



ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
2. KONFERENCIE CENTIER EXCELENTNOSTI
DOBUDOVANIE TECHNICKEJ
INFRAŠTRUKTÚRY PRE VÝSKUM V OBLASTI
NOVÝCH BIOTECHNOLÓGIÍ



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

25. jún 2015

Editor: RNDr. Mária Dzúrová

Recenzoval: Ing Ján Mucha, CSc.

ISBN 978 – 80 – 971156 – 2 – 3



Európska únia
Európsky fond regionálneho rozvoja



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

Projekt:

***Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti
nových biotechnológií
ITMS 26210120029***

Prijímateľ:

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

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

Obsah

1.	Štruktúrna analýza exopolysacharidov.....	4
	<i>Pätoprstý V., Vlčková S., Farkašová E.</i>	
2.	Analýza štruktúry exopolysacharidu pochádzajúceho z <i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938.....	7
	<i>Pätoprstý V., Tkáčiková L., Bystrický P., Vlčková S., Farkašová E.</i>	
3.	Stanovenie štruktúry exopolysacharidu produkovaného <i>Lactobacillus reuteri</i> L26 pomocou NMR a hmotnostnej spektrometrie.....	11
	<i>Pätoprstý V., Tkáčiková L., Bystrický P., Vlčková S., Farkašová E.</i>	
4.	Cyklické peptidy ako antibiotiká budúcnosti.....	15
	<i>Pätoprstý V., Vlčková S., Farkašová E.</i>	
5.	Fragmentácia Gramicidínu S pomocou kolíziou indukovanej disociácie.....	18
	<i>Pätoprstý V., Vlčková S., Farkašová E.</i>	
6.	Fragmentácia analógov Gramicidínu S pomocou kolíziou indukovanej disociácie....	20
	<i>Pätoprstý V., Magdolen P., Vlčková S., Farkašová E.</i>	
7.	Automated acquisition of MS ⁿ spectral trees using Orbitrap hybrid mass spectrometers.....	24
	<i>Silvia Vlckova, Vladimir Patoprsty, Juraj Lutisan, Jakub Mezey, Robert Mistrik</i>	
8.	Závislosť rastu kvasiniek rodu <i>Cryptococcus</i> na laktózovom médiu od produkcie povrchových β-galaktozidáz	27
	<i>Barbora Pavlatovská, Barbora Stratilová, Renáta Vadkertiová a Vladimír Pätoprstý</i>	
9.	Indukcia povrchovej α-galaktozidázy kapsulárnych kvasiniek rodu <i>Cryptococcus</i>	31
	<i>Barbora Pavlatovská, Barbora Stratilová, Renáta Vadkertiová a Vladimír Pätoprstý</i>	
10.	Marginalizované komunity a voľne rastúce huby ako koncentrátoři ¹³⁷ Cs v lesných ekosystémoch na Slovensku.	35
	<i>Juraj Miššík, Lubomír Puskeiler, Vladimír Pätoprstý, Petra Moravcová, Július Árvay</i>	
11.	Identifikácia kvasiniek I. fylogenetickje skupiny <i>Cryptococcus laurentii</i> na základe hmotnostnej spektrometrie a sekvenáciou D1/D2 LSUrRNA domén.....	42
	<i>Vojtěch Ledvina, Dominika Hamříková, Barbora Stratilová, Jana Molnárová, Renáta Vadkertiová a Vladimír Pätoprstý</i>	
12.	Vplyv kultivačného média a prípravy vzorky na biotypizáciu kvasiniek rodu <i>Cryptococcus</i>	46
	<i>Alena Jurnečková, Barbora Stratilová, Jana Molnárová, Renáta Vadkertiová a Vladimír Pätoprstý</i>	
13.	Identifikácia vedľajšieho produktu reakcie xyloglukán nonasacharidu s fenylyzotiokyanátom (FITC) hmotnostnou spektrometriou.....	50
	<i>Silvia Vlčková, Barbora Stratilová, Vlasta Sasinková a Vladimír Pätoprstý</i>	

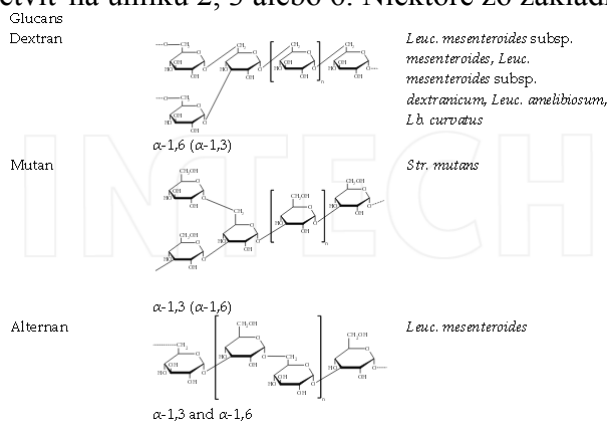
Štruktúrna analýza exopolysacharidov

Pätoprstý V., Vlčková S., Farkašová E.

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

Bakteriálne exopolysacharidy (EPS) sú extracelulárne polysacharidy slúžiace na ochranu buniek proti rôznym druhom stresu, toxickým kovom, vysušeniu a pod. Produkujú sa na povrchu buniek vo forme kapsúl pomocou extracelulárnych enzýmov, alebo sú vylučované z vnútrobunkového prostredia. Ich široké uplatnenie v potravinárstve (stabilizátory, emulgátory, zahusťovadlá, ...) vyplýva z diverzity ich štruktúry, ktorá určuje ich vlastnosti. Stretávame sa aj s novými aplikáciami ako je ich použitie ako bioabsorbentov, vychytávačov ťažkých kovov, či sprostredkovateľov pri cielelom prenose liečiv v bunkách. V poslednej dobe vzbudzuje pozornosť vedcov aj ich biologická a farmakologická aktivita – antioxidačné, antivirálne, alebo protirakovinové účinky. Z kategórie EPS sú v poslednom čase skúmané najmä EPS produkované mliečnymi baktériami (LAB). Tieto sa vyznačujú veľkou rozmanitosťou produkovaných štruktúr EPS a nespôsobujú zdravotné riziko (GRAS). EPS produkované LAB možno rozdeliť na homo- a hetero- polysacharidy. Homopolysacharidy pozostávajú z jedného druhu monosacharidu, zatiaľ čo heteropolysacharidy sú obvykle tvorené opakujúcimi sa jednotkami 3- 8 rozličných monosacharidov. Biosyntéza oboch typov je rozdielna: homo-EPS sa syntetizujú z cukrózy pomocou enzýmov glukancukrózy alebo levancukrózy, zatiaľ čo syntéza hetero-EPS zahŕňa viacero krokov ako je transpost cukru, syntéza nukleotidu, syntéza opakovaných jednotiek a ich následná polymerizácia.

Vlastnosti jednotlivých EPS okrem prítomnosti jednotlivých monosacharidov ovplyvňujú aj tvoriace sa glykozidické väzby. Napríklad homo- EPS pozostávajúci iba z glukózy môže vytvárať cez anomérny uhlík α - alebo β - väzby. Dve dôležité skupiny α -glukánov sú α -1,6 a α -1,3 viazané polysacharidy nazývané aj dextrány. Tieto sa následne môžu vetviť na uhlíku 2, 3 alebo 6. Niektoré zo základných štruktúr sú uvedené na Obr.1.



Obr. 1.: Základné štruktúrne usporiadanie EPS dextránového typu.

Určenie štruktúry EPS je nevyhnutným základom k pochopeniu ich fyzikálno-chemických vlastností a prípadnej využiteľnosti týchto látok. Štruktúrna analýza EPS však vyžaduje použitie špeciálnych analytických postupov značne odlišných od metód analýzy malých molekúl a iných biomolekúl. Ciele realizovaných analýzy sa dajú rozdeliť do niekoľkých bodov:

Monosacharidické zloženie

Analýza pozícií glykozidických väzieb a vetvenia

Určenie štruktúry cyklického usporiadania (furanóza, pyranóza)

Konfigurácia glykozidickej väzby na anomérnom uhlíku (α - alebo β -)

Sekvenčné usporiadanie monosacharideckých jednotiek v reťazci a určenie opakujúcich sa jednotiek (ak sú)

Určenie molekulovej hmotnosti

Základným krokom je izolácia EPS z biologického materiálu, určenie jeho čistoty a celkového obsahu sacharidov.

Následne sa analyzuje **monosacharidické kvalitatívne a kvantitatívne zloženie** EPS pomocou GC, alebo HPLC. Pri stanovení pomocou plynového chromatografu je potrebné po totálnej hydrolýze realizovať redukciu a následnú derivatizáciu.

Pozície glykozidických väzieb a miesta vetvenia sa obvykle zisťujú pomocou metylačnej analýzy. Metóda pozostáva z metylácie všetkých voľných hydroxylových skupín na metoxyly, následnej hydrolýzy, deuterovanej redukcie a následnej acetylácie. Takto pripravené parciálne metylované alditol acetáty (PMAA) sú analyzované pomocou GCMS väčšinou na stredne polárnych až polárnych kolónach. Retenčné časy a charakteristické EI spektrá slúžia na kvalifikáciu jednotlivých PMAA, zatiaľ čo výška alebo obsah plochy pod píkom slúži na kvantifikáciu. Charakteristické pravidlá EI fragmentácie jednotlivých PMAA sa dajú zhrnúť do pár krokov:

- Primárne fragmenty vznikajú štiepením alditolového reťazca
- Náboj zostáva prednostne na uhlíku nesúcom metoxy- skupinu
- Fragmentácia medzi susednými uhlíkmi nesúcimi metoxy- skupiny je pravdepodobnejšia ako medzi metoxy- a acetoxi a táto sa bude štiepiť s vyššou pravdepodobnosťou ako medzi uhlíkmi nesúcimi dve acetoxi- skupiny
- Sekundárne fragmenty vznikajú štiepením neutrálnych molekúl – metanolu a kyseliny octovej
- Pri deuterovaných PMAA majú fragmenty obsahujúce anomerický uhlík párne čísla.

Určenie štruktúry cyklického usporiadania (furanóza, pyranóza)

Metylačná analýza je doposiaľ veľmi silným nástrojom štruktúrnej analýzy sacharidov, avšak niektoré informácie sa pri nej strácajú. Neposkytuje napríklad informácie o sekvenácii jednotlivých sacharidov v reťazci a nie je schopná rozlíšiť 4-O aldopyranózy od 5-O-aldofuranóz a problémom je aj analýza ketóz. Výsledky metylačnej analýzy je nevyhnutné kombinovať s inými postupmi. NMR analýza môže byť v týchto prípadoch veľmi nápomocná, avšak v niektorých prípadoch môže byť problém s citlivosťou tejto techniky.

Z hľadiska citlivosti môže byť významnejším redukčné štiepenie. Metylované monosacharidy sa redukčne štiepia pomocou trietylsilánu a TMS-O-mesylátu/BF₃-eterátu za vzniku odpovedajúcich anhydrocukrov, ktoré sa následne acetylujú. Výsledkom sú rozdielne reakčné produkty u furanózových a pyranózových štruktúr. Porovnanie výsledkov s výsledkami metylačnej analýzy zvyšuje komfort pri stanovovaní štruktúry EPS.

Konfigurácia glykozidickej väzby na anomérnom uhlíku (α - alebo β -) sa obvykle určuje pomocou NMR analýzy. Väčšina α - anomérnych vodíkov v ¹H NMR má posuny v oblasti 5.1-5.8 ppm, zatiaľ čo β - anomérne vodíky majú posuny v oblasti 4.3-4.8 ppm. Podobne pri ¹³C NMR α - anomérne uhlíky majú posuny v oblasti 95-103 ppm a β - anomérne uhlíky nájdeme v oblasti 101-105 ppm. NMR spektroskopia je silnou technikou pri riešení štruktúry polysacharidov, avšak jej citlivosť nie je vysoká. Preto je v prípade malých množstiev vzoriek výhodné použitie oxidácií. Napríklad acetylovaný reťazec aldopyranóz v β - konfigurácii je rýchlo oxidovaný pôsobením CrO₃, ale u α - konfigurácie beží táto reakcia kvôli priestorovému usporiadaniu veľmi pomaly.

Sekvenčné usporiadanie monosacharideckých jednotiek v reťazci a určenie opakujúcich sa jednotiek sa realizuje obvykle degradáciou EPS na menšie štruktúrne jednotky a následnou analýzou pomocou hmotnostnej spektrometrie (MS) v kombinácii

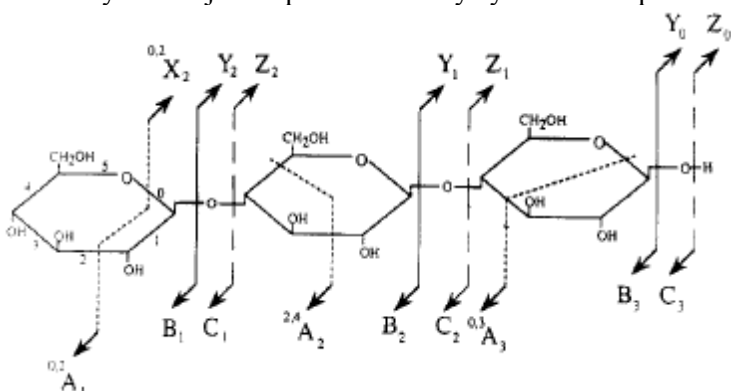
s NMR, ak je to možné. Jedným zo spôsobov postupnej degradácie EPS je parciálna hydrolýza v kyslom prostredí. Základnou filozofiou tejto metódy je, že niektoré usporiadania sacharidov sa štiepia rýchlejšie, iné sú naopak voči hydrolýze stabilnejšie. Napríklad furánózové usporiadania a deoxycukry hydrolyzujú rýchlo. 6-deoxyhexózy potrebujú približne 5- násobne menej času na odštiepenie ako odpovedajúce hexózy. Parciálna hydrolýza metylovaných EPS prináša aj užitočné informácie o vetvení EPS. Vznikajúce menšie štruktúrne jednotky (hexa-, penta-, tetra-, tri-, disacharidy, a pod.) môžu byť analyzované priamo, alebo podrobené ďalším reakciám (redukcia, oxidácia, atď), ktorých vhodným výberom alebo kombináciou sa môžeme v konečnom dôsledku dopracovať až k stanoveniu opakujúcich sa štruktúrnych jednotiek a teda aj k celkovej štruktúre EPS.

Metanolýzou permetylovaných EPS dostávame metylglykozidy redukujúcich koncov. Opäť jednotlivé glykozidické väzby majú rôznu odolnosť voči metanolýze. Monitorovanie vzniku produktov v čase a počet voľných hydroxylových skupín na vznikajúcich permetylovaných metylglykozidoch dáva informácie o sekvenácii a vetvení EPS.

Ďalším spôsobom môže byť acetolýza, ktorej podliehajú 1,6- vetvené EPS, avšak 1,2- a 1,3- vetvené sú voči nej stabilné.

Reakčné produkty spomenutých vyššie opísaných metód sa obvykle analyzujú pomocou MS s vhodnou ionizačnou technikou (ESI, MALDI). Systematické názvoslovie produktov fragmentácie v MS bolo navrhnuté prof. Costello.

- Fragmenty obsahujúce neredukujúci koniec sa označujú písmenami A, B, C, ...
- Fragmenty obsahujúce redukujúci koniec sa označujú písmenami X, Y, Z, ...
- A a Z ióny označujú štiepenie vo vnútri cyklického usporiadania sacharidovej jednotky



Fragmenty B_x nájdeme poväčšine u metylovaných a acetylovaných oligosacharidov, zatiaľ čo u natívnych prevažuje vznik C_x, ale často v dôsledku prenosov vodíka sú to neutrálne straty.

PodĎakovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Analýza štruktúry exopolysacharidu pochádzajúceho z *Lactobacillus reuteri* DSM 17938

Pätoprstý V¹., Tkáčiková L²., Bystrický P¹., Vlčková S¹., Farkašová E¹.

¹ Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava

² Ústav imunológie UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice

Baktérie mliečneho kvasenia (LAB), vrátane druhov *Lactobacillus* produkujú exopolysacharidy (EPS), ktoré sa používajú ako prísady v potravinárskom a mliekarenskom priemysle kvôli ich fyzikálno- chemickým vlastnostiam (stabilizátory, emulgátory , sladidlá , ...). LAB využívajú extracelulárne glukancukrázy a glukozyltransferázy, ktoré používajú ich prirodzený substrát sacharózu na syntézu EPS, tvorených α -D-glukózami viazanými spolu rôznymi glykozidickými väzbami. Skúmanie štruktúry LAB homopolysacharidov produkovaných špecifickými glukancukrázovými enzýmami je ešte len v začiatkoch. Realizované boli počiatočné štúdie pre zopár dextránových a reuteránových typov EPS. V našej štúdii sme sa zamerali na EPS, izolovaný z *L.reuteri* DSM 17938.

Použité analytické postupy

Analýza monosacharidov

Vzorka izolovaného EPS bola hydrolyzovaná 2 M kyselinou trifluoroctovou počas 1 h pri 120 °C za účelom kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy neutrálnych monosacharidov. Po totálnej hydrolýze boli monosacharidy redukované na odpovedajúce alditoly, peracetylované pomocou anhydride kyseliny octovej s použitím pyridínu ako katalyzátora a analyzované pomocou plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou [1] (Trace GC Ultra s kolónou Restek RT-2330-NB (0.32 mm x 105 m) a TSQ Quantum XLS hmotnostným spektrometrom - Thermo Scientific, USA). Teplotný program 80 °C (12 min) - 160 °C (8 °C/min) - 250 °C (4°C/min), 25 min at 250 °C - 265 (20 °C/min), 10 min at 265°C, použitý nosný plyn bol helium s prietokom 1 mL/min, EI ionizácia pri 70 eV, 200 μ A.

Analýza glykozidických väzieb

Vzorka izolovaného EPS (~5 mg) bola rozpustená v suchom DMSO a metylovaná za pôsobenia metyljodidu v prítomnosti NaOH [3]. Permetylovaný EPS bol extrahovaný z reakčnej zmesi chloroformom a po pridaní s Na₂SO₃ vysušený do sucha. Hydrolýza sa realizovala 90% kyselinou mravčou pri 100 °C počas 1h, následne s 2M TFA pri 120 °C 1h. Po deuterovanej redukcii a acetylácii sa vzniknuté permetylované alditol acetáty analyzovali pomocou plynovej chromatografie s hmotnostným detektorom [2] (Trace GC Ultra s kolónou Restek RT-2330-NB (0.32 mm x 105 m) a TSQ Quantum XLS hmotnostným spektrometrom - Thermo Scientific, USA). Teplotný program 80 °C (12 min) - 160 °C (8 °C/min) - 250 °C (4°C/min), 25 min at 250 °C - 265 (20 °C/min), 10 min at 265°C, použitý nosný plyn bol helium s prietokom 1 mL/min, EI ionizácia pri 70 eV, 200 μ A.

Určenie mólovej hmotnosti (M_w)

Mólová hmotnosť EPS bola určená pomocou high performance size exclusion chromatografie. Analýzy sa realizovali na prístroji Shimadzu (Japan) s diferenciálnou refraktometrickou detekciou RID-6A a UV-Vis detekciou SPD-10AV v pripojení dvoch kolón HEMA-BIO 300 a HEMA-BIO 1000 (8 mm × 250 mm, particle size 10 μ m). Mobilnou

fázou bol 0.02 M fosfátový pufor pH 7.2 obsahujúci 0.1 M NaCl s prietokom 0.8 mL/min. Na kalibráciu boli použité dextransové štandardy (Gearing Scientific, Polymer Lab Ltd., UK).

Nukleárna magnetická spektroskopia (NMR)

NMR spektrá boli namerané na približne 30 mg vzorky EPS. Pred samotným nariadením do 600 μ l "100 %" D_2O boli premyté dvakrát s 1 ml of D_2O . 1H and ^{13}C chemické posuny boli prepočítané na pridaný interný standard acetón (δ 2.225, 31.08 ppm). Použitý prístroj bol Varian VNMRs 600 MHz spektrometer pri 25 °C: 1D 1H s a bez saturácie s HOD rezonanciou, a priame ^{13}C spectra, 2D homonukleárne: 1H - 1H gradientové COSY, TOSCY (pri 40, 80 a 150 ms), 2D heteronukleárne: 1H - ^{13}C HSQC a 1H - ^{13}C HMBC s 180° ^{13}C adiabatickými pulzami.

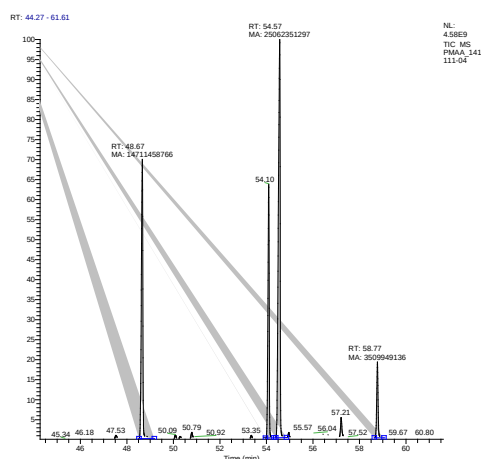
Výsledky

Analýza monosacharidov

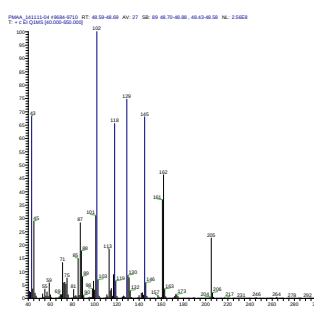
Kvalitatívne a kvantitatívne zloženie EPS izolovaného z *L.reuteri* DSM 17938 bolo analyzované pomocou GC-MS po peracetylácii a kompletnej hydrolýze polysacharidového reťazca. Získané výsledky ukazujú, že skúmaný EPS patrí medzi homologické polysacharidy a pozostáva len z glukózy.

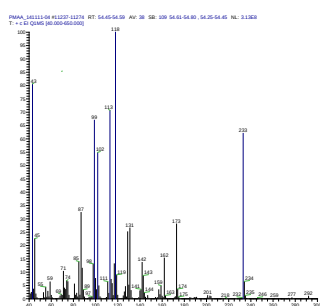
Analýza glykozidických väzieb

Metylačná analýza väzobnej štruktúry EPS bola realizovaná použitím postupov metódy Ciucanu, Kerek [3]. Permetylovaný EPS bol vystavený kyslej hydrolýze, redukcii a acetylácii a vzniknuté permetylované alditol acetáty boli analyzované pomocou GC-MS. Na základe získaných výsledkov sme zistili, že *L.reuteri* DSM 17938 patrí k tzv. reuteranovému typu homo- EPS. V molecule obsahuje prevazne 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucitol a 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-glucitol. 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucitol reprezentuje a neredukujúci koniec molekuly EPS a 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-glucitol naznačuje prítomnosť lineárnych glykozidických väzieb v pozíciách (1→6). Okrem toho sa *L.reuteri* DSM 17938 EPS obsahuje aj 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-glucitol a 1,4,5,6-tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-glucitol. Prítomnosť týchto dvoch zlúčenín naznačuje, že *L.reuteri* DSM 17938 je relatívne lineárny polysacharid so striedajúcimi sa lineárnymi väzbami (1→4) a (1→6) občas prerušený rozvetvením (1→4, 6). Avšak podľa vysokého pomeru terminálnych neredukujúcich koncov, štruktúra bude pravdepodobne oveľa komplikovanejšia a s najväčšou pravdepodobnosťou tento EPS nebude obsahovať pravidelnú opakujúcu sa jednotku.

