



**VYSOKÁ ŠKOLA  
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
V PRAZE**

# **Sborník souhrnů a plných textů konference**

**KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2016**

Editor: Olga Mařátková, Irena Kolouchová

Praha 2016

## **Pořádající instituce:**

### **Ústav biotechnologie**

Fakulta potravinářské a biochemické technologie

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

## **Sponzoři, spolupracující společnosti a hosté:**

Bílek Filtry s.r.o.

Budějovický Budvar, n.p.

EPS, s.r.o.

Pivovary Lobkowicz, a.s.

Pivovary Staropramen, s.r.o.

Plzeňský Prazdroj a.s.

Státní zemědělská a potravinářská inspekce

## **Přípravný a organizační výbor:**

Ing. Irena Kolouchová, Ph.D.

Ing. Olga Mařátková, Ph.D.

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

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016

ISBN 978-80-7080-966-2

## OBSAH

Program konference	4
Souhrny a plné texty příspěvků	6
Potenciální možnosti snížení nákladů na produkci biosurfaktantů	7
Mořské aktinomycety jako zdroj biologicky aktivních látek	14
Reakce mikroorganismů na přítomnost nanočástic kovů	19
Biologické metody využívané k detekci N-acyl-homoserinových laktonů	26
Vliv zdroje dusíku na tvorbu pigmentů houbou <i>Monascus purpureus</i>	32
Intenzita gushingu v závislosti na tlaku	39
Urychlení scezování sladiny pomocí polyfenolových extraktů	40
Možnosti potlačování primárního přepěňování	41
Studium profilu těkavých látek v ciderech a obdobných nápojích	42
Možnosti využití odpadních surovin ze zpracování vinných hroznů	43
Vliv nanočástic kovů na biochemické vlastnosti modelových mikroorganismů	44
Studium exprese a charakterizace proteinu CotJC ze sporového pláště <i>Clostridium pasteurianum</i>	45
Sledování průběhu ABE fermentace pomocí mikroskopie a fluorescenční mikroskopie	46
Využití zemědělských a průmyslových odpadních surovin jako substrátu pro výrobu kyseliny mléčné	52
Produkce kyseliny mléčné jako prekurzor pro výrobu bioplastů	59
Vliv N-acetylcysteinu a cinnamaldehydu na stabilitu biofilmu oportunně patogenních mikroorganismů	60
Vliv chitosanu na tvorbu a stabilitu biofilmu	66
Vliv rhamnolipidů na tvorbu a stabilitu biofilmu na titanových materiálech	72

## PROGRAM KONFERENCE

### 1. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE SÁL B+C

9:00-9:10	<b>Zahájení konference</b>
9:10-9:40	<b>Počátky vědecké práce v oboru kvasné chemie</b> Basařová G., prof. Ing. DrSc.
9:40-10:10	<b>Využití netradičních kvasinek ve výrobě nealkoholických piv</b> Brányik T., doc. Ing. Ph.D.
10:10-10:20	<b>Biosorpční potenciál fototrofních mikroorganismů</b> Čadková A., Ing.
10:20-10:30	<b>Potenciální možnosti snížení nákladů na produkci biosurfaktantů</b> Ježdík R., Ing.
10:30-10:50	<i>PŘESTÁVKA</i>
10:50-11:00	<b>Mořské Aktinomycety jako zdroj biologicky aktivních látek</b> Ježková Z., Mgr.
11:00-11:10	<b>Reakce mikroorganismů na přítomnost nanočástic kovů</b> Koukalová M., Ing.
11:10-11:20	<b>Biologické metody využívané k detekci N-acyl-homoserinových laktonů</b> Paldrychová M., Ing.
11:20-11:30	<b>Vliv zdroje dusíku na tvorbu pigmentů houbou <i>Monascus purpureus</i></b> Patrovský M., Ing.
11:30-11:40	<b>Role genu <i>HAC1</i> ve stresové odpovědi kvasinky <i>Pichia pastoris</i></b> Raschmanová H., Ing.
11:40-11:50	<b>Povrchové vlastnosti <i>Clostridium pasteurianum</i> NRRLB 598 v průběhu buněčného cyklu</b> Strejc J., Ing.

