na standardním formuláři „Přihláška ke studiu na vysoké škole v ČR".

Termín přihlášek: 31. května 2023

www.zivotjechemie.cz

Česká společnost chemická, Sekretariát a redakce Chemických listů
Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1
tel.: 221 082 383, redakce tel. 221 082 370
e-mail: chem.spol@csvts.cz
http://www.csch.cz

Členské služby a výhody | Česká společnost chemická

Zapojení v České chemické společnosti, členu Asociace českých chemických společností, EuCheMS, ECTN-A a ČSVTS přináší individuálním chemikům, kromě vlastního členství v největší a nejstarší české profesní organizaci chemiků (zal. 1866):

ROZŠIŘTE SVÉ KONTAKTY

- celosvětově uznávanou příslušnost k jedné z nejstarších profesních organizací v chemii na světě,
- možnost zapojení se do práce a komunikace v jedné z místních či odborných poboček ČSCH,
- kontakty, informace, služby, možnosti, uplatnění,…
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost přidruženého členství v IUPAC, a z toho plynoucí sleva u nakladatelství Blackwell a na konferencích sponzorovaných IUPAC, členové IUPAC dostávají časopis Chemistry International,
- možnost získání a doporučení členské přihlášky do významných zahraničních chemických společností (RSC, ACS, GDCh, GÖCh, SFC aj.),

ZÚČASTNĚTE SE NÁRODNÍCH SJEZDŮ

- možnost zúčastnit se národních sjezdů s významnou slevou pro členy, které jsou pořádány každoročně, jednou na Slovensku jednou v ČR,

ZLEPŠETE SVOJI INFORMOVANOST

- možnost dostávat 4x ročně zdarma tzv. „bulletinové číslo“ Chemických listů v tištěné či elektronické podobě,
- možnost dostávat 4x ročně, cestou elektronické pošty, členské upozornění na nejdůležitější události a aktuality,
- volný přístup k členskému magazínu ChemViews (http://www.chemistryviews.org/), jehož je ČSCH spoluvlastníkem, a to i na vašem mobilním telefonu apod.,
- členské informace o nových knihách, produktech a službách i o připravovaných odborných akcích na celém světě,
- informace o dění v evropských strukturách, jako např. EuCheMS, ECTN, EC2E2N a podobně,
- přístup k elektronickým informačním médiím Společnosti,
- volný přístup k tištěným verzím časopisů ChemPubSoc Europe v „knihovně ČSCH“, kterou po dohodě s PřF UK Praha zřídila ČSCH v Knihovně chemie (sídlící v budově Hlavova 8/2030, Praha 2, Albertov, přízemí, v místnostech č. 148, 149, 150).

ZAPOJTE SE DO ŘEŠENÍ GRANTŮ EU

- možnost participovat na řešení grantů s evropskými partnery, jako napři ECTN a partnerskými národními společnostmi.

UŠETŘETE PENÍZE

- možnost objednání předplatného Chemických listů s významnými slevami,
- podstatné slevy u vložného na sjezdech a konferencích, jejichž oficiálním pořadatelem je ČSCH,
- významnou slevu (ca 90 %) na předplatné časopisu Chemistry – A European Journal, a dalších evropských časopisů konsorcia ChemPubSoc Europe, jichž je ČSCH spolumajitelem,
- přístup ke službám a slevám poskytovaným členskými organizacemi EuCheMS pro členy národních organizací,
- možnost získání příležitostných slev obchodních firem spolupracujících s ČSCH,
- slevu při zapůjčení automobilu (až 35 %) u společností AVIS a HERTZ na celém světě, kromě Austrálie, a použití těchto automobilů na akcích v ČR za speciální tarify,
- sleva 20 % z publikačních poplatků v časopise ChemOpenChem, který společnost spoluvlastní.

ZDŮRAZNĚTE SVOJI PROFESIONALITU

- možnost zažádání o evropskou nostrifikaci chemického vzdělání a odborné praxe spojenou s udělením titulu EurChem, platného v celé EU,

BUĎTE VIDĚNI

- možnost uplatnit informace z vlastní pracovní činnosti (výsledky, novinky, inzerce, tisková oznámení aj.),
- možnost zveřejnění vlastního oznámení v rubrice Bulletinu Chemických listů „Práci hledají“,
- a řadu dalších služeb, které se teprve sjednávají,

PRO FIRMY A PODNIKATALE

- Firmám, podnikům, institucím a dalším právnickým osobám nabízí ČSCH mimo jiné i tzv. „kolektivní členství“, při kterém se ve vzájemné smlouvě sjedná to, čím mohou pomoci jedna strana druhé. Podrobnosti na dotaz.