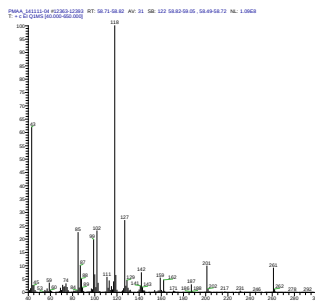


Chromatogram získaný z metylačnej analýzy *L.reuteri* DSM 17938





→4)-Glc-(1→

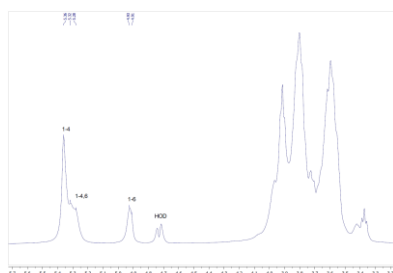


→4,6)-Glc-(1→

	PMAA	Retention time (min)	Mass fraction (m/z)	Glycosidic linkage	Relative molar ratio
EPS					
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	48.67	43, 45, 71, 87, 102, 118, 129, 145, 162, 205	Glc-(1→	3.58
	2,3,4-Me ₃ -Glc	54.10	43, 45, 71, 87, 99, 102, 118, 129, 159, 162, 173, 189, 233	→6)-Glc-(1→	3.94
	2,3,6-Me ₃ -Glc	54.57	43, 45, 87, 99, 102, 113, 118, 129, 131, 162, 173, 233	→4)-Glc-(1→	9.34
	2,3-Me ₂ -Glc	58.77	43, 85, 87, 99, 102, 118, 127, 159, 162, 201, 261	→4,6)-Glc-(1→	1.00

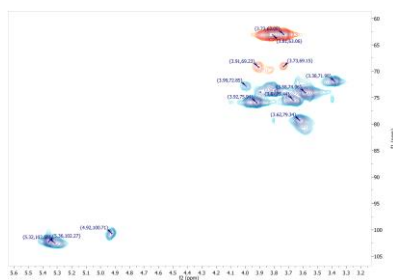
NMR spektroskopia

1D ¹H spektrum polysacharidu izolovaného z *L. reuteri* DSM 17938 takmer úplne odpovedá EPS z *L. reuteri* 35-5 [4]. Polysacharid obsahuje 1→4, 1→6 viazanú α-D-glukózu a vetvené jednotky v pozíciách (1→4,6) α-Glc. Výsledky sa zhodujú aj s metylačnou analýzou. Spektrá boli namerané pri 600 MHz. Anomérne posuny 5.36, 5.32, 5.28, 4.93 a 4.91 ppm odpovedajú posunom anomérnych vodíkov α-D-Glcp v nasledovnom poradí: -(1→6)-α-D-Glcp-(1→4)- a α-D-Glcp-(1→4)-; -(1→4)-α-D-Glcp-(1→4)-; -(1→4,6)-α-D-Glcp-; -(1→4)-α-D-Glcp-(1→6)- a α-D-Glcp-(1→6)-.



600 MHz 1D ¹H spectrum of EPS from *L. reuteri* DSM 17938 strain at 25 °C in D₂O with presaturation of HOD resonance.

Priradenie všetkých α - D - Glc väzieb bolo robené na základe 2D COSY , TOCSY , 2D HSQC a HBMBC spektier vrátane ¹³C NMR. Výsledky a väzbové usporiadanie z 3 - väzbových HMBC píkov odpovedá výsledkom metylačnej analýzy . Bohužiaľ , z dôvodu prekryvania protónových a uhlíkových rezonancií nebolo možné odhadnúť percentuálne množstvo každého typu väzby Glc ani v 1D ¹H ani v 2D HSQC . Tieto hodnoty sa však môžu odhadnúť z metylačnej analýzy.



2D ¹H-¹³C HSQC spectrum with multiplicity editing of EPS from *L. reuteri* DSM 17938 strain at 25 °C in D₂O. Blue contours indicate positive (CH groups), red contours indicate (CH₂ groups e.g. C6-H6 groups).

Určenie mólovej hmotnosti

Zdanlivá molekulová hmotnosť bola stanovená pomocou

vysoko účinnej chromatografie na princípe size- exclusion a jej hodnota je 6,5 x 10⁵ Da.

Literatúra

- [1] H.N. Englyst, J.H. Cummings, Simplified method for the measurements of total nonstarch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*. 109 (1984) 937–942.
- [2] P.E. Jansson, L. Kenne, H. Liedgren, B. Lindberg, J. Lonngren, *Chem. Commun. Univ. Stockholm* 8 (1976) 1–75.
- [3] I. Ciucanu, F. Kerek, A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **131** (1984) 209–217.
- [4] S.S. van Leeuwen, S. Kralj, I.H. van Geel-Schutten, G.J. Gerwig, L. Dijkhuizen and J.P. Kamerling, Structural analysis of the α-D-glucan (EPS35-5) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 35-5 glucanase GTFA enzyme, *Carbohydr. Res.* **343** (2008) 1251–1265.

PodĎakovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Stanovenie štruktúry exopolysacharidu produkovaného *Lactobacillus reuteri* L26 pomocou NMR a hmotnostnej spektrometrie

Pätoprstý V¹., Tkáčiková L²., Bystrický P¹., Vlčková S¹., Farkašová E¹.

¹ Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava

² Ústav imunológie UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice

Baktérie mliečneho kvasenia (LAB) ako napríklad *Lactobacilli*, produkujú exopolysacharidy (EPS), ktoré sú vylučované do okolia buniek. Kompletná funkcia EPS in vivo nie je úplne objasnená, ale pravdepodobne majú ochrannú funkciu. Ukázalo sa, že EPS sa podieľajú na adhézii, zúčastňujú sa určitých procesov bunkového rozpoznávania, obrany voči dehydratácii, fagocytóze alebo toxínom. Je nepravdepodobné, že EPS sú produkované a slúžia ako potravinová rezerva, keďže väčšina LAB nemá enzýmy katabolizujúce EPS. Fyzikálno-chemické vlastnosti týchto látok súvisiace s ich ochrannou povahou predurčujú použitie týchto látok v potravinárskom a mliekarenskom priemysle zahusťovadlá, stabilizátory a želirujúce látky. Väčšina doteraz publikovaných štruktúr EPS produkovaných kmeňmi LAB sú heteropolysacharidy s opakujúcimi sa stavebnými jednotkami, zatiaľ čo štruktúra homopolysacharidov nieje natoľko prebádaná. Nedávno boli v kmeňoch *Lactobacillus reuteri* objavené rôzne typy enzýmov glukácukráz, ktoré konvertujú cukrózu na objemné a rôzne vetvené α -D-glukózové reťazce. Pomocou hmotnostnej spektrometrie a NMR sme sa pokúsili stanoviť štruktúru EPS pochádzajúceho z *L.reuteri* L26.

Použité analytické postupy

Analýza monosacharidov

Vzorka izolovaného EPS bola hydrolyzovaná 2 M kyselinou trifluoroctovou počas 1 h pri 120 °C za účelom kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy neutrálnych monosacharidov. Po totálnej hydrolýze boli monosacharidy redukované na odpovedajúce alditoly, peracetylované pomocou anhydride kyseliny octovej s použitím pyridínu ako katalyzátora a analyzované pomocou plynovej chromatografie s hmotnostnou detekciou [1] (Trace GC Ultra s kolónou Restek RT-2330-NB (0.32 mm x 105 m) a TSQ Quantum XLS hmotnostným spektrometrom - Thermo Scientific, USA). Teplotný program 80 °C (12 min) - 160 °C (8 °C/min) - 250 °C (4°C/min), 25 min at 250 °C - 265 (20 °C/min), 10 min at 265°C, použitý nosný plyn bol helium s prietokom 1 mL/min, EI ionizácia pri 70 eV, 200 μ A.

Analýza glykozidických väzieb

Vzorka izolovaného EPS (~5 mg) bola rozpustená v suchom DMSO a metylovaná za pôsobenia metyljodidu v prítomnosti NaOH [3]. Permetylovaný EPS bol extrahovaný z reakčnej zmesi chloroformom a po pridaní s Na₂SO₃ vysušený do sucha. Hydrolýza sa realizovala 90% kyselinou mravčou pri 100 °C počas 1h, následne s 2M TFA pri 120 °C 1h. Po deuterovanej redukcii a acetylácii sa vzniknuté permetylované alditol acetáty analyzovali pomocou plynovej chromatografie s hmotnostným detektorom [2] (Trace GC Ultra s kolónou Restek RT-2330-NB (0.32 mm x 105 m) a TSQ Quantum XLS hmotnostným spektrometrom - Thermo Scientific, USA). Teplotný program 80 °C (12 min) - 160 °C (8 °C/min) - 250 °C (4°C/min), 25 min at 250 °C - 265 (20 °C/min), 10 min at 265°C, použitý nosný plyn bol helium s prietokom 1 mL/min, EI ionizácia pri 70 eV, 200 μ A.

Určenie mólovej hmotnosti (M_w)

Mólová hmotnosť EPS bola určená pomocou high performance size exclusion chromatografie. Analýzy sa realizovali na prístroji Shimadzu (Japan) s diferenciálnou

refraktometrickou detekciou RID-6A a UV-Vis detekciou SPD-10AV v pripojení dvoch kolón HEMA-BIO 300 a HEMA-BIO 1000 (8 mm × 250 mm, particle size 10 µm). Mobilnou fázou bol 0.02 M fosfátový pufoer pH 7.2 obsahujúci 0.1 M NaCl s prietokom 0.8 mL/min. Na kalibráciu boli použité dextransové štandardy (Gearing Scientific, Polymer Lab Ltd., UK).

Nukleárna magnetická spektroskopía (NMR)

NMR spektrá boli namerané na približne 30 mg vzorky EPS. Pred samotným nariadením do 600 µl "100 %" D₂O boli premyté dvakrát s 1 ml of D₂O. ¹H and ¹³C chemické posuny boli prepočítané na pridaný interný standard acetón (δ 2.225, 31.08 ppm). Použitý prístroj bol Varian VNMRs 600 MHz spektrometer pri 25 °C: 1D ¹H s a bez saturácie s HOD rezonanciou, a priame ¹³C spectra, 2D homonukleárne: ¹H-¹H gradientové COSY, TOSCY (pri 40, 80 a 150 ms), 2D heteronukleárne: ¹H-¹³C HSQC a ¹H-¹³C HMBC s 180° ¹³C adiabatickými pulzami.

Výsledky

Analýza monosacharidov

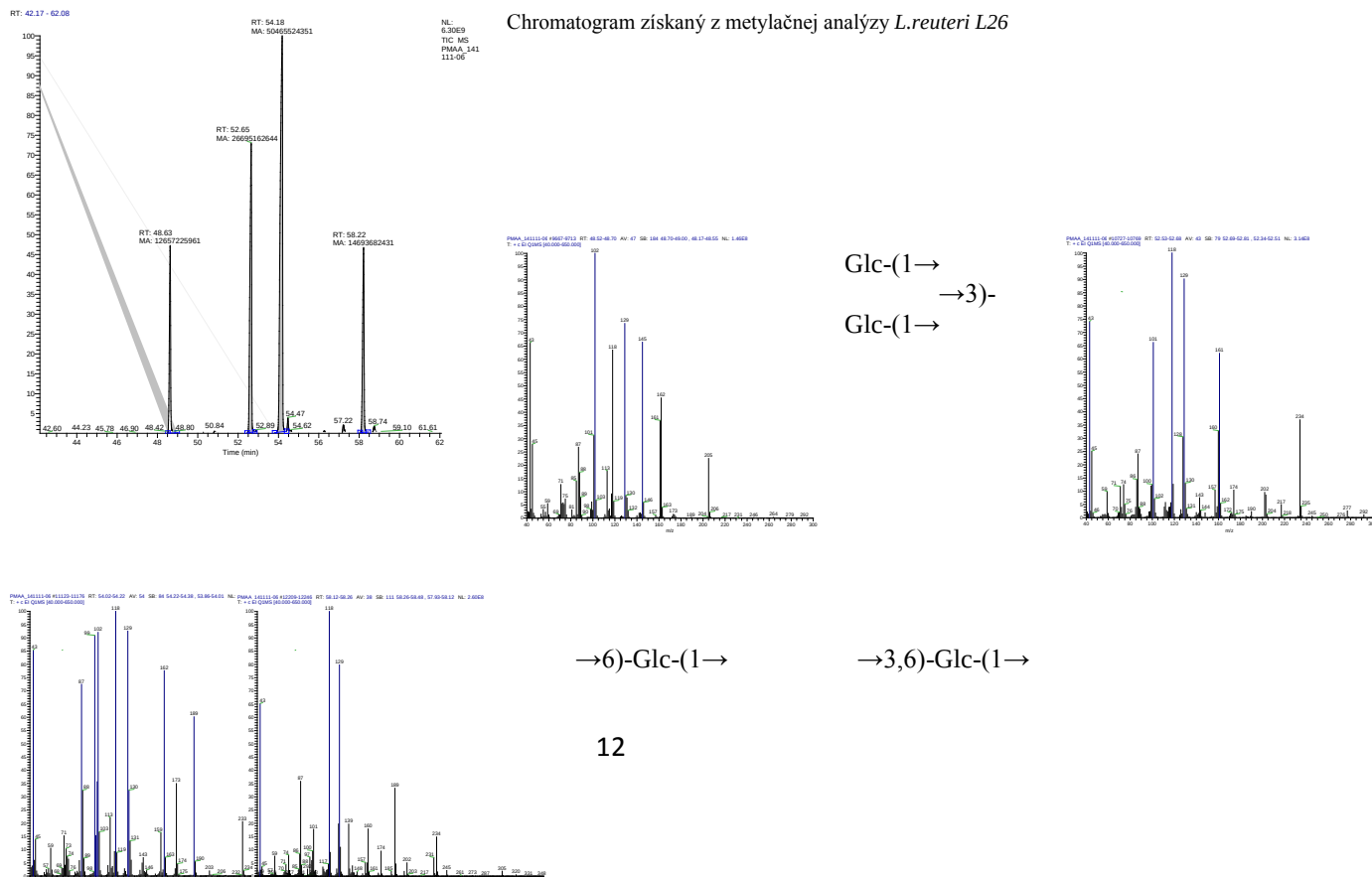
Kvalitatívne a kvantitatívne zloženie EPS izolovaného z *L.reuteri* L26 bolo analyzované pomocou GC-MS po peracetylácii a kompletnej hydrolýze polysacharidového reťazca. Získané výsledky ukazujú, že skúmaný EPS patrí medzi homologické polysacharidy a pozostáva len z glukózy.

Analýza glykozidických väzieb

Metylačná analýza glykozidických väzieb EPS bola realizovaná použitím postupov metódy Ciucanu, Kerek [3]. Permetylovaný EPS bol vystavený kyslej hydrolýze, redukcii a acetylácii a vzniknuté permetylované alditol acetáty boli analyzované pomocou GC-MS. Na základe získaných výsledkov sme zistili, že *L.reuteri* L26 patrí k tzv. alternanovému typu homo-EPS. V molecule obsahuje prevazne 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-metyl-glucitol a 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-metyl-glucitol.

1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-metyl-glucitol reprezentuje a neredukujúci koniec molekuly EPS a 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-metyl-glucitol naznačuje prítomnosť lineárnych glykozidických väzieb v pozíciách (1→6). Okrem toho sa *L.reuteri* L26 EPS obsahuje aj 1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-metyl-glucitol a 1,3,5,6-tetra-O-acetyl-2,4-di-O-metyl-glucitol, ktoré odpovedajú glykozidickým väzbám (1→3) a (1→3, 6). *L.reuteri* L26 je tvorená glukózou spojenou glykozidovými väzbami (1 → 3) a (1 → 6) v pomere 1,3: 1, a je pomerne výrazne rozvetvená.

Chromatogram získaný z metylačnej analýzy *L.reuteri* L26

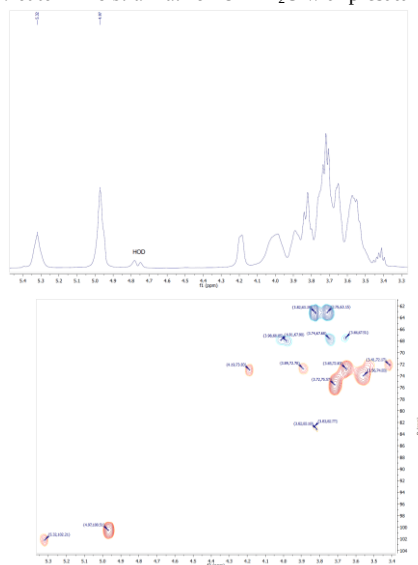


EPS	PMAA	Retention time (min)	Mass fraction (m/z)	Glycosidic linkage	Relative molar ratio
<i>L.reuteri</i> L26	2,3,4,6-Me ₄ -Glc	48.63	43, 45, 71, 87, 102, 118, 129, 145, 162, 205	Glc-(1→	0.86
	2,4,6-Me ₃ -Glc	52.65	43, 45, 71, 87, 101, 118, 129, 161, 201, 202, 234	→3)-Glc-(1→	2.86
	2,3,4-Me ₃ -Glc	54.18	43, 45, 71, 87, 99, 102, 118, 129, 159, 162, 173, 189, 233	→6)-Glc-(1→	3.72
	2,4-Me ₂ -Glc	58.22	43, 87, 118, 129, 189, 202, 234, 305	→3,6)-Glc-(1→	1.00

NMR spektroskopia

1D ¹H spektrum EPS z *L.reuteri* L26 takmer presne zodpovedalo spektru získanému z *L.reuteri* 180 [4]. EPS z *L.reuteri* 180 obsahuje 1 → 3, 1 → 6 spojené α-D-glukózy a rozvetvené (1 → 3,6) α-Glc. Výsledky sa zhodujú z výsledkymi získanými metylačnou analýzou. Naše spektrum zaznamenané pri 600 MHz obsahuje anomérne píky pri 5.32, 4.97 a 4.95 ppm, ktoré patria do oblasti anomerných protónov α-D-Glc a odpovedajú -(1→6)-α-D-Glcp-(1→3)-; -(1→3)-α-D-Glcp-(1→6)- a -(1→3,6)-α-D-Glcp-(1→6)-; -(1→6)-α-D-Glcp-(1→6)- a α-D-Glcp-(1→6)- viazaným glukopyranózam. Štruktúra všetkých α-D-Glc typov väzieb bola vyhodnotená z výsledkov 2D COSY, TOCSY, 2D HSQC a HBMG spektrier, vrátane ¹³C. Výsledky sú v zhode z metylačnou analýzou. Bohužiaľ percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov väzieb máme stanovené iba na základe metylačnej analýzy, keďže či už v 1D ¹H alebo 2D HSQC spektre dochádza k prekryvu vodíkov a uhlíkov.

600 MHz 1D ¹H spectrum of EPS from *L.reuteri* L26 strain at 25 °C in D₂O with presaturation of HOD resonance.



2D ¹H-¹³C HSQC spectrum with multiplicity editing of EPS from *L.reuteri* L26 strain at 25 °C in D₂O. Blue contours indicate positive (CH groups), red contours indicate (CH₂ groups e.g. C6-H₆ groups).

Určenie mólovej hmotnosti

Zdanlivá molekulová hmotnosť bola stanovená pomocou vysoko účinnej chromatografie na princípe size- exclusion a jej hodnota je 8.2 x 10⁵ Da.

Literatúra

[1] H.N. Englyst, J.H. Cummings, Simplified method for the measurements of total nonstarch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. Analyst. 109 (1984) 937–942.

- [2] P.E. Jansson, L. Kenne, H. Liedgren, B. Lindberg, J. Lonngren, Chem. Commun. Univ. Stockholm 8 (1976) 1–75.
- [3] I. Ciucanu, F. Kerek, A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydr. Res. **131** (1984) 209–217.
- [4] S.S. van Leeuwen, S. Kralj, I.H. van Geel-Schutten, G.J. Gerwig, L. Dijkhuizen and J.P. Kamerling, Structural analysis of the α -D-glucan (EPS180) produced by the *Lactobacillus reuteri* strain 180 glucansucrase GTF180 enzyme, Carbohydr. Res. **343** (2008) 1237–1250.

PodĎakovanie

Tento príspevok vznikol vĎaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Cyklické peptidy ako antibiotiká budúcnosti

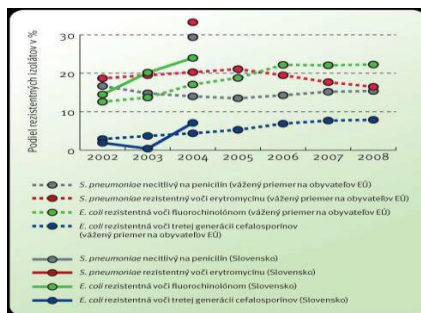
Pätoprstý V., Vlčková S., Farkašová E.

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

Celosvetový medicínsky a farmaceutický priemysel bojuje v súčasnosti s viacerými naliehavými problémami:

1. Rezistencia voči existujúcim antibiotikám.
2. Sťahovanie existujúcich liekov a farmaceutických výrobkov z trhu kvôli ich čistote.
3. Sťahovanie existujúcich liekov a farmaceutických výrobkov z trhu kvôli ich vedľajším účinkom.

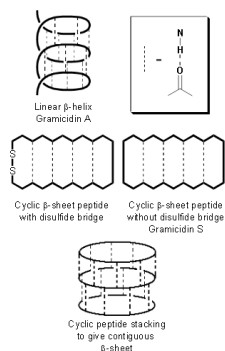
Jedným s vážnych problémov súčasnej medicíny v Európe a vo svete je rezistencia choroboplodných mikroorganizmov voči dostupným antibiotikám, ktorá má stúpajúcu tendenciu. V mnohých krajinách sa miera rezistencie za posledných päť rokov viac než zdvojnásobila [1, 2]. Infekcie baktériami, rezistentnými voči antibiotikám, sťažujú vhodnú liečbu antibiotikami a môžu spôsobovať komplikácie pacientom, čo má za následok dlhší pobyt v nemocnici, závažnejšie ochorenie a niekedy úmrtie.



Trendy rezistencie voči antibiotikám (invazívne infekcie), 2002 – 2008. Zdroj: EARSS, 2009 [3]

Rastúci počet rezistentných mikroorganizmov voči dostupným antibiotikám, opätovný výskyt známych ale aj nových infekčných smrteľných ochorení nevyhnutne vedie k snahe vedeckých a výskumných organizácií vo svete vyvinúť nové účinné lieky [1- 3].