### 2. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE SÁL A

10:50-11:00	<b>Intenzita gushingu v závislosti na tlaku</b> Bandy D., Bc.
11:00-11:10	<b>Změny obsahů volných a vázaných polyfenolů v průběhu sladování</b> Červený J., Bc.
11:10-11:20	<b>Urychlení scezování sladiny pomocí polyfenolových extraktů</b> Hanko V., Bc.
11:20-11:30	<b>Praktické metody pro zvýšení stability piva z minipivovarů</b> Potěšil A., Bc.
11:30-11:40	<b>Zlepšení stability pивní pěny pomocí sorbentů</b> Ulmann F., Bc.
11:40-11:50	<b>Příprava 8-prenylaringeninů ze zbytku po extrakci chmele</b> Skoupá H., Bc.
11:50-12:00	<b>Možnosti potlačování primárního přepěňování piva</b> Zítková K., Bc.
12:00-13:00	<i>OBĚD</i>

### 3. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE SÁL A

- 13:00-13:10 **Studium profilu těkavých látek v ciderech a obdobných nápojích**  
Nešpor J., Bc.
- 13:10-13:20 **Možnosti využití odpadních surovin ze zpracování vinných hroznů**  
Cviner P., Bc.
- 13:20-13:30 **Stanovení olova a mědi ve víně**  
Mitrofanova M., Bc.
- 13:30-13:40 **Kultivace mořských mikroorganismů s využitím slané odpadní vody z demineralizace syrovátky**  
Haiderová J., Bc.
- 13:40-13:50 **Vliv sraženin anorganických solí na autoflokulaci jednobuněčných řas**  
Hermannová K., Bc.
- 13:50-14:20 **PŘESTÁVKA**
- 14:20-14:30 **Vztah kompozice a funkce rhamnolipidových směsí**  
Khobta O., Bc.
- 14:30-14:40 **Degradace persistentních uhlovodíků v přítomnosti rhamnolipidového aditiva**  
Štěpánek V., Bc.
- 14:40-14:50 **Porovnání různých režimů provozu termofilního bioreaktoru pro odstraňování těkavých organických látek**  
Chalupa J., Bc.
- 14:50-15:00 **Vliv nanočástic kovů na biochemické vlastnosti modelových mikroorganismů**  
Novotná J., Bc.

### 4. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE SÁL B+C

- 13:00-13:10 **Vliv rozpouštědel na změny genové exprese u solventogenních klostridií**  
Bártek T. Bc.
- 13:10-13:20 **Studium exprese proteinu CotJC ze sporového pláště *Clostridium pasteurianum***  
Kaufman F., Bc.
- 13:20-13:30 **Sledování průběhu ABE fermentace s využitím mikroskopie a průtokové cytometrie**  
Drahokoupil M., Bc.
- 13:30-13:40 **Využití zemědělských a průmyslových odpadních surovin jako substrátu pro výrobu kyseliny mléčné**  
Gharwalová L., Bc.
- 13:40-13:50 **Produkce kyseliny mléčné jako prekurzoru výroby bioplastů**  
Chmelík J., Bc.
- 13:50-14:00 **Biologická aktivita pigmentů produkovaných houbou *Monascus purpureus***  
Hanáková M., Bc.
- 14:20-14:30 **Exprese a charakterizace lidských enzymů hemové dráhy**  
Kolářová L., Bc.
- 14:30-14:40 **Vliv N-acetylcysteinu a cinnamaldehydu na stabilitu biofilmu oportunně patogenních mikroorganismů**  
Lokočová K., Bc.
- 14:40-14:50 **Vliv chitosanu na tvorbu a stabilitu biofilmu**  
Marková L., Bc.
- 14:50-15:00 **Aplikace rhamnolipidů pro potlačení tvorby biofilmu na povrchu titanové oceli**  
Vučková T., Bc.