CoNFeReNCe

Rosteme s chemií

15. - 16. 6. 2023

Fakulta chemicko-technologická
Univerzita Pardubice

Člen AMCH/ČSCH 950 Kč

Ostatní 1250 Kč

AMCH
GROW TOGETHER

Metrohm demonstrační laboratoř na Univerzitě Karlově

Metrohm
Česká republika

www.metrohm.cz

OBSAH

ÚVODNÍK

Před sto lety zemřel Wilhelm Conrad Röntgen 277
J. Fiala

REFERÁTY

O duchu (duši) z vína 278
M. Jurášek a P. Drašar

Lignin a jeho biokonverze na polyhydroxy-alkanoáty bakterií *Pseudomonas putida* 282
D. Maršík

Príprava a použitie polymérnych adsorbentov s odtlačkom molekúl v súlade s princípmi zelenej chémie 290
A. Špačková a K. Hroboňová

Problematika hořkých peptidů vznikajících v procesu zrání sýrů 301
J. Zemanová a K. Šustová

Zanedbávané aplikace monolitických struktur: Počátky planární chromatografie s hmotnostní spektrometrickou detekcí 308
F. Švec

Konjugáty protilátka-léčivo, spojení velkých a malých terapeutických molekul 319
B. Kratochvíl a E. Benešová

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

Aplikace inteligentní membránové separace 330
J. Stárek, Z. Zwaan, M. Zlámal, M. Paidar, A. Černín, L. Malý, J. Kinčl a V. Sýkora

CONTENTS

EDITORIAL

Wilhelm Conrad Röntgen Passed Away 100 Years Ago 277
J. Fiala

REVIEW ARTICLES

On Spirit (Soul) from Wine 278
M. Jurášek and P. Drašar

Lignin and Its Bioconversion to Polyhydroxy-alkanoates by the Bacterium *Pseudomonas putida* 282
D. Maršík

Preparation and Application of Polymeric Molecularly Imprinted Adsorbents in Accordance with the Principles of Green Chemistry 290
A. Špačková and K. Hroboňová

The Problem of Bitter Peptides Formed in the Process of Cheese Ripening 301
J. Zemanová and K. Šustová

Neglected Applications of Monolithic Structures: The Beginnings of Planar Chromatography with Mass Spectrometric Detection 308
F. Švec

Antibody-Drug Conjugates, the Combination of Large and Small Therapeutic Molecules 319
B. Kratochvíl and E. Benešová

ORIGINAL AND METHODICAL PAPERS

Application of Intelligent Membrane Separation 330
J. Stárek, Z. Zwaan, M. Zlámal, M. Paidar, A. Černín, L. Malý, J. Kinčl, and V. Sýkora

Odborná skupina termické analýzy České společnosti chemické

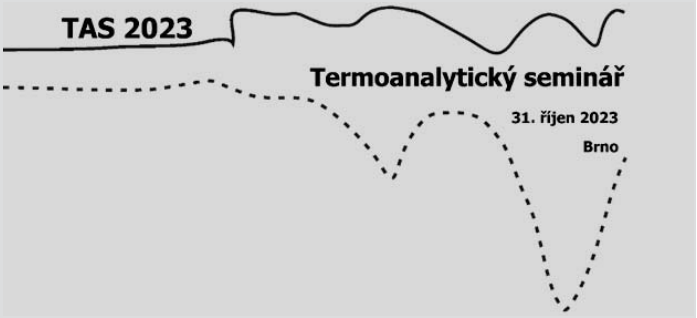
pořádá

TERMOANALYTICKÝ SEMINÁŘ

31. říjen 2023

Ústav fyziky materiálů AVČR, v.v.i, Brno

Další informace: http://www.thermal-analysis.cz
Kontakt na organizátory: petra.sulcova@upce.cz