V snahe riešiť toto nebezpečenstvo, výskumníci sledujú niekoľko stratégií, z ktorých jedným je vývoj antibiotík na báze peptidov. Mnoho stavovcov, vrátane ľudí, produkuje antimikrobiálne peptidy ako súčasť ich prirodzeného imunitného systému. Takéto peptidy majú rýchly a smrtiaci účinok a mechanizmus ich pôsobenia je úplne odlišný od bežných syntetických antibiotík. Izolovaných a charakterizovaných bolo už viac ako 400 prírodných antimikrobiálnych peptidov. Na základe chemickej štruktúry môžu byť tieto rozdelené do dvoch hlavných skupín: lineárne a cyklické. Predpokladá sa, že spôsob účinku väčšiny týchto peptidov zahŕňa rozrušenie bunkových membrán, vedúce k narušeniu celistvosti buniek. Lineárne peptidy, ako napríklad magainíny a melitíny, existujú prevažne ako α - helixové amfipatické štruktúry (obsahujúce segregované hydrofóbne a hydrofilné skupiny) alebo ako β - helixy (gramicidín A). Cyklické peptidy majú hlavne amfipatickú štruktúru typu β – list a ďalej sa delia do dvoch podskupín: tie, ktoré obsahujú disulfidové väzby, ako je napríklad tachyplesin, a tie, ktoré ich nemajú, ako je napríklad gramicidín S.



Takmer všetky známe prírodné cyklické peptidy vykazujú veľkú antibakteriálnu aktivitu. Avšak, mnoho z nich je tiež vysoko hemolytických, a nemajú selektivitu potrebnú pre ľudské antibiotiká. Úsilie vyvinúť cyklické peptidy ako antibiotiká in vivo boli zamerané na vývoj analógov, ktoré pôsobia selektívne na bakteriálne bunky a nepoškodzujú erytrocyty. Pri návrhu takýchto analógov je nevyhnutná dokonalá znalosť sekundárnej proteínovej štruktúry, ako aj od povahy aminokyselinových interakcií s lipidickými membránami.

V prírode možno nájsť pomerne značné množstvo príkladov antibiotických peptidov vykazujúcich obmedzenú štruktúrnú konformáciu. Priestorové usporiadanie cyklických peptidov so štruktúrou typu β -list môže byť v dôsledku tvorby disulfidových mostíkov medzi aminokyselinami v cykle alebo naprieč cyklom striktné určené. Tachyplesíny, polyphemusíny, bactenecíny a protegríny sú typickými príkladmi peptidov s disulfidickými mostíkmi. Tachyplesin I je tvorený 17-timi aminokyselinami usporiadanými do cyklickej antiparalelnej štruktúry β -listu. Dva priečne sulfidické mostíky medzi cysteínmi sú zodpovedné za konečnú konformáciu tejto molekuly, tzv. typ II, β -turn. Tieto priečne väzby určujú zároveň sekundárnu štruktúru peptidu vo vodnom roztoku a v kyslých fosfolipidových membránach, na rozdiel od α -helixov, ktoré tvoria sekundárnu štruktúru až po naviazaní na membránu. Tachyplesin však nie je dokonale amfipatický, keďže pozitívne časti arginínu vytŕčajú aj na hydrofilnú aj na hydrofóbnú stranu. Predpokladá sa, že tachyplesin prechádza cez bunkovú membránu prostredníctvom elektrostatických a hydrofóbných interakcií, ale presný mechanizmus nie je známy. Výskumy ukazujú, že antibiotická účinnosť, ale aj mechanizmus pôsobenia peptidov so sulfidickými mostíkmi a acyklických štruktúr je rozdielny. Acyklické peptidy majú obvykle slabšiu antibiotickú aktivitu. Avšak, usporiadanie záporne nabitých častí lipidickej dvojvrstvy membrány je silnejšie narušené acyklickým analógom ako cyklickým. Predpokladá sa, že malý počet cyklických peptidov sa po naviazaní na záporne nabitú časť lipidickej dvojvrstvy zhlukne a pospája, čím sa umožní permeácia ďalších molekúl cez aniónovo-selektívne póry. Nakoniec sa nestabilné póry rozpadnú, a peptidové molekuly nachádzajúce sa na oboch stranách lipidickej dvojvrstvy pravdepodobne narušia integritu membrány. Aj napriek tomu, že acyklické peptidy sa viažu na vonkajšiu stranu lipidickej dvojvrstvy oveľa lepšie ako cyklické, vytvorenie sekundárnej štruktúry β -listu na povrchu zabraňuje tvorbe pórov a translokácii cez membránu. Predpokladá sa, že β -list následne destabilizuje dvojvrstvu tým, že naruší organizáciu karbonylových častí lipidov a neutralizuje celkový náboj povrchu membrány. Vyššia amfifilická povaha peptidu má za následok nižšiu membránovú aktivitu a takéto peptidy sa pevnejšie viažu na membránu.

Pomerne významná časť výskumu sa orientuje na systematické štúdium štruktúry a aktivity analógov prírodných cyklopeptidov. Pokúšajú sa modifikovať dĺžku kruhu nahrádzajú jednotlivé aminokyseliny za iné, prípadne naväzujú na cyklus iné funkčné skupiny za účelom, nájsť antibiotikum s podobným antibakteriálnym účinkom, avšak menšími vedľajšími účinkami. Ukazuje sa, že jedine peptidy s β -listovou štruktúrou vykazujú aktivitu voči gram-negatívnym aj gram-pozitívnym baktériám. Takmer všetky modifikácie veľkosti kruhu znižujú hemolytickú aktivitu. Podrobná štúdia bolo tiež vykonaná na určenie

optimálnej rovnováhy hydrofóbných a hydrofilných domén nutných pre vysokú bakteriálnu aktivitu a nízku hemolytickú aktivitu. V peptide tvorenom 14-timi aminokyselinami boli, systematicky nahrádzané jednotlivé aminokyseliny a vytvárané enantioméry s rôznym amfipatickým charakterom molekuly. Hemolytická aktivita súvisela s celkovou amfipaticitou molekuly; jej zníženie prípadne zníženie hydrofóbnosti peptidu znižovalo hemolytickú aktivitu. Pri takejto úprave fyzikálnych vlastností peptidu sa zároveň zvyšovala aj aktivita voči Gram-negatívnym baktériám. Pri pokusoch s gram-negatívnymi aj gram-pozitívnymi baktériami, sa ukázalo, že iba peptidy s vhodnou väzbovou afinitou k vonkajšej membráne sú schopné preniknúť cez cytoplazmatickú membránu.

Aj keď antibiotické peptidy vykazujú široké spektrum aktivít voči baktériám, mnoho z nich nie je selektívnych pre bakteriálne infekcie cicavčích buniek. Bez znalosti presného spôsobu pôsobenia jednotlivých cyklických peptidov, je ťažké navrhnúť selektívne peptidické antibiotiká. Avšak, prírodné antibiotické cyklické peptidy a ich syntetické analógy ukázali, čo je nevyhnutné pre požadovanú aktivitu a selektivitu:

organizovaná štruktúra molekuly

vhodná úprava pomeru hydrofilnej a hydrofóbnej časti molekuly

[1] European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual Report 2007. Bilthoven, Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment, 2008. http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring_reports/.

[2] Cars O, Högberg LD, Murray M, et al. Meeting the challenge of antibiotic resistance. BMJ 2008;337:a1438. doi: 10.1136/bmj.a1438.

[3] European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Interactive database. <http://www.rivm.nl/earss/database/>.

Pod'akovanie

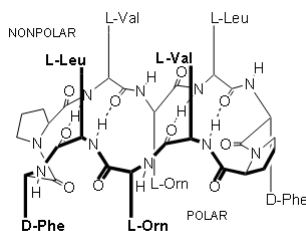
Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Fragmentácia Gramicidínu S pomocou kolíziou indukovanej disociácie

Pätoprstý V., Vlčková S., Farkašová E.

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

Rezistencia baktérií voči bežne používaným antibiotikám sa stala celosvetovým problémom. Vývoj nových účinných látok v rámci farmaceutických firiem negatívne ovplyvňuje ekonomická rentabilita takéhoto procesu, časová náročnosť, technické vybavenie a často i odbornosť. Hľadanie nových antibiotík sa z veľkej časti presunulo do vedeckých inštitúcií. V posledných rokoch vzbudzujú pozornosť hlavne vlastnosti kationových antimikrobiálnych peptidov a cyklopeptidov, medzi ktorými je aj gramicidín S. Výskumu mikrobiálnych a toxických vlastností tejto látky a jej analógov ako i mechanizmu pôsobenia na bunky sa venujú viaceré vedecké tímy. Avšak analytická časť výskumu je pomerne zriedkavá. Gramicidín S je symetrický cyklický dekaeptid tvorený dvoma identickými pentapeptidmi [D-Phe-L-Pro-L-Val-L-Orn-L-Leu]₂ usporiadanými do štruktúry skladaného listu β -sheet, ktorá je stabilizovaná intramolekulovými vodíkovými väzbami. Výskumy ukazujú, že sa jedná o látku s antimikrobiálnymi vlastnosťami, ktorá likviduje nielen gram pozitívne ale aj gram negatívne baktérie a niektoré typy vírusov a húb, zároveň však pravdepodobne napáda aj červené krvinky.



Ionizácia sa realizovala pomocou vyhrievaného elektrospreja (ESI). Prioritne sa tvorili dvojnásobne nabité ióny, v ktorých sa vodíky viazali na voľné amino- skupiny ornitínových reťazcov. K otvoreniu cyklickej štruktúry dochádza na viacerých miestach. Roztrhnutím väzby medzi ornitínom a leucínom dostávame ornitín na C terminálny koniec, roztrhnutím opačnej väzby z valínom dostávame ornitín na N terminálny koniec. Najpravdepodobnejšie je však štiepenie až za prolínom, keďže väzba valín-prolín je pomerne pevná a aj v spektrách tieto odpadávajú väčšinou ako neutrálna strata spolu. Najpravdepodobnejšou štruktúrou po otvorení kruhu je:

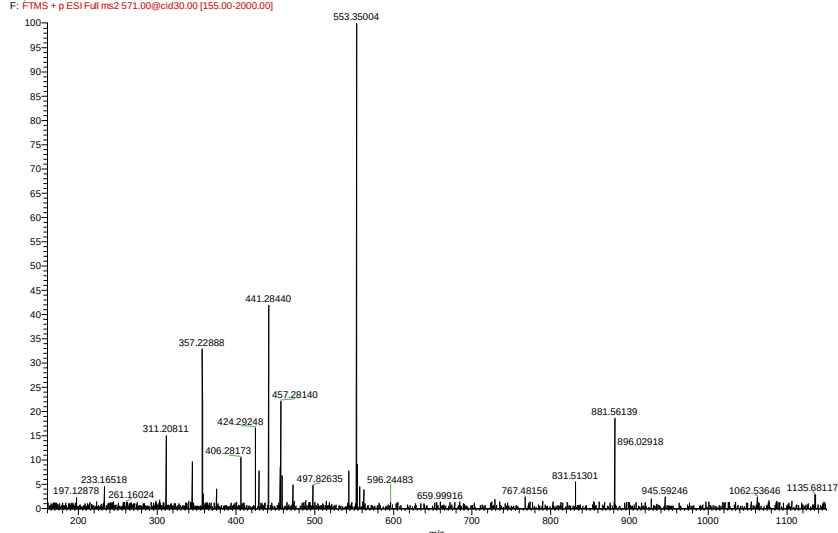
N terminálny koniec

C terminálny koniec



Pri použitej energii 30eV prevažujú fragmenty v nižších oblastiach m/z a A a X ióny po neutrálnych stratách malých molekúl (H₂O, CO, NH₃).

GS_140819-16 #620-625 RT: 18.94-19.08 AV: 6 NL: 1.57E4
F: FTMS + p ESI Full ms2 571.00@cid30.00 [155.00-2000.00]



N term	orn	leu	phe	pro	val	orn	leu	phe	pro	val	C term	Y	B	SPECTRUM - MS					
	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841			1141.713147	GS_140819-16.raw					
		113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841			1027.634434	FTMS + p ESI Full ms2 571.00@cid30.00 [155.00-2000.00]					
			147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841			914.550374	Scan # 617-628					
				97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841			767.481564	RT: 18.84-19.20					
					99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841			670.4292	AV: 11					
						114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841			571.360786	m/z	Intensity	Relative	Charge		
							113.0841	147.0684	97.05276	99.06841			457.281473	571.360786	265.6	2.46	1	1141.697415	
								147.0684	97.05276	99.06841			344.197413	233.16517	449.6	4.16	0	265.40	
									97.05276	99.06841			197.129003	245.12884	140.7	1.3	1		
													100.076239	261.16019	240.1	2.22	1		
															303.13223	136.1	1.26	1	
N term	leu	phe	pro	val	orn	leu	phe	pro	val	orn	C term	Y	B						
	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793			1141.713147	111.20812	1822.9	16.85	1		
		147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793			1028.629687	340.20243	196.2	1.81	0		
			97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793			881.561277	344.19726	1126.4	10.41	1		
				99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793			784.508513	357.22888	375.4	34.71	0		
					114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793			685.440099	358.213059	158.21268	223.1	2.06	1	
						113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793			571.360786	375.23945	552.8	5.11	1		
						147.0684	97.05276	99.06841	114.0793				458.276726	406.20172	1191.6	11.01	0		
							97.05276	99.06841	114.0793				311.208116	424.29247	1838.2	16.88	1		
								99.06841	114.0793				214.155552	429.28653	983.3	9.09	0		
									114.0793				115.087138	441.28443	4099.4	37.89	2	881.561035	
														456.29743	552.5	8.62	0		
														457.28134	2374.5	21.95	1		
N term	val	orn	leu	phe	pro	val	orn	leu	phe	pro	C term	Y	B						
	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276			1141.713147	458.27661	813	7.52	1	1	120top
		114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276			1042.645333	472.29211	494.9	4.57	1		
			113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276			928.56802	474.30782	238.3	2.2	1		
				147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276			815.483196	497.62615	460.2	4.14	0	994.644875	
					99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841			668.41355	502.3026	136.2	1.26	0		
						99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276			571.360786	514.81885	170.3	1.57	2	1028.629875	
							114.0793	113.0841	147.0684	97.05276			472.292372	543.36508	754.6	7.35	0	571.40	
								113.0841	147.0684	97.05276			113.0841	553.35006	10518.1	100	0	571.4020	
									97.05276	99.06841			245.128999	554.33386	951.6	8.8	0	120top	
													98.060589	557.36275	414.6	3.83	0	1113.717675 M-CO	
														562.35337	374.9	3.47	0	1123.702915 M-NH2	
														562.84711	381.2	3.52	0		
N term	phe	pro	val	orn	leu	phe	pro	val	orn	leu	C term	Y	B						
	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841			1141.713147	728.68402	139.1	1.29	0		
		97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841			994.645137	767.48152	238.5	2.2	1		
			99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841			897.592573	831.51301	477.8	4.42	1		
				114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841			798.524219	881.56138	1980.6	18.31	1		
					113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841			684.444846	927.58619	143.4	1.34	1	1945.4020	
						147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841			571.360786	945.59232	354.7	3.28	1		
							97.05276	99.06841	114.0793	113.0841			424.292376	718.429196					
								99.06841	114.0793	113.0841			327.229612	815.48196					
									114.0793	113.0841			228.171198	914.550374					
										113.0841			114.091885	1028.629687					
N term	pro	val	orn	leu	phe	pro	val	orn	leu	phe	C term	Y	B						
	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684			1141.713147	1044.660983	98.060589				
		99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684			945.592569	197.129003					
			114.0793	113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684			831.513156	212.208316					
				113.0841	147.0684	97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684			718.429196	424.292376					
					97.05276	99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276			571.360786	571.360786					
						99.06841	114.0793	113.0841	147.0684	97.05276			474.308022	668.41355					
							114.0793	113.0841	147.0684	97.05276			375.239459	767.481564					
								113.0841	147.0684	97.05276			261.160295	881.561277					
									147.0684				148.076235	994.645337					

Pod'akovanie

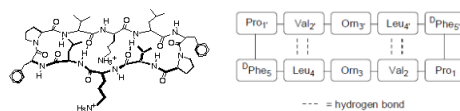
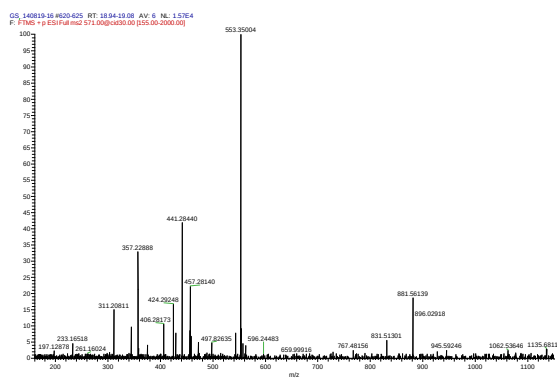
Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Fragmentácia analógov Gramicidínu S pomocou kolíziou indukovanej disociácie

Pätoprstý V., Magdolen P., Vlčková S., Farkašová E.
Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 84538 Bratislava, Slovensko

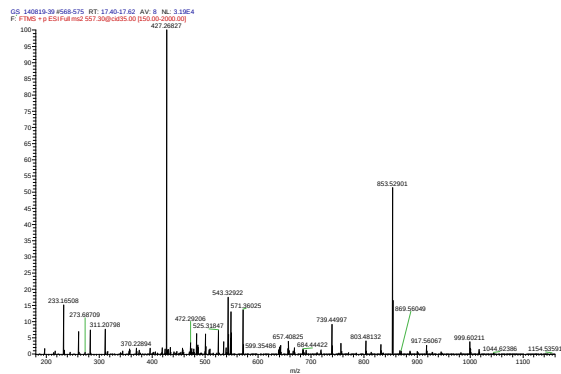
Rastúci počet rezistentných mikroorganizmov voči dostupným antibiotikám, opätovný výskyt známych ale aj nových infekčných smrteľných ochorení nevyhnutne vedie k snahe vedeckých a výskumných organizácií vo svete vyvinúť nové účinné lieky [1- 3]. Antimikrobiálne peptidy sú produkované mnohými mikroorganizmami a sú súčasťou vrodeneho imunitno- obranného mechanizmu organizmov. Podľa posledných výskumov by mohli byť vynikajúcimi kandidátmi na nové terapeutické antibiotiká [4- 8]. Štruktúra, fyzikálne vlastnosti a mechanizmus pôsobenia týchto látok sú v posledných rokoch predmetom základného ale aj aplikovaného výskumu [4- 6]. Existujú v rozmanitých štruktúrnych usporiadaniach (α - helix, β - list, lineárne a cyklické), [6, 7], ale najzaujímavejšie sú kationové ampifilické molekuly. Pravdepodobne primárnym cieľom ich pôsobenia je narušenie štruktúrnej a funkčnej integrity cytoplazmatickej membrány bunky [4- 10]. Výskumy ukazujú, že mnoho z týchto látok je účinných voči rôznym druhom patogénov, avšak môžu mať zároveň aj toxický účinok na hostiteľský organizmus. Mikrobiologické a toxikologické štúdie sú často protichodné, čo zrejme súvisí aj s čistotou skúmaného peptidu. Biosyntetická výroba kationových ampifilických peptidov je často multienzymovým procesom, ktorého sa zúčastňujú neribozomálne syntetázy. Tieto veľké multimodulárne enzýmy tvoriace príslušný peptid obsahujú viac domén zodpovedných za aktiváciu a inkorporáciu špecifických aminokyselín [11]. Najlacnejším spôsobom priemyselnej produkcie takýchto antimikrobiálnych peptidov je biotechnologická výroba priamo z kmeňov baktérií. Keďže však ide o multienzymový proces, tento bude zákonite spojený s problémom čistoty a bude veľmi závislý od fyzikálnych podmienok procesu. Nečistoty a príbuzné látky však výrazne ovplyvňujú účinky antibiotika ako terapeutického látky, môžu byť toxické a môžu spôsobovať nežiaduce účinky u pacientov, aj keď sú prítomné iba v stopových množstvách. V rámci produkcie antibiotík, liekov a farmaceutických výrobkov vôbec, sa stále väčší dôraz kladie na identifikáciu prítomných nečistôt, skúmanie ich vplyvu na zdravie a vyhodnocuje sa bezpečnosť finálneho produktu.

Gramicidín S je symetrický cyklický decapeptid tvorený dvoma identickými pentapeptidmi [D-Phe-L-Pro-L-Val-L-Orn-L-Leu]₂ usporiadanými do štruktúry skladaného listu β - sheet, ktorá je stabilizovaná intramolekulovými vodíkovými väzbami (Obr. 2). Výskumy ukazujú, že sa jedná o látku s antimikrobiálnymi vlastnosťami, ktorá likviduje nielen gram pozitívne ale aj gram negatívne baktérie a niektoré typy vírusov a húb, zároveň však pravdepodobne napáda aj červené krvinky. Avšak za cytotoxické účinky gramicidínu S, ktorých mechanizmus je stále predmetom výskumu [12- 14, 4], alebo na druhej strane aj jeho pozitívne účinky nemusí byť zodpovedná samotná účinná látka, ale niektorý z jej analógov. Kvôli potlačeniu negatívneho efektu sa v posledných rokoch vedci zaoberajú aj prípravou analógov gramicidínu S. Pokúšajú sa modifikovať dĺžku kruhu [16- 18], nahrádzajú jednotlivé aminokyseliny za iné [19], prípadne naväzujú na gramicidínový cyklus iné funkčné skupiny [20] za účelom, nájsť antibiotikum s podobným antibakteriálnym účinkom, avšak menšími vedľajšími účinkami.

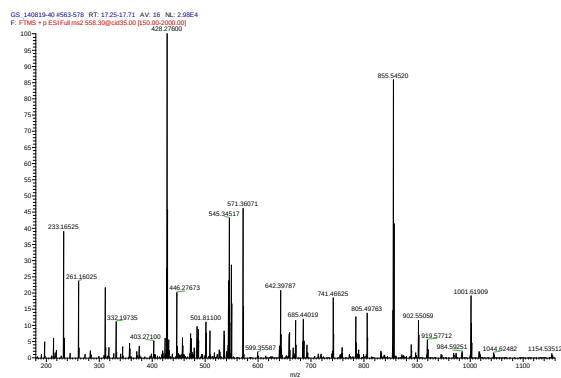


Štruktúra gramicidínu S [20]

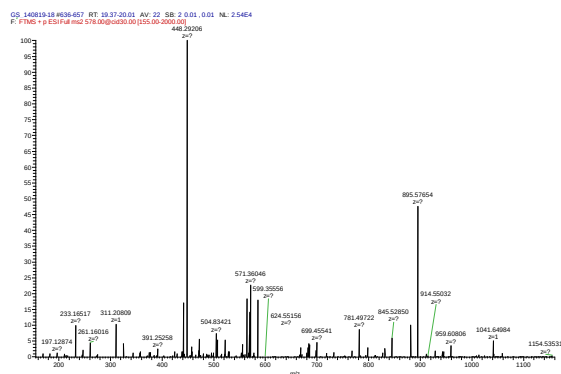
Gramicidin S



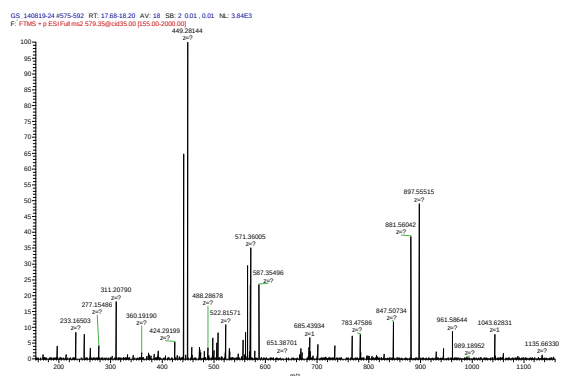
Ala – Orn – Leu – Phe – Pro
| |
Pro – Phe – Leu – Orn – Val



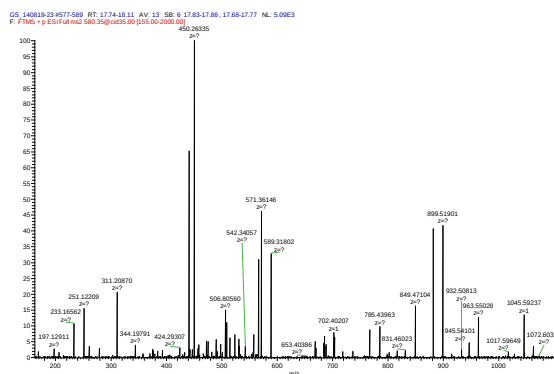
Val – Orn – Leu – Phe – Pro
| |
Ala – Phe – Leu – Orn – Val



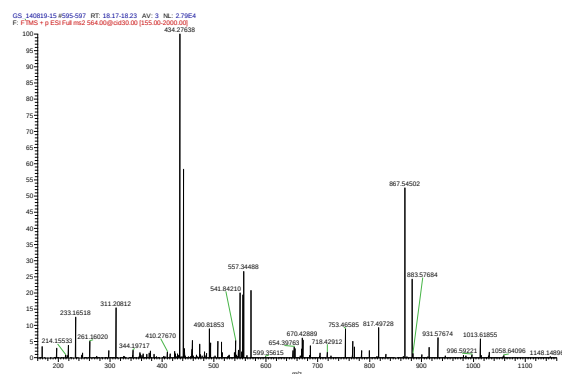
Val – **Lys** – Leu – Phe – Pro
| |
Pro – Phe – Leu – Orn – Val



Val – Orn – Leu – **Tyr** – Pro
| |
Pro – Phe – Leu – Orn – Val



Val – Orn – **Met** – Phe – Pro
 | |
 Pro – Phe – Leu – Orn – Val



Val – Orn – **Val** – Phe – Pro
 | |
 Pro – Phe – Leu – Orn – Val

Ionizácia sa realizovala vyhrievaným elektrosprejom. Spektá boli namerane na Orbitrap Elite, Thermo Scientific, fragmentácia sa robila pomocou colízne indukovanej disociácie s energiou 30eV.