## **SOUHRNY A PLNÉ TEXTY PŘÍSPĚVKŮ**

## **Potenciální možnosti snížení nákladů na produkci biosurfaktantů**

R. Ježdík, J. Masák

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### **Abstrakt**

V současné době představují surfaktanty nedomyšlitelnou součást chemického průmyslu i běžného života, což také dokazuje roční produkce, která v roce 2000 činila 19 milionů tun. Z tohoto hlediska hrají surfaktanty důležitou roli ve světové ekonomice. Avšak používání surfaktantů přináší jistá rizika, především jejich ekologický dopad na životní prostředí, jelikož tyto látky jsou obecně špatně biologicky odbouratelné a toxické pro mnoho organismů a zároveň v přírodě přetrvávají po mnoho let. Z těchto důvodů se jako možná alternativa pro chemické surfaktanty do podvědomí dostávají biosurfaktanty, které jsou biologicky odbouratelné a tudíž nezatěžují životní prostředí.

Vynikající vlastnosti (povrchová aktivita, antimikrobiální aktivita, nízká toxicita a biodegradabilita) biosurfaktantů a jejich potenciál v nahrazení chemických surfaktantů jsou v posledních letech podrobně studovány, což dokazuje i velké množství patentů a vědeckých publikací. Navzdory všem výhodám, kterými biosurfaktanty disponují a možnostem potenciální aplikace v průmyslu, je jejich rozšíření limitováno vysokými produkčními náklady. Vysoké produkční náklady na výrobu biosurfaktantů jsou způsobeny několika faktory, zahrnujícími cenu substrátu (10 – 30 % celkových nákladů), nízké výtěžnosti bioproduktu a downstream procesy, které mohou představovat 60 – 80 % celkových nákladů. Z těchto důvodů je mnoho vědeckých publikací věnováno snížení nákladů na produkci biosurfaktantů. Výzkum lze v tomto ohledu rozdělit na výběr levnějšího substrátu, vedení bioproduktu, genetické inženýrství, produkce heterologními producenty případně hledání výkonnějších přirozených producentů a zjednodušení separačních procesů. Ačkoli v tomto směru bylo dosaženo jistých úspěchů, produkce biosurfaktantů v průmyslovém měřítku stále nedosahuje ekonomicky uspokojivých hodnot z důvodu nízkých výtěžností, které vedou k vysokým nákladům na izolaci a purifikaci produktu.

### **1. Biosurfaktanty**

Biosurfaktanty (BS) představují širokou škálu povrchově aktivních molekul produkovaných mnoha mikroorganismy. Amfifilní molekula BS je složena z hydrofilní části zastoupené kyselinami, peptidy, mono-, di-, nebo polysacharidy a z hydrofobní části tvořené nenasycenými nebo nasycenými uhlovodíky, či mastnými kyselinami. Tyto povrchově aktivní

látky vykazují mnoho vlastností zahrnující snižování povrchového a mezifázového napětí kapalin, tvorbu micel a mikroemulsí dvou nemísitelných fází. V nynější době jsou nejvíce studovány BS z řad glykolipidů, především rhamnolipidy, soforolipidy a mannosylerythritol. Obsahující jednu nebo dvě molekuly sacharidu a alifatickou nebo hydroxy alifatickou karboxylovou kyselinu. Z biotechnologického hlediska jsou nejvíce studovány rhamnolipidy produkované bakteriemi rodu *Pseudomonas* (Banat a kol., 2010).