CHEMICKÉ LISTY • ročník/volume 117 (2023), čís./no. 5 • LISTY CHEMICKÉ, roč./vol. 147, ČASOPIS PRO PRŮMYSL CHEMICKÝ, roč./vol. 133 • ISSN 0009-2770, ISSN 1213-7103 (e-verze) • evidenční číslo MK ČR E 321 • Vydává Česká společnost chemická jako časopis Asociace českých chemických společností ve spolupráci s VŠCHT Praha, s ČSPCH a ÚOCHB AV ČR za finanční podpory Rady vědeckých společností ČR, Akademie věd ČR, Nadace Český literární fond a kolektivních členů ČSCH • IČO 444715 • Published by the Czech Chemical Society • VEDOUCÍ REDAKTOR/EDITOR-IN-CHIEF: V. Vyskočil • REDAKTOŘI/EDITORS: J. Barek, E. Benešová, P. Drašar, P. Holý, P. Chuchvalec, M. Jurášek, Z. Kolská, B. Kratochvíl, J. Masák, J. Podešva, P. Šmejkal; Bulletin: P. Drašar; Webové stránky: R. Liboska, V. Vyskočil • ZAHRANIČNÍ A OBLASTNÍ REDAKTOŘI/FOREIGN AND REGIONAL EDITORS: F. Švec (USA, ČR) • TECHNICKÁ REDAKTORKA/EDITORIAL ASSISTANT: R. Řápková • REDAKČNÍ RADA/ADVISORY BOARD: K. Bláha, L. Červený, E. Dibuszová, L. Grubhoffer, J. Hanika, Z. Havlas, M. Hof, Z. Hostomský, J. Káš, M. Koman, P. Konvalinka, J. Kotek, J. Koubek, J. Málek, P. Matějka, K. Melzoch, V. Pačes, M. Pospíšil, V. Růžička, P. Slavíček, I. Stibor, J. Zima, T. Zima • ADRESA PRO ZASÍLÁNÍ PŘÍSPĚVKŮ/MANUSCRIPTS IN CZECH, SLOVAK OR ENGLISH CAN BE SENT TO: Chemické listy, Novotného Lávka 5, 116 68 Praha 1; tel./phone +420 221 082 370, e-mail: chem.listy@csvts.cz • INFORMACE O PŘEDPLATNÉM, OBJEDNÁVKY, PRODEJ JEDNOTLIVÝCH ČÍSEL A INZERCE/INFORMATION ADS: Sekretariát ČSCH, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1; tel. +420 221 082 383, e-mail: chem.spol@csvts.cz, chem.ekonom@csvts.cz • PLNÁ VERZE NA INTERNETU/FULL VERSION ON URL: http://www.chemicke-listy.cz • TISK: TG TISK s.r.o., 5. května 1010, 563 01 Lanškroun • SAZBA, ZLOM: ČSCH, Chemické listy • Copyright © 2023 Chemické listy/Česká společnost chemická • Cena výtisku 180 Kč, roční plné předplatné 2023 (12 čísel) 1810 Kč, individuální členské předplatné pro členy ČSCH 900 Kč. Roční předplatné ve Slovenské republice 96 EUR (doručování via SCHS), individuální členské předplatné pro členy ČSCH 73 EUR (doručování via SCHS), 96 EUR + poštovné (individuální doručování), ceny jsou uvedeny včetně DPH • DISTRIBUTION ABROAD: KUBON & SAGNER, POB 34 01 08, D-80328 Munich, FRG • This journal has been registered with the Copyright Clearance Center, 2322 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA, where the consent and conditions can be obtained for copying the articles for personal or internal use • Pokyny pro autory najdete na http://www.chemicke-listy.cz , zkratky časopisů podle Chemical Abstract Service Source Index (viz http://cassi.cas.org/search.jsp) • Chemické listy obsahující Bulletin jsou zasílány zdarma všem individuálním a kolektivním členům ČSCH a ČSPCH v ČR i zahraničí, do všech relevantních knihoven v ČR a významným představitelům české chemie a chemického průmyslu; v rámci dohod o spolupráci i členům dalších odborných společností • Molekulární námět na obálce: V. Spiwok • Dáno do tisku 28.4.2023.

SHIMADZU
Excellence in Science

SU ESS

Přepisuje nejlepší výsledky ve své třídě

Nový IRXross je FTIR střední třídy, který dosahuje výsledků o třídy lepších přístrojů. Napříč širokému spektru vzorků dosahuje vysoké rychlosti a rozlišení měření, což zajišťuje vysokou kvalitu při udržení nízké ceny analýz. Integrovaný operační systém zajišťuje jednoduché ovládání přístroje. Užitím příslušenství je možné ušetřit až 90% energie v pohotovostnímu režimu.

Špičková citlivost ve své třídě s poměrem S/N 55 000:1.

Vysokorychlostní měření 20krát za sekundu s volitelným softwarem pro rychlé skenování.

Rychlé spuštění a snadná navigace pomocí softwaru IRPilot™.

ANALYTICAL
INTELLIGENCE

www.shimadzu.eu/suxess

Nový IRXross: Zjistěte si více o nejlepším výkonu za nejlepší cenu!

MERCK

BIG SCIENCE SMALL FOOTPRINT

Sustainable lab products, solutions & services for responsible science

Ensuring a sustainable future together

Our mission is to ensure a more sustainable future for everyone. With our growing portfolio of greener products, programs and services, we now offer even more ways for you to practice responsible science.

Our solutions combine enhanced sustainability with exceptional quality, so they are better for the planet, and for your work.

Your Opportunities

- Sustainable & less harmful alternatives
- Biodegradable & greener chemicals
- Sustainable packaging & distribution & disposal
- Reduced chemical consumption & waste
- Access to new products aligned with Design for sustainability (DfS) approach

Find much more on
SigmaAldrich.com/sustainable-chemistry

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®
Lab & Production Materials

Supelco®
Analytical Products

Milli-Q®
Lab Water Solutions

Millipore®
Preparation, Separation, Filtration & Monitoring Products