- [1] European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual Report 2007. Bilthoven, Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment, 2008. http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring_reports/.
- [2] Cars O, Högborg LD, Murray M, et al. Meeting the challenge of antibiotic resistance. BMJ 2008;337:a1438. doi: 10.1136/bmj.a1438.
- [3] European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). Interactive database. <http://www.rivm.nl/earss/database/>.
- [4] E.J. Prenner, R.N. Lewis, R.N. McElhaney, The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes, Biochim. Biophys. Acta 1462 (1999) 201–221.
- [5] T. Ganz, R.I. Lehrer, Antimicrobial peptides in innate immunity, in: K. Lohner (Ed.), Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 2001, pp. 139–147.
- [6] M. Zasloff, The commercial development of the antimicrobial peptide Pexiganan, in: K. Lohner (Ed.), Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 2001, pp. 261–270.
- [7] R.M. Hall, C.M. Collis, Origins and evolution of antibiotic and multiple antibiotic resistance in bacteria, in: K. Lohner (Ed.), Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 2001, pp. 1–15.
- [8] K. Lohner, E. Staudegger, Are we on the threshold of the post-antibiotics era? in: K. Lohner (Ed.), Development of Novel Antimicrobial Agents: Emerging Strategies, Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 2001, pp. 149–165.
- [9] R.M. Epand, H.J. Vogel, Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action, Biochim. Biophys. Acta 1462 (1999) 11–28.
- [10] N. Sitaram, R. Nagaraj, Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity, Biochim. Biophys. Acta 1462 (1999) 29–54.
- [11] Walsh, C. T. Science 2004, 303, 1805–1810. Schwarzer, D.; Finking, R.; Marahiel, M. A. Nat. Prod. Rep. 2003, 20, 275–287
- [12] Katsu, T., H. Kobayashi, T. Hirota, Y. Fujita, K. Sato, and U. Nagai..Structure-activity relationship of gramicidin S analogues on membrane permeability. Biochim. Biophys. Acta 1987 899:159, 29.

- [13] Salgado, J., S. L. Grage, L. H. Kondejewski, R. S. Hodges, R. N. McElhaney, and A. S. Ulrich. 2001. Membrane-bound structure and alignment of the antimicrobial β -sheet peptide gramicidin S derived from angular and distance constraints by solid state ^{19}F -NMR. *J. Biomol. NMR* 21:191-208
- [14] Wu, M., E. Maier, R. Benz, and R. E. Hancock. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38:7235-7242
- [15] Marina Berditsch, Sergii Afonin, and Anne S. Ulrich. The Ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) To Produce the Antibiotic Gramicidin S Is Correlated with Phenotype Variation, *Appl Environ Microbiol.* Oct 2007; 73(20): 6620–6628.
- [16] Elmar J. Prenner, Monika Kiricsi, Masood Jelokhani-Niaraki, Ruthven N. A. H. Lewis, Robert S. Hodges, and Ronald N. McElhaney, Structure-Activity Relationships of Diastereomeric Lysine Ring Size Analogs of the Antimicrobial Peptide Gramicidin S MECHANISM OF ACTION AND DISCRIMINATION BETWEEN BACTERIAL AND ANIMAL CELL MEMBRANES, doi: 10.1074/jbc.M406509200 originally published online November 12, 2004 *J. Biol. Chem.* 280:2002-2011)
- [17] Annemiek D. Knijnenburg , Varsha V. Kapoerchan , Gijsbert M. Grotenbreg , Emile Spalburg , Albert J. de Neeling , Roos H. Mars-Groenendijk , Daan Noort , José M. Otero , Antonio L. Llamas-Saiz , Mark J. van Raaij , Bep Ravensbergen , Peter H. Nibbering , Gijs A. van der Marel , Herman S. Overkleeft and Mark Overhand, Synthesis and evaluation of strand and turn modified ring-extended gramicidin S derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry - BIOORGAN MED CHEM* , vol. 19, no. 11, pp. 3402-3409, 2011
- [18] Makoto Tamaki, Rie Ishii, Sho Kikuchi and Eiji Watanabe A Novel Active Analogue of Gramicidin S with Smaller Ring Size *The Journal of Antibiotics* (2005) 58, 293–295;
- [19] T. Abraham, E.J. Prenner, R.N.A.H. Lewis, C.T. Manz, R.S. Hodges and R.N. McElhaney Structure-Activity Relationships of the Antimicrobial Peptide Gramicidin S and its Analogues: Aqueous Solubility, Self Association, Conformation, Antimicrobial Activity and Interaction with Lipid Bilayer Model Membranes *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 1420-142
- [20] Adriaan Willem Tuin, Dimitrios Konstantinos Palachanis, Annelies Buizert, Gijsbert Marnix Grotenbreg, Emile Spalburg, Albert J. de Neeling, Roos H. Mars-Groenendijk, Daan Noort, Gijsbert A. van der Marel, Herman S. Overkleeft, Mark Overhand Synthesis and Biological Evaluation of Novel Gramicidin S Analogues, *European Journal of Organic Chemistry - EUR J ORG CHEM* , vol. 2009, no. 25, pp. 4187-4187, 2009

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Automated acquisition of MSⁿ spectral trees using Orbitrap hybrid mass spectrometers

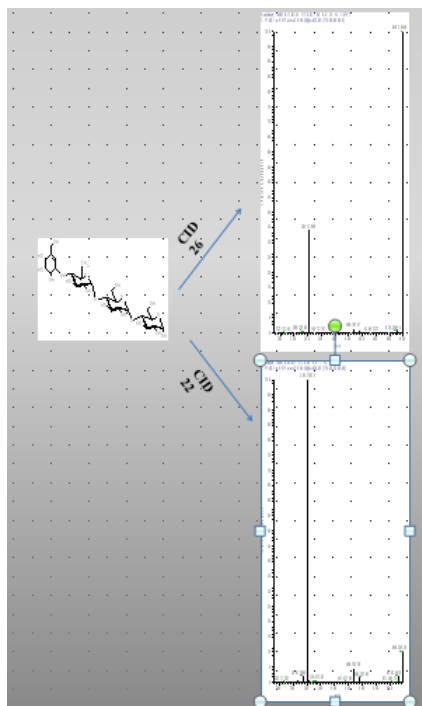
Silvia Vlckova^a, Vladimir Patoprsty^a, Juraj Lutisan^b, Jakub Mezey^b, Robert Mistrik^b

^a*Institute of Chemistry, Center for Glycomics, Dubravska cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia*

^b*HighChem Ltd., Leskova 11, 811 04 Bratislava, Slovakia*

Introduction

The appearance of tandem spectra may be strongly dependent upon the applied experimental conditions which considerably complicate identifications of unknowns through comparison to reference spectra (Picture 1). In the area of small molecules, the recently established concept of spectral trees addresses the spectra reproducibility problem by integrating multi-stage tandem spectra of numerous precursor ions acquired using various experimental conditions into a single tree record.



Picture 1: Comparison of fragmentation mass spectra of acarbose with different collision energies used.

Methods

We will present a novel Orbitrap hardware/software platform for the informed acquisition of comprehensive MSⁿ spectral trees for incorporation into a reference database. With chemical structure in hand and using real time algorithmic noise and artifacts filtering, all unrelated potential precursor ions are dynamically excluded. Real time optimization of instrument parameters and duration takes into account the dependency of ion yield on sample flow rate, the absolute breakdown curves of precursor ions, the S/N ratio of precursor scans, and the effects of varying collision energies on the resulting fragmentation efficiency to balance the need for quality spectra and to minimize the acquisition of useless data, while collecting as many characteristic spectra as possible.

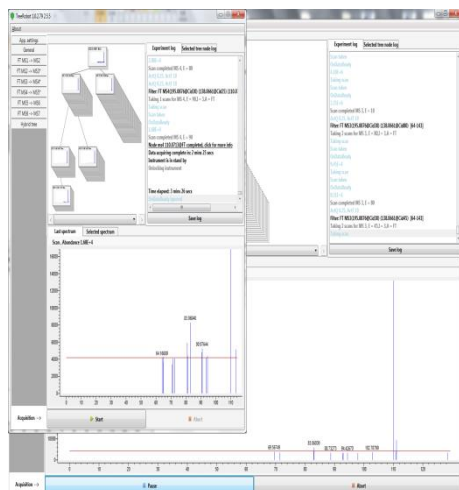
Results

To collect comprehensive spectral trees containing as many energy resolved product ion spectra as possible, an advanced MSⁿ acquisition software autonomously controls the Orbitrap MS system by making real time decisions in both a data dependent and data independent fashion.

Knowing the identity of a reference compound, not only the protonated, deprotonated or singly charged, an ion is automatically selected as the precursor from the full scan, however precursor ions at subsequent stages are selected from spectra filtered in real time using algorithms based on structural information. Product ion spectra are acquired from

abundant precursor ions emerging at optimal collision energies determined from the breakdown curves derived from energy resolved measurements at previous tandem stages.

The presented platform must deal with two primary limitations: first, acquisition time, which can without constraints exceed 5 hours per compound depending on the molecule size and, second, the sample amount. To limit both the duration and sample consumption, additional intelligent real time procedures are applied to prevent unnecessary acquisitions and to terminate the apparently “dead” MSn branch automatically.



fragmentation spectral tree.

Picture 2:



Creation of

Picture 3: Parameters for measuring spectral

tree.

Spectral trees of human metabolites, pharmaceuticals and environmental contaminants collected using the free of charge treeRobot platform will be presented and their superiority over the data acquired using traditional systems will be demonstrated in compound identification examples. The presented spectral trees will be deposited into a publicly available database (mzcloud.org) where they will be available for review.

Novel Aspect

The novel automated acquisition of high resolution, energy resolved, hierarchically dependent spectral trees using algorithmic real time decision logic.



Acknowledgment:

This contribution is the result of the project implementation: Completion of technical infrastructure for research in new biotechnologies, *ITMS 26210120029*, supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF.

Závislosť rastu kvasiniek rodu *Cryptococcus* na laktózovom médiu od produkcie povrchových β -galaktozidáz

Barbora Pavlatovská^a, Barbora Stratilová^{b,c}, Renáta Vadkertiová^b a Vladimír Pätoprstý^{b*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chempaty@savba.sk

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

Kľúčové slová

Cryptococcus, β -galaktozidáza, galaktóza, indukcia, laktóza

Úvod

Rast mikroorganizmov na médiách, ktoré obsahujú ako jediný zdroj uhlíka oligo- alebo polysacharidy, je podmienený produkciou enzýmov, tzv. glykozidáz a glykanáz, ktoré štiepia tieto zdroje na menšie jednotky, ktoré je mikroorganizmus schopný ďalej spracovať. Takéto štiepenie môže prebiehať vďaka vylučovaniu extracelulárnych enzýmov do kultivačného média, enzýmov viazaných na povrchu buniek, alebo v prípade oligosacharidov, ktoré sú dostatočne malé na to, aby boli transportované do vnútra bunky, v cytozole alebo iných bunkových štruktúrach. Jedným z bežne používaných zdrojov uhlíka pre kultiváciu mikroorganizmov je disacharid laktóza zložená z galaktózovej a glukózovej jednotky, ktoré sú navzájom viazané β -väzbou. Tento disacharid štiepi enzým β -galaktozidáza (www.cazy.org). Ako triviálny názov tohto enzýmu, ktorý zdôrazňuje význam pri štiepení laktózy, sa používa laktáza alebo β -laktózidáza (www.enzyme-database.org).

Náplňou tejto práce bolo otestovať vhodnosť laktózového média na kultiváciu kvasiniek rodu *Cryptococcus* a s tým očakávanú produkciu extracelulárnej a povrchovej β -galaktozidázy.

Materiál a metódy

Testovalo sa 18 kmeňov kvasiniek, ktoré zahrňovali druhy *Cr. carnescens* (CCY 17-3-13), *Cr. flavescens* (CCY 17-3-6, CCY 17-3-15, CCY 17-3-29, CCY 17-3-31, CCY 17-3-33, CCY 17-3-38), *Cr. flavus* (CCY 17-3-5), *Cr. laurentii* (CCY 17-3-2, CCY 17-3-9, CCY 17-3-17, CCY 17-3-24), *Cr. magnus* (CCY 17-4-39, CCY 17-4-40), *Cr. saitoi* (CCY 17-3-18), *Cr. victoriae* (CCY 17-3-26) a *Bulleromyces albus* (CCY 17-3-35, CCY 17-3-37). Kvasinky pochádzali zo Zbierky kultúr kvasiniek (CCY), Chemický ústav SAV a boli kultivované minimálne 96 hod na trepačke v tekutom médiu s obsahom laktózy ako jediného zdroja uhlíka.

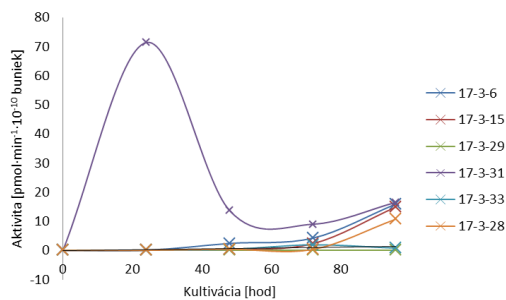
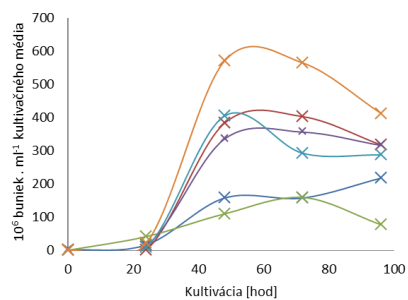
Aktivita β -galaktozidázy bola stanovená v priebehu kultivácie spektrofotometricky na PNP- β -galaktopyranozid ako substrát. Reakcia bola zastavená prídavkom 4% Na_2CO_3 a množstvo uvoľneného PNP sa stanovilo meraním pri 410 nm. V rovnakých časových intervaloch, ako sa stanovila aktivita enzýmu, sa stanovil aj počet buniek v médiu (počítanie v Bürkerovej komôrke).

Výsledky a diskusia

Obrázky 1A-5A zobrazujú rastové krivky druhov/kmeňov rodu *Cryptococcus* rastúcich na laktózovom médiu a obrázky 1B - 5B mieru aktivity β -galaktozidázy na povrchu buniek v priebehu kultivácie. Aktivita na obrázkoch B je prepočítaná na biomasu kvasiniek reprezentovanú 10^{10} buniek.

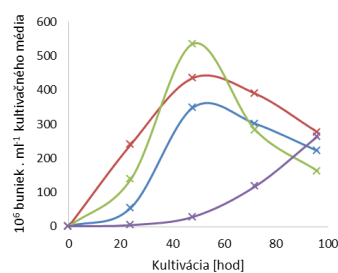
A

B

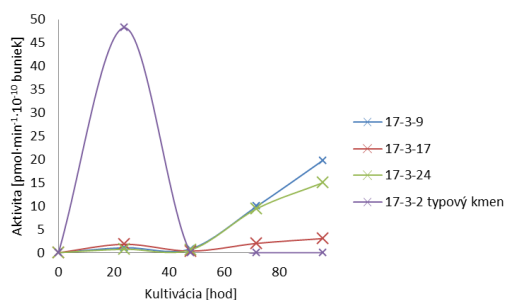


Obr. 1. Rastová krivka kmeňov *Cryptococcus flavescens* na laktózovom médiu a aktivity ich povrchovej β -galaktozidázy.

A

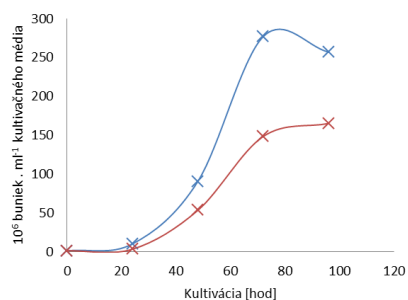


B

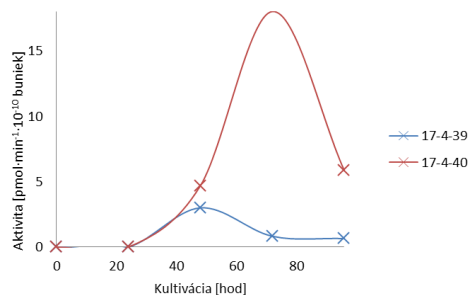


Obr. 2. Rastová krivka kmeňov *Cryptococcus laurentii* na laktózovom médiu a aktivity ich povrchovej β -galaktozidázy.

A

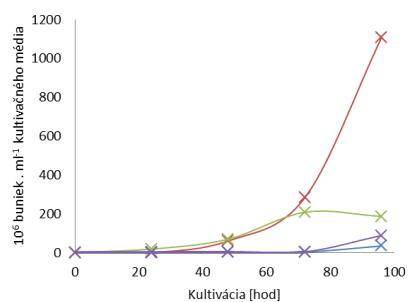


B

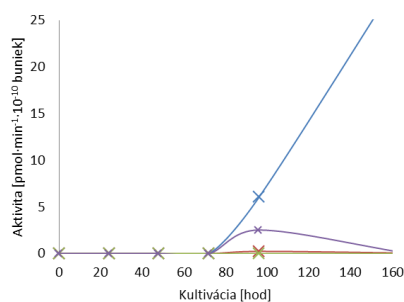


Obr. 3. Rastová krivka kmeňov *Cryptococcus magnus* na laktózovom médiu a aktivity ich povrchovej β -galaktozidázy.

A



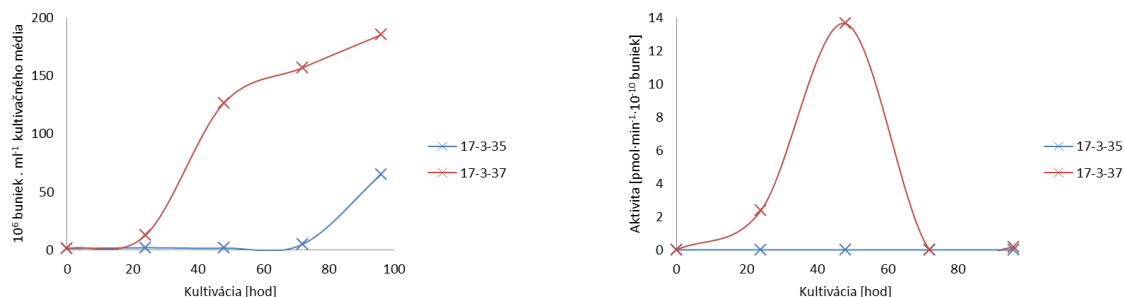
B



Obr. 4. Rastová krivka iných druhov rodu *Cryptococcus* na laktózovom médiu a aktivity ich povrchovej β -galaktozidázy.

A

B



Obr. 5. Rastová krivka kmeňov *Bulleromyces albidus* na laktózovom médiu a aktivity ich povrchovej β -galaktozidázy.

Porovnanie sledovaných rastových kriviek a β -galaktozidázových povrchových aktivít buniek kmeňov zobrazuje Tab. 1.

Tab. 1: Porovnanie maximálneho rastu a maximálnej povrchovej aktivity β -galaktozidázy kmeňov kvasiniek rodu *Cryptococcus* rastúcich na laktózovom médiu.

Druh	Kmeň	Rast na laktózovom médiu	β -galaktozidázová aktivita
<i>Cr. laurentii</i>	CCY 17-3-9	+++	+
	CCY 17-3-17	+++	+
	CCY 17-3-24	+++	+
	CCY 17-3-2	++	++
<i>Cr. flavescens</i>	CCY 17-3-6	++	+
	CCY 17-3-15	+++	+
	CCY 17-3-29	++	-
	CCY 17-3-31	+++	++
	CCY 17-3-33	+++	+
	CCY 17-3-38	+++	+
<i>Cr. magnus</i>	CCY 17-4-39	++	+
	CCY 17-4-40	++	+
<i>Cr. flavus</i>	CCY 17-3-5	++	++
<i>Cr. carnescens</i>	CCY 17-3-13	++++	+
<i>Cr. saitoi</i>	CCY 17-3-18	+++	-
<i>Cr. victorie</i>	CCY 17-3-26	+++	+
<i>Bulleromyces albidus</i>	CCY 17-3-35	+	-
	CCY 17-3-37	++	+

- 0 pmol.min⁻¹.10⁻¹⁰ buniek
- + 0.1-19.9 pmol.min⁻¹.10⁻¹⁰ buniek
- ++ 20-99.9 pmol.min⁻¹.10⁻¹⁰ buniek

Z porovnania rastových kriviek jednotlivých kmeňov sa dá usúdiť, že laktózové médium nie je vhodné kultivačné médium pre všetky kmene kvasiniek rodu *Cryptococcus*, pretože niektoré kmene na ňom rástli výrazne pomaly (CCY 17-3-29, CCY 17-3-5, CCY 17-3-26, CCY 17-3-35), iné zas vykazovali dlhú adaptačnú fázu (CCY 17-3-2, CCY 17-3-6). Ak by sme porovnali rastové krivky a grafy, ktoré popisujú aktivitu povrchovej β -galaktozidázy meniacej sa behom doby kultivácie (extracelulárna aktivita nebola zistená ani v jednom prípade), tak zistíme, že medzi nimi

neexistuje žiadna bližšie špecifikovateľná závislosť. Výsledky tak nepotvrdili ani očakávaný vplyv produkcie tohto enzýmu na rast kmeňov, ani predpokladanú indukciu β -galaktozidázy vplyvom laktózy. Najlepší rast vykazoval kmeň *Cr. carnescens* CCY 17-3-13, ktorý mal veľmi nízku hladinu tohto enzýmu. Dá sa len predpokladať, že sa tento enzým nachádza v cytozole a dochádza k intracelulárnemu štiepeniu laktózy, čo následne umožňuje rast kvasinkovej kultúry. Tento predpoklad treba samozrejme experimentálne overiť. Relatívne zvýšené množstvo tohto enzýmu bolo na povrchu kvasiniek pozorované len v prípade typového kmeňa *Cr. laurentii* CCY 17-3-2, kmeňa *Cr. flavescens* CCY 17-3-31 a *Cr. flavus* CCY 17-3-5.

Podakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Indukcia povrchovej α -galaktozidázy kapsulárnych kvasiniek rodu *Cryptococcus*

Barbora Pavlatovská^a, Barbora Stratilová^{b,c}, Renáta Vadkertiová^b a Vladimír Pätoprstý^{b*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; chempaty@savba.sk

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

Kľúčové slová

Cryptococcus, α -galaktozidáza, kapsula, polysacharidy

Úvod

Vysoká virulentnosť patogénnych kmeňov rodu *Cryptococcus* je viazaná na ich schopnosť produkovať kapsulu a následne uvoľňovať veľké množstvo kapsulárnych polysacharidov do telových tekutín [Pirofski a Casadevall, 1996]. Rearanžovanie kapsule počas pučania, resp. uvoľňovanie kapsulárnych polysacharidov, by mohli byť dôsledkom ako fyzikálnych dejov [Zaragoza a kol., 2006], tak aj činnosti enzýmov s hydrolytickými a transglykozylačnými aktivitami. Na základe výsledkov získaných štúdiom premeny kapsúl v závislosti na pomere polysacharidov, z ktorých sú zložené a z ktorých jeden obsahuje viazanú galaktózu [Moyrand a kol., 2007] ako aj kapsulárnych a akapsulárnych kmeňov druhu *Cryptococcus flavesens* [Mészároszová a kol., 2012] sa predpokladá, že jedným z kľúčových enzýmov, ktoré by všeobecne mohli zohrávať úlohu pri rearanžovaní kryptokokálnych kapsúl, je enzým α -galaktozidáza. Zvýšená aktivita tohto enzýmu na povrchu buniek bola detegovaná v prítomnosti látok obsahujúcich viazanú galaktózu a to aj v prípadoch, kedy bola viazaná β -väzbou, ktorú tento enzým nie je schopný štiepiť, napr. v prípade laktózy.

Náplňou tejto práce bolo štúdium indukcie tohto enzýmu inými druhmi/kmeňmi rodu *Cryptococcus* za účelom overenia všeobecnej platnosti tohto predpokladu.

Materiál a metódy

Testovalo sa 18 kmeňov kvasiniek, ktoré zahrňovali druhy *Cr. carnescens* (CCY 17-3-13), *Cr. flavesens* (CCY 17-3-6, CCY 17-3-15, CCY 17-3-29, CCY 17-3-31, CCY 17-3-33, CCY 17-3-38), *Cr. flavus* (CCY 17-3-5), *Cr. laurentii* (CCY 17-3-2, CCY 17-3-9, CCY 17-3-17, CCY 17-3-24), *Cr. magnus* (CCY 17-4-39, CCY 17-4-40), *Cr. saitoi* (CCY 17-3-18), *Cr. victoriae* (CCY 17-3-26) a *Bulleromyces albus* (CCY17-3-35, CCY 17-3-37). Kvasinky pochádzali zo Zbierky kultúr kvasiniek (CCY), Chemický ústav SAV a boli kultivované minimálne 96 hod na trepačke v tekutom médiu s obsahom laktózy ako jediného zdroja uhlíka.

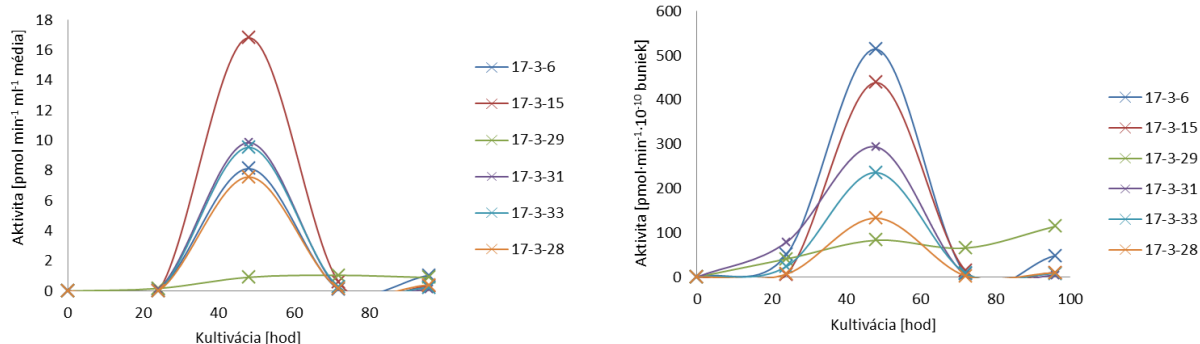
Aktivita α -galaktozidázy bola stanovená v priebehu kultivácie spektrofotometricky na PNP- α -galaktopyranozid ako substrát. Reakcia bola zastavená prídavkom 4% Na₂CO₃ a množstvo uvoľneného PNP sa stanovilo meraním pri 410 nm. V rovnakých časových intervaloch, ako sa stanovila aktivita enzýmu, sa stanovil aj počet buniek v médiu (počítanie v Bürkerovej komôrke).

Výsledky a diskusia

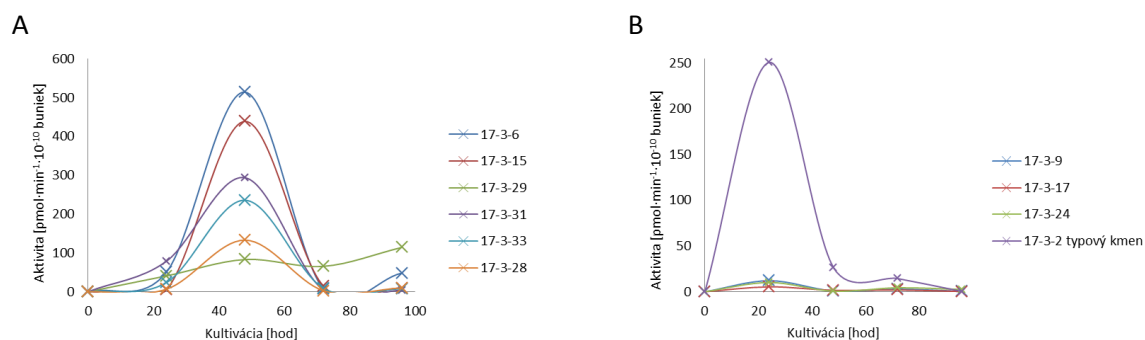
Obrázky 1A, B - 5A, B zobrazujú mieru aktivity α -galaktozidázy na povrchu buniek jednotlivých druhov/kmeňov rodu *Cryptococcus* v priebehu kultivácie. Aktivita na obrázkoch A je prepočítaná na ml média a na B na biomasu kvasiniek reprezentovanú 10¹⁰ buniek.

A

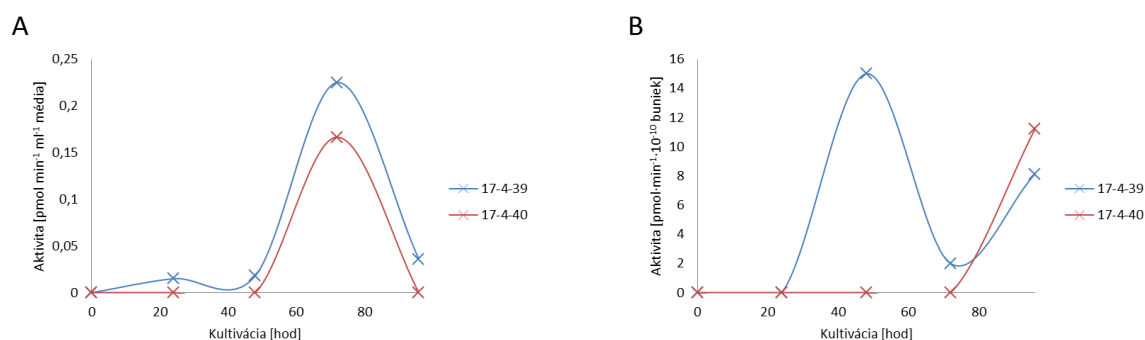
B



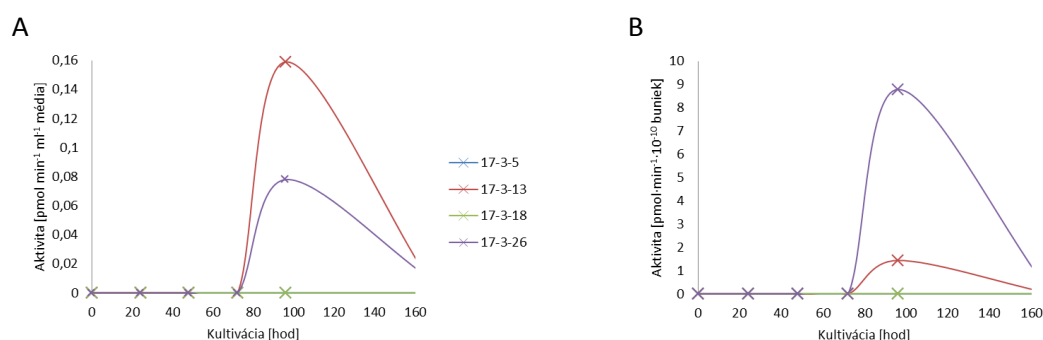
Obr. 1. Aktivity povrchovej α-galaktozidázy kmeňov *Cryptococcus flavescens*.



Obr. 2. Aktivity povrchovej α-galaktozidázy kmeňov *Cryptococcus laurentii*



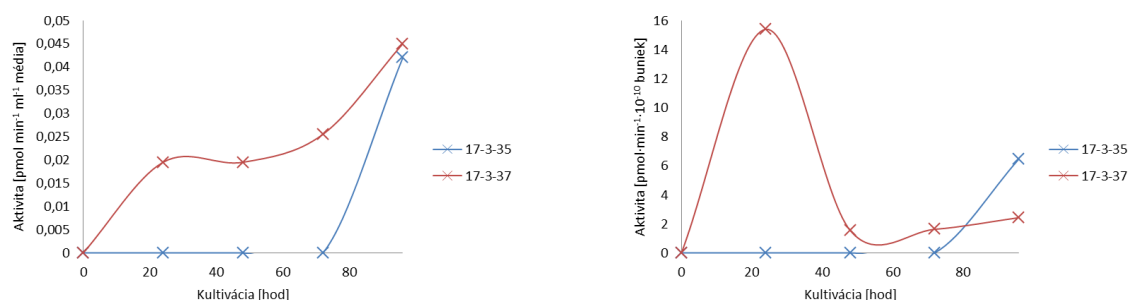
Obr. 3. Aktivity povrchovej α-galaktozidázy kmeňov *Cryptococcus magnus*



Obr. 4. Aktivity povrchovej α-galaktozidázy iných druhov rodu *Cryptococcus*

A

B



Obr. 5. Aktivity povrchovej α -galaktozidázy kmeňov *Bulleromyces albidus*

Porovnanie sledovaných α -galaktozidázových povrchových aktivít buniek kmeňov zobrazuje Tab. 1.

Tab. 1: Porovnanie maximálnej povrchovej aktivity α -galaktozidázy kmeňov kvasiniek rodu *Cryptococcus* rastúcich na laktózovom médiu.

Druh	Kmeň	α -galaktozidázová aktivita na povrchu buniek
<i>Cr. laurentii</i>	CCY 17-3-9	+
	CCY 17-3-17	+
	CCY 17-3-24	+
	CCY 17-3-2	+++
<i>Cr. flavescens</i>	CCY 17-3-6	++++
	CCY 17-3-15	+++
	CCY 17-3-29	++
	CCY 17-3-31	+++
	CCY 17-3-33	+++
	CCY 17-3-38	++
<i>Cr. magnus</i>	CCY 17-4-39	+
	CCY 17-4-40	+
<i>Cr. flavus</i>	CCY 17-3-5	-
<i>Cr. carnescens</i>	CCY 17-3-13	+
<i>Cr. saitoi</i>	CCY 17-3-18	-
<i>Cr. victorie</i>	CCY 17-3-26	+
<i>Bulleromyces albidus</i>	CCY 17-3-35	+
	CCY 17-3-37	+

- 0 pmol.min⁻¹.10⁻¹⁰ buniek
- + 0.1-19.9 pmol.min⁻¹.10⁻¹⁰ buniek
- ++ 20-99.9 pmol.min⁻¹.10⁻¹⁰ buniek
- +++ 100-300 pmol.min⁻¹.10⁻¹⁰ buniek
- ++++ viac ako 300 pmol.min⁻¹.10⁻¹⁰ buniek

Mészároszová a kol. [2012] popísali zvýšenú produkciu α -galaktozidázy kapsulárnym kmeňom *Cr. flavescens* na médiách, ktoré obsahovali laktózu. Táto zdanlivo nevysvetliteľná reakcia kapsulárneho mikroorganizmu vyžadovala ďalšie skúmanie v súvislosti s metabolizmom galaktózy, keďže by mohla súvisieť s predpokladanou dôležitou úlohou tohto metabolizmu vo virulentnom charaktere rodu *Cryptococcus*, ktorú v roku 2007 naznačil Moyrand a kol. Táto skupina totiž zistila, že veľkosť kapsuly a jej zbalenie závisia na vzájomnom pôsobení základných polysacharidových zložiek, GXM a GalXM (galaktoxylomanán). Mutant, ktorý nebol schopný syntetizovať GalXM mal väčšiu kapsulu, ako pôvodný divý kmeň. Z tohto sa predpokladalo, že na neprítomnosť GalXM bunka reaguje nadprodukciou molekúl GXM, čo má za následok zväčšenie kapsule. Tento fakt poukazuje na to, že GalXM hrá dôležitú úlohu v zachovaní štruktúry a veľkosti kapsuly. Ak by sme teda predpokladali, že nárast α -galaktozidázovej aktivity vedie k úbytku GalXM v kapsuliach, prejavilo by sa to zväčšením kapsúl. Vzhľadom na potenciálnu transglykozylačnú aktivitu tohto enzýmu, by sa mohol zúčastňovať aj na opačnom

proces. V prípade takejto úlohy α -galaktozidázy by sa dalo očakávať, že sa enzým bude indukovať vo výraznej miere na povrchu všetkých kapsulárnych kvasiniek rodu *Cryptococcus*. Ako vyplýva z Obr. 1-5 a Tab. 1, tento predpoklad sa nepotvrdil, indukcia povrchovej α -galaktozidázy laktózou je kmeňovo závislá s výminkou *Cr. flavescens*, v prípade ktorého môžeme uvažovať o druhovej závislosti.

Podakovanie

Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Mészároszová Cs., Kolarova N., Vadkertiová R., Stratilová E. (2012) *Chem. Pap.* **66**:806
Moyrand F., Fontaine T., Janbon G.(2007) *Mol.Microbiol.* **64**:771
Pirofski L.A., Casadevall A., (1996) *Zentralbl. Bakteriол.* **284**:475
Zaragoza O., Telzak A., Bryan A. R., Dadachova E., Casadevall A. (2006) *Mol. Microbiol.* **59**:67

MARGINALIZOVANÉ KOMUNITY A VOĽNE RASTÚCE HUBY AKO KONCENTRÁTORY ^{137}Cs V LESNÝCH EKOSYSTÉMOCH NA SLOVENSKU

Juraj Miššik^{1,2}, Ľubomír Puskeiler², Vladimír Pätoprstý³, Petra Moravcová¹, Július Árvay⁴

¹Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra biochémie a biotechnológie, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko. Telefón: +421 37 641 4474

²Veterinárny a potravinový ústav Bratislava, Laboratórium environmentálnej radioaktivity, RI-pavilón SPU, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko. Telefón: +421 915 083 224

³Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovensko.

⁴Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Katedra chémie, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko.

Korešpondujúci autor: juraj.missik@uniag.sk

ABSTRAKT:

Predmetom práce bolo získať predbežné údaje pre odhad možnosti existencie malých lokalít v lesných ekosystémoch s vyššou mierou kontaminácie organickej vrstvy pôdy antropogénnym ^{137}Cs , ktoré by mohli byť zdrojom kontaminovanej potravy pre zberateľov z prostredia sociálne odkázaných obyvateľov a členov marginalizovaných komunít na Slovensku.

Od predajcov pri ceste v blízkosti rímskych osád v Richnave a Kluknave (Spišský región, východné Slovensko) boli zakúpené vzorky jedlých húb. Najvyššia aktivita ^{137}Cs v tejto sade bola zaznamenaná vo vzorke *Boletus edulis* ($263,3 \pm 20,3$) Bq.kg⁻¹ (s.hm.). Hodnoty geometrického priemeru (49,0 Bq.kg⁻¹) lognormálneho rozdelenia aktivity nálezov a očakávanej strednej hodnoty (91,2 Bq.kg⁻¹ s.hm.) boli vyššie ako na porovnávacom odberovom mieste na severozápadnom Slovensku (Čierne – Svrčinovec). V žiadnej vzorke nebol presiahnutý hygienický limit pre obsah rádiocézia.

ÚVOD

Takmer tri desaročia po havárii v Černobyle a následnej kontaminácii skoro celého územia Európy zložitou zmesou rádionuklidov je ešte stále v rôznych častiach terestriálnych ekosystémov prítomné značné množstvo rádionuklidu ^{137}Cs (Aarkrog, 1988; Gudixsen et al., 1989; Bossew et al., 2001; Lehto et al., 2013). Dôvodom je veľké množstvo uvoľneného ^{137}Cs , jeho relatívne dlhá doba polpremeny ($T_{1/2} = 30,1$ r) a jeho chemická podobnosť na draslík. Rozloženie deponovanej kontaminácie bolo veľmi nerovnomerné nielen v kontinentálnom meradle, ale aj na podstatne menších lokálnych mierkach (Lettner et al., 2000; Shoigu and Bolshov, 2006; Winkelbauer et al., 2012). S výnimkou blízkeho okolia havarovanej jadrovej elektrárne bolo obyvateľstvo ohrozované len dávkami obdržanými z vnútornej kontaminácie spôsobenými konzumáciou potravín kontaminovaných ^{137}Cs (EC 1998; Povinec et al., 2012).

Následné opatrenia na ochranu verejnosti sa orientovali na zníženie vnútornej kontaminácie väčšiny európskej populácie pomocou stanovenia maximálnych dovolených úrovní kontaminácie potravinových komodít (COUNCIL REGULATION (EURATOM) No 3954/87; EC, 2009). Zatiaľ čo reštrikčné kritériá prijaté v EÚ dosiahli stanovený cieľ poskytnúť dostatočnú ochranu jednotlivcom s bežným konzumentským správaním, existovali a stále ešte môžu existovať kritické skupiny obyvateľstva, ktoré pravidelne konzumujú veľké množstvá niektorých potravín z obmedzených geografických území a miestnych potravinových zdrojov (EC, 1998).

Správanie sa rádionuklidov v lesnom ekosystéme sa významne líši od poľnohospodárskych ekosystémov, ktoré sú vo všeobecnosti viac brané do úvahy pri odhadoch radiačných dávok (Calmon et al., 2009). Rádionuklidy môžu byť v lesoch zadržované a recyklované s veľkou účinnosťou vedúcou k dlhým rezidenčným časom a k potenciálu zvyšovať interné ožiarenie obdržané ľudskou populáciou v časovej mierke desaťročí až storočí (Shaw, 2007; Nimis, 1996). Predpokladá sa, že aktivita húb a mikroorganizmov podstatne prispieva k dlhodobej retencii rádionuklidov v organických vrstvách lesných pôd. Najväčšie množstvo izotopu ^{137}Cs , hlavného kontaminantu uvoľneného z Černobylu sa ešte stále nachádza v organických horizontoch lesnej pôdy (Dupré de Boulois et al., 2008; Winkelbauer et al., 2012). Mykorizne huby majú biochemické schopnosti mobilizovať živiny z polymérnych zdrojov uhlíka a preto nie sú samy závislé na aktivite dekompozičných húb (Steiner et al., 2002). Predpokladá sa, že rádiocéziu je uložené v prevažnej miere v biomase húb pod povrchom pôdy, nakoľko biomasa nadzemných plodníc tvorí len nízke percento celkovej biomasy húb. Nikolova

a i. (1997) preukázala, že koncentrácia aktivity ^{137}Cs v plodniciach a mycéliu *Suillus variegatus* sa pohybuje v rozsahu jedného poriadku. Hubami sprostredkovaná translokácia ^{137}Cs do čerstvej opadanky sa považuje za jednu z príčin pretrvávania rádiocézia v organickom horizonte lesných pôd. Huby sa tiež považujú za pôvodcu sekundárnej horizontálnej redistribúcie a lokálneho obohatenia prítomnosti ^{137}Cs v zhlukoch húb (Nikolova et al., 1997; Rafferty et al., 2000). Predpokladá sa, že v nižšie ležiacom minerálnom horizonte imobilizácia rádiocézia v ílovitých mineráloch prevažuje nad jeho nahor smerujúcim transportom sprostredkovaným hubami. Prvý čisto minerálny pôdny horizont preto pôsobí ako odstraňovač mobilného rádiocézia (Rühm et al., 1996). V dlhodobom časovom horizonte (niekoľko rokov až dekád) môže dôjsť k laterálnej redistribúcii vo vode rozpustného cézia najmä v nerovných zalesnených terénoch, kde má hlavnú úlohu povrchová voda, periodické rozpúšťanie snehovej pokrývky, aktivita zvierat, ľudí a rozdielných druhov húb - ich životného cyklu a zmien mykoríznych systémov na stanovišti (Steiner et al., 2002). Z toho vyplýva aj možnosť ťažko predvídateľných nálezov vysoko kontaminovaných plodníc húb v zalesnených terénoch so stredným alebo nízkym inventárom ^{137}Cs . Aj keď v krajinách strednej a východnej Európy je konzumácia voľne rastúcich húb vyššia ako na zvyšku kontinentu (Kalač (2010) uvádza napríklad pre Českú republiku priemernú spotrebu 5,6 kg čerstvých húb ročne na domácnosť), viac ako o jeden poriadok vyššie miery konzumácie možno predpokladať u časti obyvateľov z marginalizovaných komunit, žijúcich v hmotnej núdzi v regiónoch s najvyššími mierami nezamestnanosti na Slovensku, ktorí často hľadajú obživu ako zberači v miestnych lesoch.

Cieľom tejto práce bolo získať predbežný súbor dát potrebný na posúdenie možnosti existencie miestnych zdrojov nadpriemerne kontaminovaných húb. Mohli by to byť rozlohou malé, možno veľmi rozdrobené časti zalesnenej krajiny s vhodným reliéfom umožňujúcim laterálnu redistribúciu a koncentráciu aktivity ^{137}Cs aj v oblastiach s celkovo nízkym inventárom tohto kontaminantu.