### **1.1 Převedení produkce biosurfaktantů do průmyslového měřítka**

Ačkoli zájem o ekologicky šetrná agens roste, nejsou prozatím biosurfaktanty ve srovnání s chemickými surfaktanty konkurence schopné kvůli vysokým produkční nákladům (nákladné suroviny, nízká výtěžnost, sofistikované purifikační procesy). Tento fakt lze opomenout v případě aplikací (antibiotika, antitumorová agens), kde není nutností velkoobjemová produkce a cena není hlavním měřítkem aplikovatelnosti. Oproti tomu v případě průmyslových aplikací (MEOR), kde je kladen důraz na velkoobjemové produkce a cena je významným činitelem, je nutné redukovat produkční náklady na minimum (Helmy a kol., 2011).

Vysoké produkční náklady jsou způsobené malou efektivitou bioprocessu a používání nákladných surovin, zároveň používáním mikroorganismů s nízkou produktivitou. Nízká efektivita bioprocessu, respektive produkce BS v nízkých koncentracích zároveň ovlivňuje separační procesy, které mohou dosahovat až 80 % celkových nákladů. Z těchto důvodů je produkce BS velmi podrobně studována, především z hlediska zvýšení efektivity bioprocessu, hledání vhodných alternativních substrátů a levných a účinných separačních procesů použitelných v průmyslovém měřítku (Mukherjee a kol., 2006).

### **1.2 Vhodný substrát**

V minulosti bylo provedeno mnoho studií zabývajících se produkcí BS na běžných i kuriózních substrátech (etanol, ropné frakce, heptadekan, hexadekan) na definovaných médiích. Jelikož, výtěžnost produkce BS dosahuje pouze 0,1-0,62 mg/g substrátu (Henkel a kol., 2012), použití těchto zdrojů uhlíku navyšuje cenu finálního produktu. Z tohoto důvodu je první potenciální cestou, jak redukovat produkční náklady, výběr vhodného alternativního substrátu. Pro tento účel mohou být použity odpadní nebo vedlejší produkty ze zemědělství a potravinářských výroby s vysokým obsahem sacharidů, škrobu a případně tuků. Ačkoli použití těchto substrátů může přinášet do biotechnologické výroby jisté výhody zahrnující především snížení ceny produktu, mohou tyto substráty vytvářet komplikace ovlivňující celý technologický proces. Z těchto důvodů je z biotechnologického hlediska výhodnější využití čistých surovin, což je podtrženo množstvím patentů zabývajících se komerční produkcí BS, ve kterých je zřídka využíváno alternativních surovin (Banat a kol., 2014).



Pro udržení kvality v produktu a ekonomiky procesu je nutné zajistit konstantní složení substrátu, které v případě odpadních surovin může kolísat. Proto je nutné v některých případech několik odpadních substrátů kombinovat případně modifikovat tak aby bylo dosaženo požadované kvality. Avšak tyto procedury dále navyšují náklady, které následně ovlivní cenu finálního produktu (Helmy a kol., 2011).

### **1.2.1 Odpady obsahující sacharidy a škrob**

Odpady ze zemědělství, jako otruby, pšeničná a rýžová sláma, slupky sojových bobů, kukuřice, třtinová a řepná melasa, zbytky cukrové třtiny, mouka z manioku představují velkoobjemové zemědělské odpady, které je nutné likvidovat (Banat a kol., 2014; Deleu a Paquot, 2004; Makkar a kol., 2011). Ačkoli tyto odpady obsahující vysoké koncentrace sacharidů nebo škrobu je velké množství, pro produkci biosurfaktantů byla v minulosti nejvíce studována melasa. Melasa obsahuje přibližně 75 % sušiny, ve které vedle sacharidů (48 -56 %) obsahuje 2,5 % bílkovin, 1,5 – 5 % draslíku, přibližně 1 % vápníku, manganu a fosforu. Obsah těchto látek je vhodný pro produkci bioaktivních mnoha mikroorganismy. (Banat a kol., 2014).

V minulosti bylo publikováno několik studií využívajících melasu pro produkci BS, především pro produkci rhamnolipidů bakteriemi rodu *Pseudomonas*. V těchto studiích bylo nejlepších výsledků dosaženo při použití 5 – 7 % (w/v) melasy. Zároveň jsou publikovány studie kombinující roztok melasy (7 % v/v) s kukuřičným výluhem (0,5 % v/v) (Banat a kol., 2014).

### **1.2.2 Odpady obsahující lipidy**

Světová produkce olejů a tuků dosahovala v roce 2000 2,5-3 milionů tun ročně, z čehož 75 % je získáváno z rostlin. Většina olejů a tuků je využívána v potravinářství, kde zároveň vzniká obrovské množství odpadů. Produkce odpadů v tomto množství se stává narůstajícím problémem a z tohoto důvodu roste zájem o zpracování těchto odpadů mikrobiální transformací. V tomto ohledu byly provedeny studie zabývající se využitím odpadních olejů z domácností na produkci biosurfaktantů (Makkar a Cameotra, 2002). Vollbrecht a kol. (1999) použili bakteriální kmen *Tsukamurella* DSM 44370 na produkci glykolipidu s využitím rostlinných olejů jako substrátu. Bylo zjištěno, že tento mikroorganismus produkuje vyšší množství glykolipidu (30 g/l) při růstu na slunečnicovém oleji (110 g/l) než na chemicky definovaném médiu s hydrofobním zdrojem uhlíku.

Abalos a kol. (2001) použili odpad z rafinace sojového oleje pro produkci rhamnolipidů pomocí bakterie *Pseudomonas aeruginosa* AT 10. Ve dvoustupňové kultivaci bylo dosaženo produkce 9,5 g/l rhamnolipidu. (Banat a kol., 2014; Makkar a Cameotra, 2002).

### 1.3 Vedení bioproduktu

Efektivní a ekonomický bioprodukt je klíčovým faktorem biotechnologických výrob. Zvýšení efektivity bioproduktu zahrnuje optimální složení kultivačního média, volbu vhodného produkčního mikroorganismu a vhodné kultivační podmínky. Všechny tyto faktory ovlivňují následné separační procesy, které v případě produkce BS tvoří majoritní podíl ceny finálního produktu (Mukherjee a kol., 2006).

Kultivační podmínky (pH, teplota, dostupnost kyslíku, míchání, množství CO<sub>2</sub> a další) významně ovlivňují produkci BS, zároveň tyto faktory komplexně interagují se složením kultivačního média. Z hlediska složení kultivačního média jsou jako nejdůležitější označovány poměry některých nutričních (C/N, C/P, C/Fe, a C/Mg) (Amezcu-Vega a kol., 2007). Především vhodným poměrem C/N, lze významně ovlivnit produkci BS. V tomto ohledu však není důležitý pouze poměr C/N, ale také typ použitých zdrojů C a N (Mukherjee a kol., 2006).

Pro optimalizaci bioproduktu a tím zvýšení produktivity a snížení produkčních nákladů je nutné zahrnout vliv všech těchto faktorů. V praxi lze využít statistické optimalizace založené na principu response surface methodology. Tato metoda byla v minulosti úspěšně použita na optimalizaci média, množství inokula a také na kultivační podmínky, díky kterým bylo dosaženo zvýšení produktivity BS. Pomocí RSM bylo u produkce surfaktinu bakterií *Bacillus subtilis* dosaženo 72 nárůstu výtěžnosti (Sen, 1997; Sen a Swaminathan, 2004; Sen a Swaminathan, 1997).