MATERIÁL A METÓDY

Lokality a vzorkovanie

Plodnice húb boli zbierané počas dvoch sezón v rokoch 2012-2013 severne od obce Čierne-Svrčinovec na Kysuciach (severozápadné Slovensko). Oblasť vzorkovania bol obdĺžnik 0,35 km široký a 1,26 km dlhý, smerujúci na severovýchod od vrchu Košariská (618 m n.m.). Vzdialené konce obdĺžnika pokrýva les, ktorý je uprostred vzorkovacej plochy rozdelený plytkým údolím s lúkami, cez ktoré preteká potok. V prevažne smrekovom lese sa redšie vyskytujú aj *Abies alba*, *Fagus sylvatica*, *Acer pseudoplatanus* a *Pinus sylvestris*. Dlhodobé priemerné zrážky sa v tejto oblasti pohybujú medzi 900 - 1000 mm.

Vo všeobecnosti boli hubárske sezóny v rokoch 2012-2013 na celom Slovensku veľmi zlé. Rok 2012 bol v príslušnom období extrémne suchý a v roku 2013 boli zrážky nerovnomerne rozdelené do začiatku jari a na neskorú jeseň. Ďalšia sada vzoriek pozostával z plodníc zakúpených v auguste 2012 od predajcov ponúkajúcich huby pri štátnej ceste v blízkosti rímskych osád pri obciach Richnava a Kluknava (Spiš, východné Slovensko), doplnených o plodnice nazbierané v lokalite medzi oboma obcami v oblasti hory Poráč (760 m nm).

Analytické postupy

Huby po preprave do laboratória boli odvážené, nakrájané na plátky a usušené pri teplote 90 °C. Po homogenizácii boli naplnené do štandardných Marinelliho meracích nádob pre polovodičovú spektrometriu žiarenia gama v rozmedzí energií 100 keV až 1900 keV. Merací systém pozostával z HPGe detektorov z vysoko čistého germánia (Canberra, USA) s relatívnou účinnosťou 25% a rozlíšením (FWHM) lepším ako 1,9 keV pri 1332 keV a z modulárneho spektrometra (ORTEC a Canberra, USA). Typické meracie časy, očistené o mŕtvu dobu systému sa pohybovali medzi 90 000 - 250 000 s, v závislosti na pozorovanej aktivite vzorky a jej hmotnosť, aby bolo možné dosiahnuť potrebnú presnosť výsledkov a nízke detekčné limity. Získané spektrá bola spracované pomocou upraveného gamaspektrometrického programového balíka ASAP (NUCLEAR DATA, USA) a GammaVision, v.4.1. (ORTEC, USA).

Testovanie lognormálnej distribúcie a popisná analýza dát boli vykonané pomocou vnútorných štatistických funkcií v MS Excel 2010 (Markechová et al., 2011).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Čierne – Svrčinovec

Typická plocha prehľadovaná hubármi je zvyčajne oveľa menšia ako 10 km², čo je plocha pripadajúca na jeden merací bod na oficiálnej mape kontaminácie územia Slovenska izotopom ¹³⁷Cs (Gluch et al., 2005). Na získanie informácií o amplitúde a priestorovej distribúcii aktivity ¹³⁷Cs v hubách bola zvolená študijná plocha s rozlohou 0,44 km² v mierne kopcovitej krajine, neďaleko obce Čierne - Svrčinovec. Počas periodického vzorkovania (8 odberov z celej plochy v roku 2012, 3 v roku 2013) bolo zhromaždených 31 vzoriek s dostatočným množstvom húb pre analýzy. Plodnice tých druhov húb, ktoré neboli v daný vzorkovací deň nájdené v dostatočnom množstve na vytvorenie jednodruhovej vzorky, boli zlúčené do zmesnej vzorky pre daný odberový deň. Koncentrácia aktivity ¹³⁷Cs (Bq.kg⁻¹ suchej hmotnosti, s.hm.) v hubách nazbieraných v oboch zalesnených častiach vzorkovacej plochy sa pohybovala v rozmedzí od (248,8 ± 19,1) Bq.kg⁻¹ v *Paxilus involutus* do (6,03 ± 1,03) Bq.kg⁻¹ v *Amanita muscaria*. Pozorovaná variačná šírka aktivít ¹³⁷Cs okolo 1,5 poriadku pre všetky druhy húb, nájdená na vzorkovacej ploche je v dolnom pásme rozsahu variačných širok pozorovaných na väčších ucelených lesných plochách v Európe, ktorých priemerná kontaminácia však bola výrazne vyššia, ako v prípade prezentovanej odberovej plochy (Mietelsky et al, 2010 ;. Guillén a Baeza, 2014). Ak by sa do úvahy vzali aj dve vzorky *Macrolepiota procera*, ktoré boli nazbierané v lúčnych častiach odberovej plochy, zvýšila by sa hodnota variačnej šírky súboru na 2,5 magnitúdy, čo je ešte v súlade s citovanou literatúrou. Nízka úroveň kontaminácie plodníc druhu *Macrolepiota procera*, je v súlade s pozorovaniami z ďalších regiónov (Bazala et al, 2005; Dvořák et al, 2006; Kalač, 2012; Miššík, 2013). Je to možné vysvetliť nemykorizným charakterom tohto druhu húb ako aj rozdielom v komplexnosti a rozsahu organických horizontov v lese a jednoduchším vertikálnym profilom pôd na rozhraní lesa a lúky, ktoré tento druh huby vyhľadáva. Ročný rozsah variačnej šírky kontaminácie všetkých druhov húb, vzorkovaných na celom území Slovenska v rokoch 2009 – 2012 v rámci monitorovacieho programu Štátnej veterinárnej a potravinovej správy Slovenskej republiky sa pohyboval medzi hodnotami (2,9 - 4,1) magnitúdy, celý štvorročný súbor vykazoval variačnú šírku aktivity ¹³⁷Cs v hubách väčšiu ako 5 poriadkov (Miššík, 2013). Táto štúdia však bola vykonaná v oveľa väčšej priestorovej mierke – hustota odberov bola viac ako 5.10⁴ násobne nižšia, ako na odberovej ploche pri Čiernom – Svrčinovci.

Štatistická analýza celého súboru vzoriek z tohto odberového miesta potvrdila lognormálnu distribúciu koncentrácie aktivity ¹³⁷Cs v hubách (Kolmogorovov-Smirnovov test, $\alpha = 0,05$), zatiaľ čo aktivita primordiálneho ⁴⁰K sledovala normálne rozdelenie. Koncentrácia aktivity ⁴⁰K prevyšovala aktivitu ¹³⁷Cs vo všetkých vzorkách. Priemerná koncentrácia aktivity ⁴⁰K dosiahla (1127 ± 389) Bq.kg⁻¹ (s.hm.). Priemerná koncentrácia aktivity ¹³⁷Cs dosiahla 27,4 Bq.kg⁻¹ (dw), lognormálne rozdelené údaje vykazovali extrémne vysokú varianciu, vysokú hodnotu zošikmenia, z čoho vyplynulo predvídané variačné rozpätie pre (pre 99,75%) od 0,49 Bq.kg⁻¹ po 1537 Bq.kg⁻¹. Očakávaná hodnota priemeru (expectation value) kontaminácie plodníc ¹³⁷Cs na tejto lokalite dosiahla 67,4 Bq.kg⁻¹ (s.hm.). Silne deformovaný tvar lognormálneho rozdelenia s pretiahnutým tvarom k vyšším hodnotám vedie k podhodnoteniu strednej hodnoty súboru dát pri obmedzených počtoch vzoriek. V prípade veľmi vysokého počtu vzoriek ($n \rightarrow \infty$) by sa aritmetický priemer mal priblížiť k očakávanej hodnote priemeru lognormálne rozdeleného súboru (Semizhon et al., 2009). Podobne vysoké rozsahy variačnej šírky boli zistené v Belgicku, kde sa použili 10- a 100-krát väčšie študijné oblasti a vyššia hustota vzorkovania (Gillet a Crout, 2000). Medzi hlavné faktory ovplyvňujúce pozorovanú variabilitu v nameranej kontaminácii húb patria priestorové rozloženie mobilizovateľného inventára ¹³⁷Cs, a to najmä vo vrstve obklopujúcej mycéliam, hĺbka a rozsah mycélia a stupeň miešania organických a anorganických pôdnych vrstiev (Kruyts et al. , 2004).

Tab 1 Rozsah koncentrácie aktivity ¹³⁷Cs a ⁴⁰K (Bq.kg⁻¹ s.hm.) v plodniciach húb nazbieraných v rokoch 2012 – 2013 na odberovej lokalite v blízkosti obce Čierne – Svrčinovec

Druh	n	Cs- ¹³⁷ Bq.kg ⁻¹ s.hm.		K- ⁴⁰ Bq.kg ⁻¹ s.hm.	
		max.	min.	max.	min.
<i>Paxilus involutus</i>	2	248.8	÷ 149.7	1353	÷ 1146
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	1	142.3 ± 14.6		1448 ± 30.5	
<i>Lactarius deliciosus</i>	1	101.4 ± 8.7		1075 ± 7.4	
Mixture of mushrooms	7	100.6	÷ 39.6	1181	÷ 822
<i>Russula ochroleuca</i>	2	48.5	÷ 22.1	908	÷ 850
<i>Hygrophoropsis aurantiaca</i>	1	36.8 ± 4.5		642 ± 17.3	
<i>Volvariella hypopithys</i>	1	36.6 ± 3.1		1313 ± 13.4	
<i>Lactarius piperatus</i>	1	30.0 ± 2.9		834 ± 12.3	
<i>Amanita muscaria</i>	7	27.2	÷ 6.0	997	÷ 767
<i>Russula turci</i>	4	26.1	÷ 14.0	828	÷ 907
<i>Russula risigallina</i>	1	22.1 ± 2.9		908 ± 11.4	
<i>Russula olivacea</i>	1	16.6 ± 2.1		795 ± 28.3	
<i>Macrolepiota procera</i>	2	≤ LLD = 2.29	÷ ≤ LLD = 0.76	1035	÷ 947

Legenda: LLD – minimálna detekovateľná aktivita

*V prípade n=1 je uvedená nameraná koncentrácia aktivity s kombinovanou neistotou stanovenia (pre 2σ)

Okolie Richnavy a Kluknavy

Pre získanie informácií o možnosti existencie hubárskych lokalít s ustálenými výnosmi obľúbených druhov jedlých húb, známych len skúseným lokálnym zberateľom, boli analyzované huby zakúpené od predajcov z rómskych osád na Spiši na začiatku augusta 2012. V tomto období pretrvávalo na celom Slovensku mimoriadne dlhé obdobie horúceho a suchého počasia, napriek tomu boli zakúpené plodnice svieže a vo veľmi dobrom stave. S veľkou pravdepodobnosťou museli byť nazbierané v lokalitách dobre skrytých pred bežnými hubármi a na ktorých musela byť mikroklima udržiavaná vhodným reliéfom terénu, hustým lesným porastom a najmä prítomnosťou povrchovej vode. Takéto lokality sú zároveň veľmi pravdepodobným miestom sekundárnej depozície vo vode rozpustnej frakcie ¹³⁷Cs pri jej laterálnej redistribúcii v exponovaných zalesnených terénoch.

Tab 2 Variačná šírka koncentrácie aktivity ¹³⁷Cs a ⁴⁰K v plodniciach húb zakúpených alebo nazbieraných v blízkosti obcí Richnava a Kluknava (Spiš, východné Slovensko) v auguste 2012

Druh	n	Cs- ¹³⁷ Bq.kg ⁻¹ s.hm.		K- ⁴⁰ Bq.kg ⁻¹ s.hm.	
		max.	min.	max.	min.
<i>Boletus edulis</i>	4	263.3	÷ 63.7	745	÷ 428
<i>Sarcodon imbricatus</i>	1	69.5 ± 8.0		711 ± 87	
<i>Leccinum albostipitatum</i>	4	43.2	÷ 17.2	737	÷ 630
<i>Boletus reticulatus</i>	1	16.7 ± 2.4		820 ± 94	
<i>Neoboletus luridiformis</i>	1	11.5 ± 1.9		809 ± 94	

Legend: * V prípade n=1 je uvedená nameraná koncentrácia aktivity s kombinovanou neistotou stanovenia (pre 2σ)

Koncentrácia aktivity ^{137}Cs v hubách s vysokou pravdepodobnosťou pochádzajúcich z lesov v okolí oboch obcí sa pohybovala v rozmedzí od $(263,3 \pm 20,3) \text{ Bq.kg}^{-1}$ v *Boletus edulis* po $(11,5 \pm 1,9) \text{ Bq.kg}^{-1}$ v *Neoboletus luridiformis*. Pozorovaný rozsah aktivít ^{137}Cs len mierne prevyšujúci 1 magnitúdu pre celý súbor vzoriek je pomerne úzky, čo by mohlo byť spôsobené nielen nízkym počtom vzoriek, ale predovšetkým viditeľným zoskupením hodnôt nameraných v dvoch druhoch zakúpených jedlých húb (*B. edulis* a *L. albobostipitatum*), čo naznačuje, že môžu pochádzať z nálezísk malého rozsahu. Rovnako ako v súbore vzoriek z lokality Čierne – Svrčinovec v každej vzorke koncentrácia aktivity ^{40}K prevyšovala aktivitu ^{137}Cs , ale priemerná koncentrácia aktivity ^{40}K ($701 \pm 210) \text{ Bq.kg}^{-1}$ (s.hm.) bola nižšia ako na predchádzajúcej lokalite. Geometrický priemer koncentrácie aktivity ^{137}Cs v plodniciach bol $49,0 \text{ Bq.kg}^{-1}$ (s.hm.), štatistická analýza lognormálne rozdelených dát odhadla ich celkovú (99,75%) variačnú šírku v rozmedzí od $1,73 \text{ Bq.kg}^{-1}$ po 1386 Bq.kg^{-1} , s očakávanou strednou hodnotou súboru na úrovni $91,2 \text{ Bq.kg}^{-1}$ s.hm.

Skutočnosť, že uprostred dlhého obdobia sucha boli miestny zberači schopní dodávať vysoko cenené druhy jedlých húb vo veľmi dobrej kvalite a množstve ukazuje, že v okolí osád by mali existovať vhodné miesta udržiavajúce výborné podmienky pre rast húb, ktoré nie sú známe príležitostným hubárom z väčšinového obyvateľstva. Spišský región má podľa dostupných údajov (Gluch a i., 2005) v rámci Slovenska nižšiu ako priemernú mieru kontaminácie územia. Získané údaje tak naznačujú možnú existenciu laterálnej sekundárnej redistribúcie rozpustného ^{137}Cs do zalesnených miest v reliéfnych depresiách. Vzhľadom na obmedzený rozsah predkladanej práce, nie sú tieto predpoklady veľmi dobre podložené. Mohli by však upozorniť na potrebu monitorovania situácie v lesných ekosystémoch Slovenska z hľadiska budúcnosti, nakoľko ^{137}Cs sa v nich bude naďalej pohybovať v uzavretých cykloch ešte viac ako dve storočia a v niektorých častiach lesa sa budú môcť zmeniť rozloženia lokálnych inventárov tohto kontaminantu. Tak by sa mohli vytvoriť priaznivé podmienky pre rast jedlých húb s nadlimitnou kontamináciou ^{137}Cs . V takomto prípade by sa do kritických skupín obyvateľstva ohrozených vnútornou kontamináciou ^{137}Cs dostali najmä ľudia žijúci v hmotnej núdzi, ktorí si nielen privyrábajú zberom húb, ale huby sú aj pravidelnou zložkou ich potravy. V súčasnosti je možné z dostupných pozorovaní miery kontaminácie húb na Slovensku (Bazala et al, 2005 ;. Dvořák et al, 2006 ;. Kalač, 2012; Miššík, 2013) usudzovať, že pravdepodobnosť nálezu jedlých húb presahujúcich zákonný hygienický limit 6000 Bq.kg^{-1} (s.hm) (ES, 2009) je veľmi malá. V dobrých hubárskych sezónach by aj príjem cézia z takýchto húb bol rozriedený podstatne nižšími, väčšinou len stopovými množstvami ^{137}Cs v hubách z veľkých oblastí s nízkym inventárom tohto kontaminantu.

ZÁVER

Obmedzený rozsah predloženej práce dovoľuje len mierne podporovať domnienku, že sa v lesných ekosystémoch môžu vytvárať malé lokality v ktorých sa pomaly navyšuje inventár húb prístupného ^{137}Cs laterálnou redistribúciou v exponovanom krajinnom reliéfe. Dostupné údaje o pozorovanej kontaminácii húb v rôznych oblastiach Slovenska ale zatiaľ nedovoľujú predpokladať významný výskyt vysoko kontaminovaných plodníc a teda ani existenciu kritických skupín obyvateľstva z radov marginalizovaných komunít, kde by mohlo dochádzať k prekročeniu zákonných limitov v príjme potravy kontaminovanej rádioaktívnym ^{137}Cs z takýchto lokalít.

Podakovanie:

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

- AARKROG, A. 1988. The Radiological Impact of the Chernobyl Debris Compared with that from Nuclear Weapons Fallout. *Journal of Environmental Radioactivity*, 6, 151-162. ISSN 0265-931X. [http://dx.doi.org/10.1016/0265-931x\(88\)90058-6](http://dx.doi.org/10.1016/0265-931x(88)90058-6)
- BAZALA, M.A., BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G., ČIPÁKOVÁ, A. 2005. Bioaccumulation of ^{137}Cs in wild mushrooms collected in Poland and Slovakia. *Nukleonika*, 50 (Supplement 1), S15-S18.
- BOSSEW, P., DITTO, M., FALKNER, T., HENRICH, E., KIENZL, K., RAPPELSBERGER, U. 2001. Contamination of Austrian soil with caesium- 137 . *Journal of Environmental Radioactivity*, 55, 187-194. ISSN 0265-931X. [http://dx.doi.org/10.1016/s0265-931x\(00\)00192-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0265-931x(00)00192-2)
- COMMISSION RECOMMENDATION 2003/274/Euratom on the protection and information of the public with regard to exposure resulting from the continued radioactive caesium contamination of certain wild food products as a consequence of the accident at the Chernobyl nuclear power station. *Official Journal L*, 99, 17.4.2003, 55.
- COUNCIL REGULATION (EURATOM) No. 3954/87 of 22.December 1987 laying down maximum permitted levels of radioactive contamination of foodstuffs and of feedingstuffs following a nuclear accident or any other case of radiological emergency. *Official Journal L*, 371, 30.12.1987, 11.
- EC 2009. COUNCIL REGULATION No.1048/2009 of 23. October 2009 amending Regulation (EC) No 733/2008 on the conditions governing imports of agricultural products originating in third countries following the accident at the Chernobyl nuclear power station. *Official Journal L*, 290/4, 6.11.2009
- DVOŘÁK, P., KUNOVÁ, V., BEŇOVÁ, K., OHERA, M. 2006. Radiocesium in mushrooms from selected locations in the Czech Republic and Slovak Republic. *Radiation and Environmental Biophysics*, 45 (2), 145-151. <http://dx.doi.org/10.1007/s00411-006-0044-5>
- EC 1998. *EU Food restriction Criteria for Application after an Accident*. Radiation Protection 105. European Commission, Directorate-General Environment, Nuclear Safety and Civil Protection. 14 .
- GILLET, A.G., CROUT, N.M.J. 2000. A review of ^{137}Cs transfer to fungi and consequences for modeling environmental transfer. *Journal of Environmental Radioactivity*, 48, 95-121. ISSN 0265-931X. [http://dx.doi.org/10.1016/s0265-931x\(99\)00060-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0265-931x(99)00060-0)
- GLUCH, A., SMOLÁROVÁ, H., ČÍŽEK, P. 2005. *Reambulácia máp rádioaktivity ^{137}Cs územia Slovenska v mierkach 1 : 200 000 a 1 : 500 000*. Záverečná správa geologickej úlohy. Bratislava: Štátny geologický ústav Dionýza Štúra, Digitálny archív Geofondu. [cit. online: 25.5.2013], <http://www.geology.sk/new/sk/sub/ms/radcs>
- GUDIENSEN, P. H., HARVEY, T. F., LANGE, R. 1989. Chernobyl source term, atmospheric dispersion and dose estimation. *Health Physics*, 57(5), 697-706. <http://dx.doi.org/10.1097/00004032-198911000-00001>
- GUILLÉN, J., BAEZA, A. 2014. Radioactivity in mushrooms: A health hazard? *Food Chemistry*, 154, 14-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.083>
- KALÁČ, P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113, 9-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.077>
- KALÁČ, P. 2012. Radioactivity of European wild growing edible mushrooms. In *Mushrooms: types, properties and nutrition*. ANDRES, S. – BAUMANN, N. (eds.). Hauppauge: Nova Science Publishers, 215-230. ISBN 978-1-61470-110-1 2012.

- KRUYTS, N., TITEUX, H., DELVAUX, B. 2004. Mobility of radiocesium in three distinct forest floors. *Science of the Total Environment*, 319, 241-252. ISSN 0048-9697. [http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697\(03\)00369-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697(03)00369-3)
- LEHTO, J., VAARAMAA, K., LESKINEN, A. 2013. ^{137}Cs , $^{239,240}\text{Pu}$ and ^{241}Am in boreal forest soil and their transfer into wild mushrooms and berries. *Journal of Environmental Radioactivity*, 116, 124-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvrad.2012.08.012>
- LETTNER, H., BOSSEW, P., HUBMER, A.K. 2000. Spatial variability of fallout Caesium- 137 in Austrian alpine regions. *Journal of Environmental Radioactivity*, 47, 71-82. ISSN 0265-931X. [http://dx.doi.org/10.1016/s0265-931x\(99\)00023-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0265-931x(99)00023-5)
- MARKECHOVÁ, D., STEHLÍKOVÁ, B., TIRPÁKOVÁ, A. 2011. *Štatistické metódy a ich aplikácie*. Nitra: Univerzita Konštantína Filozofa. 534. ISBN 978-80-8094-807-8.
- McGEE, E. J., SYNNOTT, H. J., JOHANSON, K. J., FAWARIS, B. H., NIELSEN, S. P., HORRILL, A. D., KENNEDY, V. H., BARBAYIANNIS, N., VERESOGLOU, D. S., DAWSON, D. E., COLGAN, P. A., McGARRY, A. T. 2000. Chernobyl fallout in a Swedish spruce forest ecosystem. *Journal of Environmental Radioactivity*, 48, 59-78. [http://dx.doi.org/10.1016/s0265-931x\(99\)00057-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0265-931x(99)00057-0)
- MIETELSKI, J.W., DUBCHAK, S., BĽAŽEJ, S., ANIELSKA, T., TURNAU, K. 2010. ^{137}Cs and ^{40}K in fruiting bodies of different fungal species collected in a single forest in southern Poland. *Journal of Environmental Radioactivity*, 101, 706-711. ISSN 0265-931X. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvrad.2010.04.010>
- MIŠŠÍK, J. 2013. *Dlhodobé zmeny v možnostiach prechodu rádioaktívneho cézia do vybraných potravinových produktov*. Dizertačná práca. SPU FBP. 126. (In slovak)
- POVINEC, P.P., SÝKORA, I., HOLÝ, K., GERA, M., KOVÁČIK, A., BRESTÁKOVÁ, L. 2012. Aerosol radioactivity record in Bratislava/Slovakia following the Fukushima accident – A comparison with global fallout and the Chernobyl accident. *Journal of Environmental Radioactivity*, 114, 81-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvrad.2012.05.008>
- SHAW, G. 2007. Radionuclides in Forest Ecosystems. In *Radioactivity in the Terrestrial Environment* (G.Shaw, Ed.) Elsevier, Radioactivity in the Environment Series, 10, 127-155. ISBN: 978-0-08-043872-6 [http://dx.doi.org/10.1016/s1569-4860\(06\)10006-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1569-4860(06)10006-6)
- SHOIGU, S.K., BOLSHOV, L.A. 2006. *Twenty years of the Chernobyl Accident. Results and problems in eliminating its consequences in Russia*. Russian national report. Moscow: Ministry of the Russian Federation for civil defence, emergencies, and elimination of consequences of natural disasters, 85 p. [cit. 2013-05-21]. http://chernobyl.undp.org/english/docs/rus_natrep_2006_eng.pdf.
- WINKELBAUER, J., VÖLKEL, J., LEOPOLD, M., HÜRKAMP, K., DEHOS, R. 2012. The vertical distribution of Cs-^{137} in Bavarian forest soils. *European Journal of Forest Research*, 131(5), 1585-1599. <http://dx.doi.org/10.1007/s10342-012-0626-5>

Identifikácia kvasiniek I. fylogenetickej skupiny *Cryptococcus laurentii* na základe hmotnostnej spektrometrie a sekvenáciou D1/D2 LSUrRNA domén

Vojtěch Ledvina^a, Dominika Hamříková^a, Barbora Stratilová^{b,c}, Jana Molnárová^b, Renáta Vadkertiová^b a Vladimír Pätoprstý^{b*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; *chempaty@savba.sk

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

Kľúčové slová

Cryptococcus flavecens, *Cryptococcus laurentii*, D1/D2 LSUrRNA, hmotnostná spektrometria

Úvod

Zaraďovanie kvasiniek do druhu *Cryptococcus laurentii* podliehalo pomerne častým zmenám, ktoré záviseli jednak od metód použitých na identifikáciu, ako aj od individuálneho prístupu jednotlivých vedeckých skupín, ktoré sa nimi zaoberali. V súčasnosti sa na identifikáciu kvasiniek používajú hlavne molekulárno-biologické metódy. Klinické izoláty kultúr *Cr. laurentii* boli na základe na porovnania sekvencií ITS oblasti a D1/D2 LSUrRNA rozdelené do dvoch fylogenetických skupín (Sugita a kol. 2000). Neskôr bola časť týchto kmeňov preskupená do samostatných druhov (Takashima a kol. 2003) v rámci „skupiny“ *Cryptococcus laurentii*, pričom tento názov súčasne ostal aj ako názov jedného druhu z prvej fylogenetickej skupiny. Okrem *Cr. laurentii* obsahuje táto fylogenetická skupina aj *Cr. flavecens* a *Cr. aureus*. Zmeny v druhovom zatriedení kvasiniek si vyžiadali aj opätovné preverenie zaradenia jednotlivých kmeňov v Zbierke kultúr kvasiniek, CHÚ SAV. Okrem sekvenovania D1/D2 LSUrRNA bola testovaná aj možnosť využiť biotypizáciu pomocou hmotnostnej spektrometrie na identifikáciu kvasiniek.

Identifikácia patogénnych mikroorganizmov hmotnostnou spektrometriou sa stala nerozlučnou súčasťou techník používaných v diagnostických laboratóriách [van Veen et al., 2010; Ho a Reddy, 2010] ako aj pri taxonomickom zaraďovaní nových kmeňov baktérií. Kým identifikácia prokaryontov je jednoduchšia a jednoznačnejšia, databázy stále neobsahujú dostatočné údaje o eukaryotických druhoch. Dôvodom je, že niektoré z nich po príprave vzoriek podľa predpísaných protokolov nedávajú spektrá, s ktorými by sa dalo ďalej pracovať. Medzi takéto mikroorganizmy môžu patriť kvasinky, napr. niektoré druhy rodu *Cryptococcus*, ktoré produkujú extracelulárne polysacharidy, ale väčšinou aj odolnú polysacharidovú kapsulu.

Náplňou tejto práce bolo porovnať dve najaktuálnejšie metódy taxonomického zaraďovania mikroorganizmov na základe porovnania veľmi blízkych druhov kvasiniek I. fylogenetickej skupiny *Cr. laurentii*, *Cr. laurentii* a *Cr. flavecens*. Ako kontrola pre porovnávacie štúdium boli zaradené aj dva kmene z II. fylogenetickej skupiny *Cr. laurentii*, kmene *Cr. victoriae* a jeden izolát, ktorý sa od ostatných kmeňov odlišuje, keďže netvorí polysacharidovú kapsulu.

Materiál a metódy

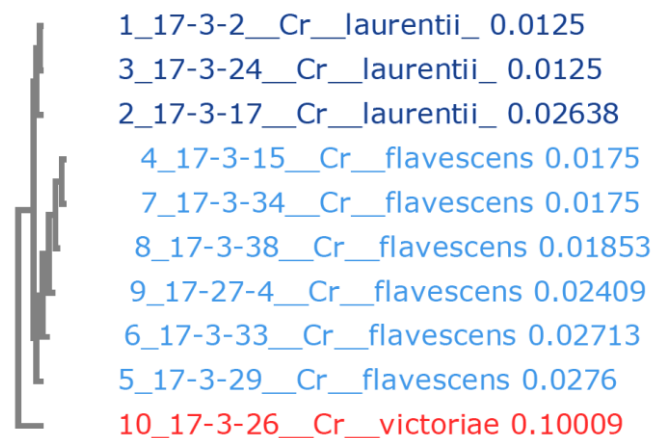
Testovalo sa 28 kmeňov kvasiniek, ktoré zahrňovali druhy *Cr. flavecens* (CCY 17-3-6**, CCY 17-3-15*, CCY 17-3-16, CCY 17-3-19, CCY 17-3-29*, CCY 17-3-31, CCY 17-3-32, CCY 17-3-33*, CCY 17-3-34*, CCY 17-3-38*, CCY 17-3-39), *Cr. laurentii* (CCY 17-3-2*, CCY 17-3-7, CCY 17-3-8, CCY 17-3-9, CCY 17-3-10, CCY 17-3-11, CCY 17-3-14, CCY 17-3-17*, CCY 17-3-20, CCY 17-3-21, CCY 17-3-22, CCY 17-3-23, CCY 17-3-24*, CCY 17-3-25), *Cr. flavecens/laurentii* (CCY 17-3-43/17-27-4*) a pre porovnanie aj *Cr. victoriae* (CCY 17-3-26*, CCY 17-3-27). Kvasinky pochádzali zo Zbierky kultúr kvasiniek (CCY), Chemický ústav SAV a boli kultivované 4 dni na šikmom YPD a Sabouraudovom agare pri 20 °C. Kmene, ktoré sú označené *, boli taxonomicky zaradené na základe sekvenovania ich D1/D2 LSUrRNA. Sekvencie boli porovnané programom MAFFT, ktorý súčasne vytvoril ich fylogram (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>). Kmeň CCY 17-3-6** bol zaradený do štúdie ako reprezentant akapsulárnych kmeňov.

Štvrtý deň kultivácie boli očkovačou slučkou odobraté vzorky z kultúr (jedno očko) do mikroskúmaviek s vrchnáčikom. Vzorky boli premyté 1x vodou a potom 1x 33% etanolom. Takto premyté vzorky boli vystavené

pôsobeniu 70% kyseliny mravčej s koncentrovaným ACN (1:1) na 30 min, po čom nasledovala centrifugácia a naniesenie 1 µl supernatantu na meraciu platničku MTP 384 target plate polished steel T F (Bruker), vysušenie a pridanie 1 µl matrice (kyselina ferulová, 10 mg/ml a kyselina sinapová, 30 mg/ml v 70% ACN). MALDI-TOF MS merania boli robené na zariadení UltrafleXtreme (Bruker) v lineárnom pozitívnom móde pre oblasť m/z 2-22 kDa. Zariadenie bolo kalibrované na Cytochróm C (Sigma). Surové spektrálne údaje sa spracovali pomocou softvéru MALDI Biotyper v. 3.0 (Bruker). Normalizované a spracované spektrá boli použité na vytvorenie MSP dendogramov (MALDI Biotyper 3.0, User Manual, Bruker Daltonics, 2010).

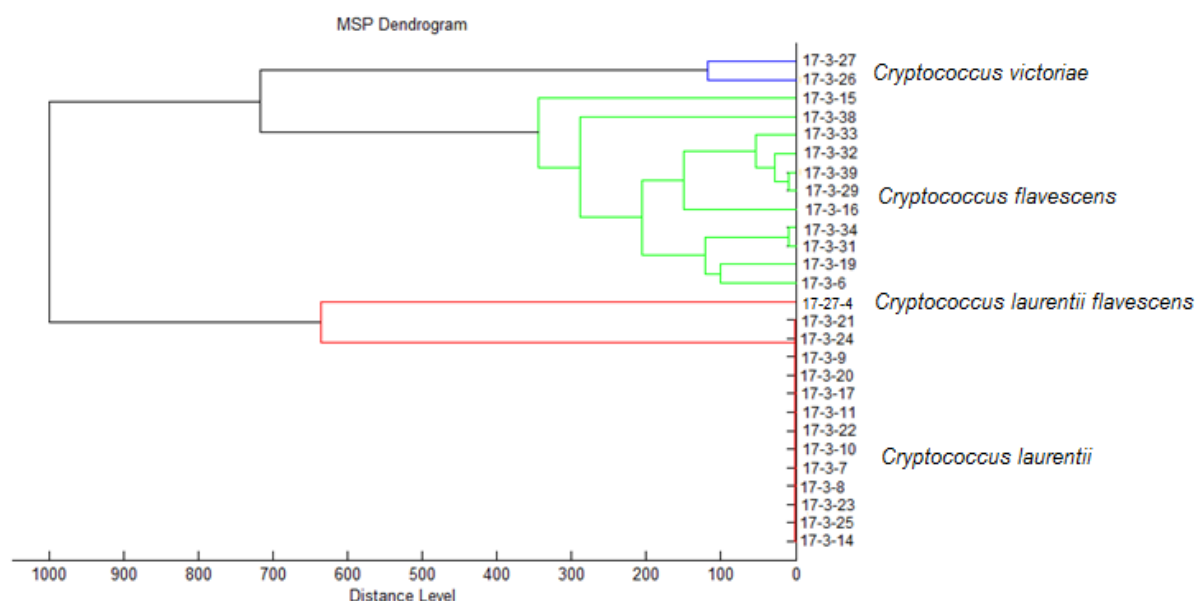
Výsledky a diskusia

Porovnanie kmeňov zo Zbierky kultúr kvasiniek na základe D1/D2 LSUrRNA sekvencií, zobrazuje Obr. 1. MAFFT fylogram korektne poukazuje na blízke skupiny druhov *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens* (I. fylogenetická skupina *Cr. laurentii*), ako aj ich rozdiel s *Cr. victoriae* (II. fylogenetická skupina *Cr. laurentii*). Tento výsledok je v súlade s rozdelením druhov navrhnutým Takashima a kol. (2003).

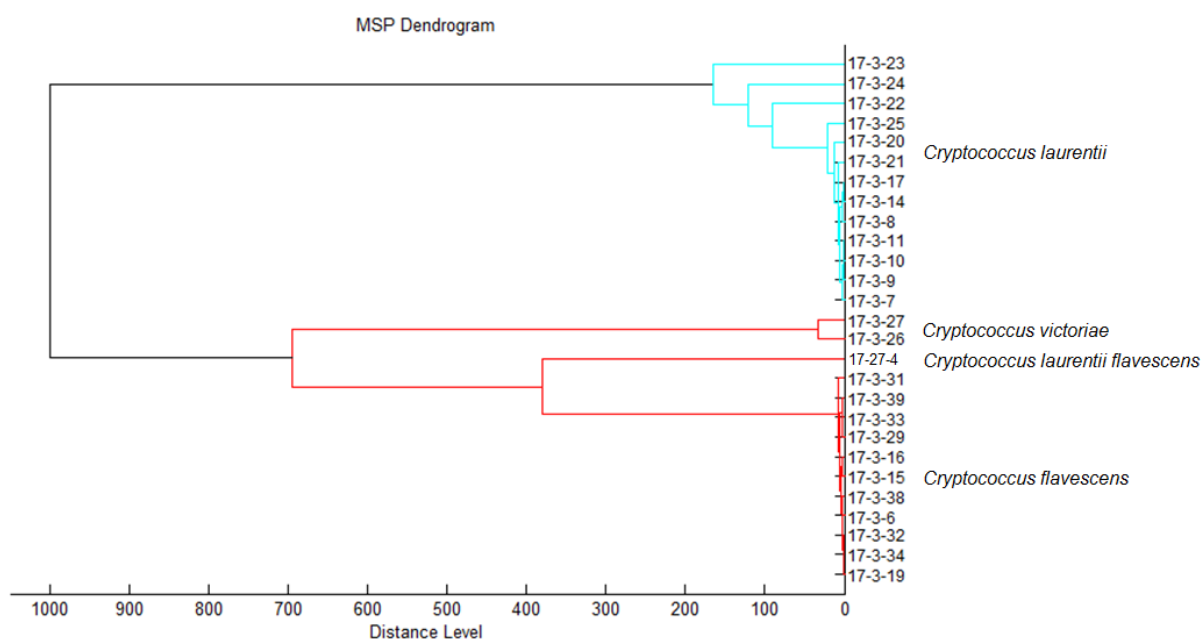


Obr. 1. MAFFT fylogram D1/D2 LSUrRNA sekvencií kmeňov I. fylogenetickej skupiny *Cr. laurentii* (druhy *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens*) porovnaných s kontrolným kmeňom *Cr. victoriae* CCY 17-3-26 z II. fylogenetickej skupiny *Cr. laurentii*.

Hlavným dôvodom, prečo sa testovala aj možnosť využiť pre účely Zbierky okrem D1/D2 LSUrRNA sekvenácie aj biotypizácia hmotnostnou spektrometriou, je menšia časová a finančná náročnosť tohto stanovenia, čo je dôležité najmä v prípade väčšieho počtu izolátov. Pre úspešnú aplikáciu biotypizácie je nevyhnutné mať k dispozícii referenčné spektrá, ktoré je najjednoduchšie získať biotypizáciou kmeňov, ktoré už boli sekvenované. MSP dendogramy vytvorené zo získaných spektier kmeňov sú zobrazené na Obr. 2 a Obr. 3.



Obr. 2. MSP dendrogram vytvorený z hmotnostných spektier kmeňov I. fylogenetической skupiny *Cr. laurentii* (druhy *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens*) rastúcich na Sabouraudovom agare porovnaných s kontrolnými kmeňmi *Cr. victoriae* CCY 17-3-26 a CCY 17-3-27 z II. fylogenetической skupiny *Cr. laurentii*.



Obr. 3. MSP dendrogram vytvorený z hmotnostných spektier kmeňov I. fylogenetической skupiny *Cr. laurentii* (druhy *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens*) rastúcich na YPD médiu porovnaných s kontrolnými kmeňmi *Cr. victoriae* CCY 17-3-26 a CCY 17-3-27 z II. fylogenetической skupiny *Cr. laurentii*.

Zvláštnosťou týchto dendrogramov je, že na jednej strane správne oddelili kmene *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens* z jednej fylogenetической skupiny, ale súčasne poukázali na to, že kmene *Cr. victoriae*, ktoré patria do inej fylogenetической skupiny, majú podobnejšie spektrá s *Cr. flavescens* ako *Cr. flavescens* a *Cr. laurentii* navzájom. Z tohto vyplýva, že biotypizácia je vhodná pre druhové zaradenie, ale pre zaradenie do vyšších taxonomických skupín je nevhodná. Rozdiel v spektre medzi akapsulárnym kmeňom *Cr. flavescens* a kapsulárnymi kmeňmi tohto druhu sa neprejavil. Kuriozitou je zaradenie kmeňa CCY 17-27-4, ktoré v závislosti od použitého média väčšinou naznačovalo príslušnosť k druhu *Cr. flavescens*, ale napr. po kultivácii na YPD médiu ho biotypizácia priradila k *Cr. laurentii*. Keďže určité nezrovnalosti boli zaznamenané aj pri sekvenovaní tohto kmeňa, pracovne sa označuje ako *Cr. flavescens/laurentii*.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

Ho Y-P, Reddy PM (2010) *Clin Chem* 56:525

van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) *J Clin Microbiol* 48:900

Sugita T, Takashima M, Ikeda R, Nakase T, Shinoda T (2000) *J Clin Microbiol* 38:1468

Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T (2003) *Int J Sys Evol Microbiol* 53:1187

MALDI Biotyper 3.0, User Manual, Bruker Daltonics, 2010

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>

Vplyv kultivačného média a prípravy vzorky na biotypizáciu kvasiniek rodu *Cryptococcus*

Alena Jurnečková^a, Barbora Stratilová^{b,c}, Jana Molnárová^b, Renáta Vadkertiová^b a Vladimír Pätoprstý^{b,*}

^aFakulta chemická, VUT v Brně, Purkyňova 118, CZ-61200 Brno, Česká republika

^bChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; *chempaty@savba.sk

^cPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

Kľúčové slová

Biotypizácia, *Cryptococcus*, D1/D2 LSUrRNA, hmotnostná spektrometria

Úvod

Biotypizácia je metóda, ktorá sa úspešne využíva na identifikáciu prokaryotických (van Veen a kol. 2010; Ho a Reddy 2010) a čím ďalej tým viac aj na identifikáciu eukaryotických mikroorganizmov (Stevenson a kol. 2010; Dhiman a kol. 2011; Yan a kol. 2011; McTaggart a kol. 2011) v klinických diagnostických laboratóriách. Je založená na stanovení tzv. molekulového odtlačku prstov, t.j. spektra m/z najmä ribozomálnych proteínov, ktoré sú druhovo typické, hmotnostnou spektrometriou (MALDI Biotyper 3.0, User Manual). Produkcia týchto proteínov je nezávislá od faktorov ako použité kultivačné médium alebo dĺžka kultivácie.

Kvasinky rodu *Cryptococcus* sú špecifické, keďže produkujú veľké množstvá extracelulárnych polysacharidov a väčšinou sú obalené polysacharidovou kapsulou, ktorá ich chráni pred nepriaznivými vplyvmi okolia (Pirofski a Casadevall 1996; Moyrand a kol. 2007; Mészárosová a Zaragoza 2012). Na rozdiel od ribozomálnych proteínov je produkcia extracelulárnych sacharidov rovnako ako veľkosť a zloženie kapsule závislá od typu kultivačného média a dĺžke kultivácie. V extrémnych prípadoch môže viesť prítomnosť týchto látok vo vzorke k skresleniu hmotnostných spektier a následnej nesprávnej interpretácii.

Náplňou tejto práce bolo študovať vplyv kultivačného média (YPD, zemiakový, Sabouraudov a sladínový agar, ako aj tekuté laktóзовé médium) na kvalitu a reprodukovateľnosť hmotnostných spektier a možnosti ich ovplyvnenia použitím modifikovanej prípravy vzoriek, ich aplikácie a merania.

Materiál a metódy

Testovalo sa 19 kmeňov kvasiniek rodu *Cryptococcus*, ktoré nepatrili do I. fylogenetickej skupiny *Cr. laurentii* a zahrňovali druhy *Cr. neoformans* (CCY 17-1-4*, CCY 17-1-5), *Cr. magnus* (CCY 17-4-39*, CCY 17-4-40), *Cr. victoriae* (CCY 17-3-26*), *Cr. carnescens* (CCY 17-3-13*), *Cr. gastricus* (CCY 17-5-1*), *Cr. flavus* (CCY 17-3-5*), *Cr. saitoi* (CCY 17-3-18*, CCY 17-4-2*), *Bulleromyces albus* (CCY 17-3-35*, CCY 17-3-36), *Cr. aerius* (CCY 17-4-9, CCY 17-25-1*), *Cr. diffluens* (CCY 17-4-13, CCY 17-3-1*), *Cr. terreus* (CCY 17-8-1*), *Cr. albidus* (CCY 17-4-1*), *Cr. macerans* (CCY 17-19-3*) a pre porovnanie aj typový kmeň *Cr. laurentii* (CCY 17-3-2*). Kvasinky pochádzali zo Zbierky kultúr kvasiniek (CCY), Chemický ústav SAV a boli kultivované 4 dni pri 20 °C na šikmých agaroch (YPD, zemiakový, Sabouraudov a sladínový) alebo za trepania v tekutom médiu s obsahom laktózy ako jediného zdroja uhlíka.

Kmene označené * boli taxonomicky zaradené na základe sekvenčnej analýzy D1/D2 domén génu 26rRNA. Fylogenetický strom bol vytvorený pomocou programu MAFFT (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>).

Optimalizácia prípravy vzoriek spočívala v použití piatich kombinácií premývania buniek, uvoľňovania proteínov, matric a aplikácií vzoriek na platničku MTP 384 target plate polished steel TF (Bruker). MS merania boli robené v lineárnom pozitívnom móde na zariadení UltrafleXtreme (Bruker). Namerané spektrá boli normalizované a spracované pomocou programu MALDI Biotyper v. 3.0 (MALDI Biotyper 3.0, User Manual, Bruker Daltonics, 2010), ktorý poskytol aj MSP dendogramy.

Výsledky a diskusia

Ako už bolo spomenuté v úvode práce, kvasinky rodu *Cryptococcus* produkujú extracelulárne a povrchové látky, ktoré môžu ovplyvniť kvalitu hmotnostných spektier ich ribozomálnych proteínov, ktoré sa využívajú pri taxonomickom zaradení kmeňov pomocou hmotnostnej spektrometrie. Výsledky pokusu ovplyvniť kvalitu

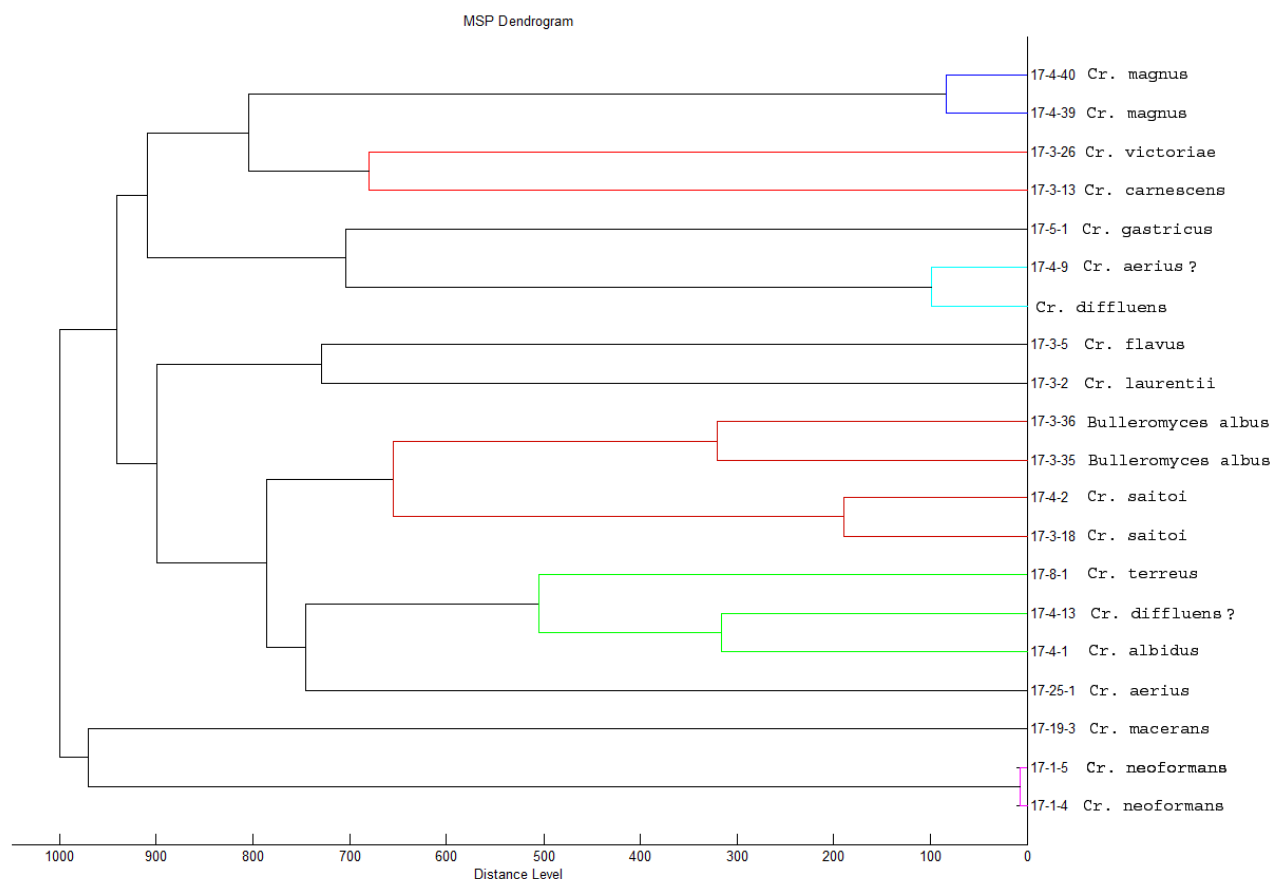
spektier menením kultivačného médií ako aj prípravou a meraním vzoriek, sú zhrnuté v tabuľke. Všeobecne najvhodnejšia bola kultivácia na YPD médiu, premývanie vzorky etanolom podľa protokolu predpísaného fy. Bruker, ale zámenou odporúčanej matrice CHCA za zmes SA:FA v pomere 3:1. Dôvodom je pravdepodobne fakt, že CHCA vizualizuje najmä proteíny s nižšími m/z, t.j. oblasť, ktorá je najviac kontaminovaná extracelulárnymi sacharidmi. V každom prípade je však nevyhnutné pred normalizáciou spektier posúdiť manuálne ich kvalitu, takže v prípade kvasiniek rodu *Cryptococcus* neodporúčame automatický spôsob biotypizácie používaný v klinických laboratóriách, ktorý môže viesť k mylnej identifikácii kmeňa.

Tabuľka: Percentuálne vyjadrenie množstva surových spektier, ktoré boli vhodné na ďalšie vyhodnotenie biotypizáciou v závislosti od použitého kultivačného média (YPD – “yeast peptone dextrose” agar, SA – Sabouraudov agar, ZA – zemiakový agar, SLA – sladínový agar a LM – tekuté laktóзовé médium) a od prípravy a aplikácii vzorky (označené ako premývanie buniek-matrica; v prípade premývania s EtOH boli proteíny uvoľňované 70% HCOOH, v prípade premývania s H₂O priamo matricou; CHCA – kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová, SA – kyselina sinapová, FA – kyselina ferulová).

Kultivačné médiu	Príprava a aplikácia vzorky		
	EtOH-CHCA	EtOH-SAFA	H ₂ O-SAFA
YPD	93.5%	100%	93.5%
SA	65.2%	69.6%	73.9%
ZA	67.4%	76.1%	95.6%
SLA	63.0%	78.3%	80.4%
LM	65.0%	80.0%	80.0%

Pre najlepšiu sadu spektier (získané na YPD – metóda EtOH-SAFA), bol zostrojený MSP dendrogram, ktorý by mal vyjadrovať príbuznosť jednotlivých kmeňov založenú na podobnosti spektier (Obr. 1). Vo väčšine prípadov bola druhová závislosť uspokojivo zobrazená, problém nastal len s kmeňmi CCY 17-4-8 (spektrá naznačujú, že ide o *Cr. diffluens*) a CCY 17-4-13 (spektrá naznačujú, že ide o *Cr. albidus*). Vzhľadom na to, že ani jeden z kmeňov nebol ešte zaradený na základe sekvencií D1/D2 domén génu 26rRNA, navrhujeme ich zaradenie overiť sekvenačnou analýzou.

Základný rozdiel medzi MSP dendrogramom a fylogramom, ktorý je založený na porovnaní D1/D2 LSUrRNA sekvencií kvasiniek, je v tom, že fylogram je schopný ukázať okrem druhovej závislosti aj závislosť od vyšších kategórií, napr. skupín a radov (Obr. 2).



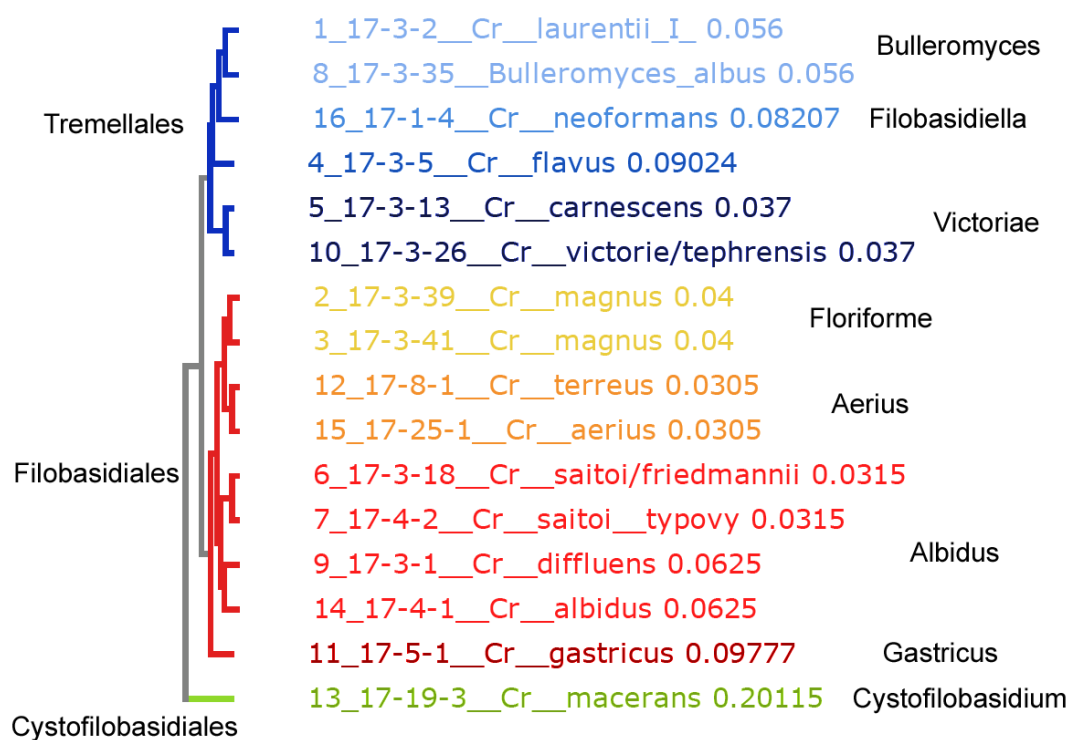
Obr. 1. MSP dendrogram vybraných kvasiniek rodu *Cryptococcus* rastúcich na YPD médiu. Vzorky boli pripravené metódou EtOH-SAFA.

Záver

Ako sa dalo očakávať, percento hmotnostných spektier vhodných pre biotypizáciu kvasiniek rodu *Cryptococcus* sa dalo ovplyvniť výberom vhodného kultivačného média a metódy prípravy vzorky. Najkvalitnejšie spektrá sa získali po kultivácii na YPD médiu. Vhodnejšie je použitie matric, ktoré lepšie vizualizujú vyššie m/z a pred normalizáciou je nevyhnutné všetky spektrá manuálne posúdiť.

Podakovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.



Obr. 2. MAFFT fylogram D1/D2 LSU rRNA sekvencií kvasiniek rodu *Cryptococcus*

Literatúra

- Dhiman N, Hall L, Wohlfel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL (2011) *J Clin Microbiol* 49:1614
- Ho Y-P, Reddy PM (2010) *Clin Chem* 56:525
- McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A., Zhang SX (2011) *J Clin Microbiol* 49:3050
- Mészárosová Cs, Zaragoza O (2012) *Bulletin ČSSM* 1:5
- Moyrand F, Fontaine T, Janbon G (2007) *Mol Microbiol* 64:771
- Pirofski L, Casadevall A (1996) *Zentralbl Bacteriol* 284:475
- Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR (2010) *J Clin Microbiol* 48:3482
- van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010) *J Clin Microbiol* 48:900
- Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, Stratton ChW, Kostrzewa M, Tang Y-W (2011) *J Clin Microbiol* 49:2528
- MALDI Biotyper 3.0, User Manual, Bruker Daltonics, 2010
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>

Identifikácia vedľajšieho produktu reakcie xyloglukán nonasacharidu s fenylizotiokyanátom (FITC) hmotnostnou spektrometriou

Silvia Vlčková^a, Barbora Stratilová^{a,b}, Vlasta Sasinková^a a Vladimír Pätoprstý^{a*}

^aChemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, Slovensko; *chempaty@savba.sk

^bPrírodovedecká fakulta UK v Bratislave, Mlynská dolina, SK-84215 Bratislava, Slovensko

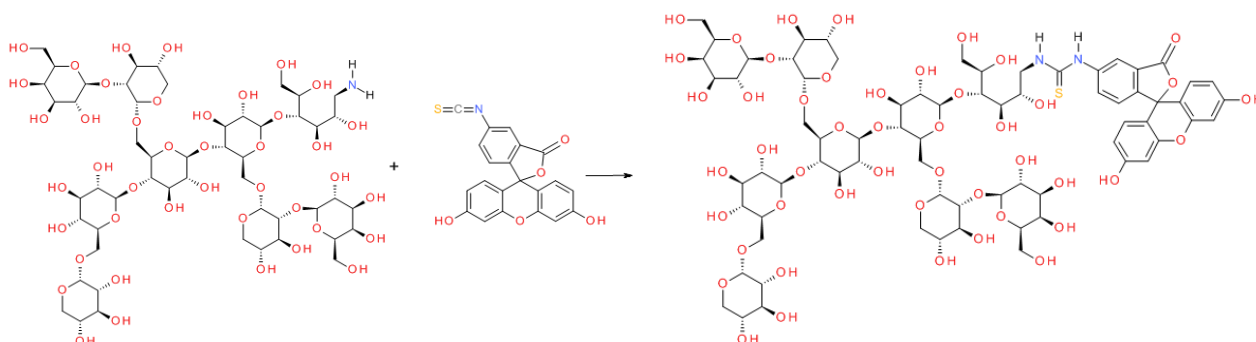
Kľúčové slová

Fenylizotiokyanát; FITC; hmotnostná spektrometria; orbitrap; xyloglukán nonasacharid

Úvod

Aktivita enzýmov typu xyloglukánendotransglykozláza, ktorá katalyzuje štiepenie xyloglukánu (XG) ako donorového substrátu endomechanizmom a prenáša fragment s pôvodným neredukujúcim koncom na iný XG alebo xyloglukánoligosacharid (XGOS), sa nedá stanoviť bežnými metódami, ktoré sa používajú pre hydrolázy. Z tohto dôvodu sa vyvinuli rôzne metódy, z ktorých sú najefektívnejšie tie, ktoré využívajú ako akceptorové substráty XGOS značené rádioaktívne alebo fluorescenčne, pričom sa vzhľadom na štruktúru XG využíva najčastejšie značený xyloglukán hepta, okta- alebo nona- sacharid (XGO9) [Fry a kol. 1992; Farkaš a kol. 1992; Nishitani a Tominaga 1992; Fry 1997; Farkaš a kol. 2005; Saura-Valls a kol. 2006].

Jednou z najznámejších fluorescenčných značiek je FITC, fluoresceínizotiokyanát. Reakcia medzi oligosacharidmi a FITC vyžaduje v prvom kroku amináciu redukujúceho konca sacharidu, ktorú sprevádza otvorenie kruhu. V druhom kroku dochádza k adícii na dvojné väzby FITC. Táto adícia by mala byť vzorovým príkladom takéhoto typu reakcie:



Pri charakterizácii finálneho produktu väzby medzi XGO9 a FITC, ktorá bola založená na MALDI TOF hmotnostnej spektrometrii [Kosík et al. 2011] bol pozorovaný vznik vedľajšieho produktu, ktorého m/z bolo približne o 34 D nižšie ako m/z produktu s molekulovou hmotnosťou 1777,616 Da.

Cieľom tejto práce bolo vylúčenie vplyvu iónového zdroja MALDI TOF zariadenia na vznik vedľajšieho produktu, stanovenie oblasti v molekule, kde dochádza k strate atómov a návrh štruktúry vedľajšieho produktu reakcie.

Material a metódy

XGO9 bol pripravený enzýmovou hydrolýzou prečisteného tamariškového XG (Dainippon Sumimoto Pharmaceutical) podľa popísaného postupu [Sulová a kol. 1996].

XGO9-FITC bol pripravený podľa protokolu vypracovaného pre deriváty sulforodamínu [Kosík a Farkaš 2008].

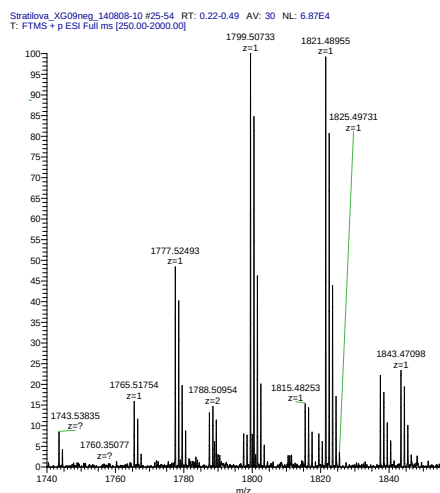
100x nariadená vzorka XGO9-FITC 1mM octanom amónnym s 0.5% kyselinou octovou v 50% metanole bola priamo nastrekovaná rýchlosťou 5 $\mu\text{l/s}$ do zahrievaného elektrospreja (50 °C, napätie 4kV) hmotnostného spektrometra Orbitrap VelosPro (ThermoScientific) riadeného programom Excalibur v. 2.1. Tento softvér slúžil aj na spracovanie spektier.

FITC a zlyofilizovaný XGO9-FITC boli analyzované aj FTIR (Nicolet 6700 so Smart Orbit

modulom, ThermoScientific). Použitá bola ATR technika (metóda totálneho odrazu) s rozlíšením 4000.

Výsledky a diskusia

Ako už bolo spomenuté, pri charakterizácii finálneho produktu reakcie medzi XGO9 a FITC, bol pozorovaný vznik vedľajšieho produktu, ktorého m/z bolo približne o 34 D nižšie, ako m/z produktu s molekulovou hmotnosťou 1777,616 Da [Kosík et al. 2011]. Pozorovaných 34 Da by mohlo zodpovedať úbytku H_2O_2 alebo H_2S z XGO9-FITC molekuly. Aby sme vylúčili možný vplyv iónového zdroja MALDI, ktoré by mohlo viesť k fragmentácii látky v zdroji, použili sme meranie na Orbitrape, ktorý má jemnejšiu ionizáciu a presnejšie meranie. Výsledky opäť potvrdili prítomnosť vedľajšieho produktu reakcie (Obr. 1).

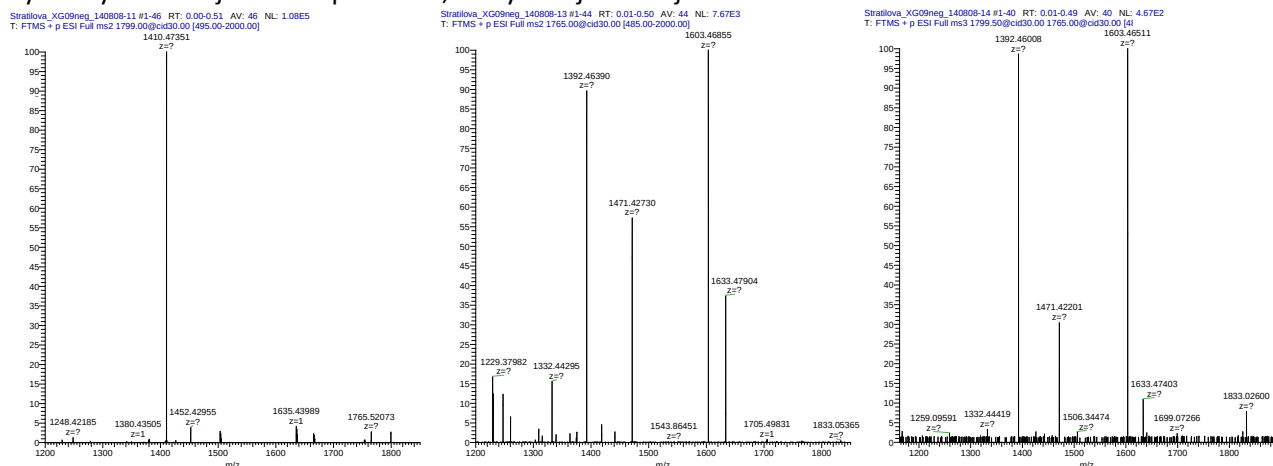


Obr. 1. Analýza reakčných produktov aminovaného XGO9 a FITC

Rozdiel medzi $[M+H]^+$ XGO9-FITC a $[M+H]^+$ vedľajšieho produktu alebo medzi $[M+Na]^+$ XGO9-FITC a $[M+Na]^+$ vedľajšieho produktu je 33.989 Da, čo skôr naznačuje stratu H_2S (Obr. 1).

Fragmentácia hlavného a vedľajšieho produktu ukázala píky s m/z 1665.45088, 1635.43989 a 1503.39789, ktoré sú charakteristické pre XGO9-FITC a môžu byť interpretované ako strata sacharidových zvyškov a zodpovedajúce píky vedľajšieho produktu s m/z 1603.46855, 1633.47904 a 1471.42730 (Obr. 2). MS2 analýza produktov teda naznačila, že rozdiel v m/z je zapríčinený rozdielom v oblasti novovytvorenej väzby.

Ďalšia tvorba vedľajšieho produktu ako dôsledku samotnej fragmentácie bola tiež dokázaná, keďže píky z MS3 fragmentácie XGO9-FITC (1799 -> 1765) sú podobné s tými, ktoré sa získali z MS2 vedľajšieho produktu. Tieto výsledky naznačujú tvorbu produktu, ktorý ďalej označujeme ako B.

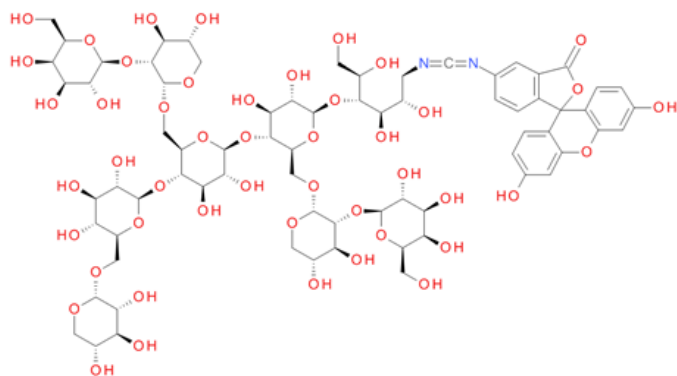


Obr. 2. Fragmentácia reakčných produktov aminovaného XGO9 a FITC

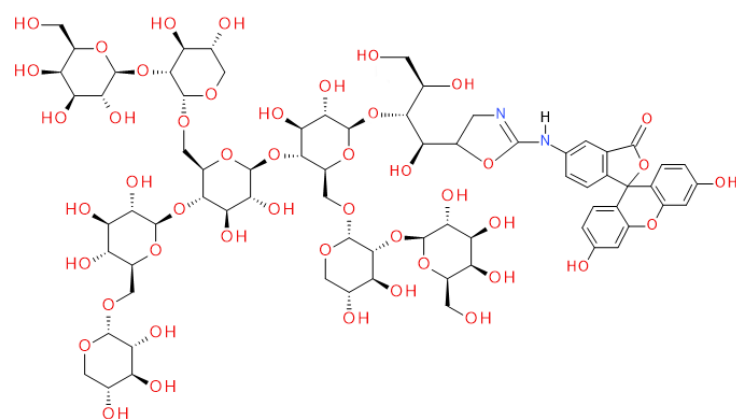
Ak predpokladáme stratu H_2S z oblasti väzby medzi aminovaným koncom sacharidu a $S=C=N$ - FITC, mohli by vznikať zlúčeniny so štruktúrami A alebo B (Obr. 3). Vznik zlúčeniny so štruktúrou A môže byť vylúčený, lebo

pomocou IR-FTIR sme nezistili po reakcii prítomnosť charakteristického pásu 2150-2100 typického pre karbodiimidy [Günzler a Gremlich 2002].

A



B



Obr. 3. Návrh štruktúr vedľajšieho produktu reakcie amínovaného XGO9 a FITC

Záver

Predpokladáme, že vedľajší produkt reakcie medzi amínovaným XGO9 a FITC má štruktúru zobrazenú ako B (Obr. 3). Vzhľadom na presnejšie merania v Orbitrape (rozdiel m/z 33,989 Da) predpokladáme uvoľnenie H_2S z oblasti novovytvorenej väzby (S z FITC, jeden H z dusíka amínovaného sacharidu, druhý z OH-skupiny jeho C2), čo pravdepodobne vedie k dodatočnej cyklizácii a evidentnej stabilizácii vedľajšieho produktu reakcie.

PodĎakovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt Dobudovanie technickej infraštruktúry pre výskum v oblasti nových biotechnológií, ITMS 26210120029, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- Fry S.C., Smith R.C., Renwick K.F a kol. (1992) *Biochem. J.* 282, p. 821
 Farkaš V., Sulová Z., Stratilová E., a kol. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 298, p. 365
 Nishitani K., Tominaga R.J. (1992) *Biol. Chem.* 267, p. 21058
 Fry S.C. (1997) *Plant J.* 11, p. 1141
 Farkaš V., Ait-Mohand F., Stratilová E. (2005) *Plant Physiol. Biochem.* 43, p. 431
 Saura-Valls M., Faure R., Ragas S a kol. (2006) *Biochem. J.* 395, p. 99
 Kosík O., Garajová S., Matulová M a kol. (2011) *Carbohydr. Res.* 346, p. 357
 Sulová Z., Lednická M., Farkaš V. (1995) *Anal. Biochem.* 229, p. 80
 Kosík O., Farkaš V. (2008) *Anal. Biochem.* 375, p. 232
 Günzler H., Gremlich H.V. (2002) *IR Spectroscopy. An Introduction.* Wiley-WCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, p. 238