### 1.4 Vhodný produkční mikroorganismus

Genetika produkčních organismů je velmi důležitým faktorem ovlivňující produkci biotechnologických produktů, jelikož maximální produkce metabolitu je dána genetickou výbavou organismu. Jelikož i za optimálních kultivačních podmínek, použití levných substrátů a efektivních separačních procesů, není možné dosáhnout ekonomicky výhodného procesu při použití organismů s přirozenou produktivitou, je většina biotechnologických výrob založena na použití hyperproducentů. Průmyslové produkce některých biotechnologických procesů se bez použití rekombinačních nebo hyperproduktivních mutantů neobejdou, jelikož produkce přirozeně vyskytujících producentů je v téměř nulová. Takovéto mutanty mohou být připraveny mnoha metodami zahrnující genetické manipulace (transposony), působení chemických mutagenů (*N*-metyl-*N*'nitro-*N*-nitrosoguanidine), záření (UV, roentgenovo).

Jedním z významných úspěchů je modifikace kmene *Bacillus subtilis* MI 113 s vpraveným plasmidem pC112 nesoucí gen *lpa-14* zodpovědným za produkci surfaktinu. Takto upravený

kmen vykazoval vyšší produkci surfaktinu při kultivaci na pevném substrátu. Následnou náhodnou mutací tohoto kmene pomocí *N*-metyl-*N*'nitro-*N*-nitrosoguanidine, vznikl mutant známý jako *B. subtilis* SD901, který při růstu na sojové mouce nebo jejím extraktu dosahoval produkce 8- 50 g/l surfaktinu. Tento proces byl následně patentován (US patent no 7,011,969). Toto mutagenní činidlo (*N*-metyl-*N*'nitro-*N*-nitrosoguanidine) bylo v minulosti také použito pro zvýšení produkce rhamnolipidů bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Vytvořený mutant byl schopen při růstu na odpadním sojovém oleji z fritování produkovat 10-ti násobné množství BS (12,5 g/l).

### 1.5 Izolace

V současné době je komerční produkce BS velmi nákladná z důvodu vysokých nákladů na separaci a purifikaci produktu. V případě BS mohou náklady na separační procesy dosahovat až 80% celkových nákladů na produkci. Ve většině případů separace BS je nutné nejprve odstranit biomasu, což je samo o sobě velmi nákladným procesem. Následná separace BS závisí na náboji molekuly, rozpustnosti ve vodě, a lokaci (intracelulární, extracelulární nebo vázané na buň. obaly)(Helmy a kol., 2011).

Biosurfaktanty mohou být získávány běžnými technikami jako kyselá precipitace, precipitace  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , extrakce organickými rozpouštědly nebo krystalizace. Zároveň jsou evidovány nekonvenční metody, zahrnující frakcionaci pěny, ultrafiltraci, adsorpci na pevné sorbenty a chromatografii, které využívají charakteru a vlastností BS (povrchovou aktivitu, tvorbu micel a další). (Helmy a kol., 2011).

V současnosti je pro izolaci BS využíváno extrakcí organickými rozpouštědly nebo jejich směsmi (metanol-chloroform, metanol-dichlormetan, butanol, ethylacetát, pentan, hexan, kyselina octová a další). Použití těchto rozpouštědel však přináší značné nevýhody, jelikož pro průmyslovou produkci je nutné použít velké množství těchto relativně drahých rozpouštědel a zároveň jejich toxicita pro životní prostředí a člověka. Proto je nutné nalézt levnější extrakční činidlo, které nebude toxické. Z tohoto hlediska se jako vhodný kandidát pro tuto aplikaci jeví ethylacetát, který je velmi levný a vykazuje výrazně nižší toxicitu než chloroform. Zároveň dle studie Sarubbo a kol. (2007) je pro extrakci soforolipidu použití ethylacetátu vhodnější než směs metanol-chloroform. V této studii byla porovnána výtěžnost soforolipidu směsí metanol-chloroform v různých poměrech (2:1, 1:1, 1:2) s ethylacetátem, kterým bylo dosaženo dvojnásobné výtěžnosti v porovnání s neúčinnější směsí metanol-chloroform. Dále se jako vhodný kandidát pro extrakci BS jeví metyl terciární butyl ether, který je velmi levný a málo toxický.

Avšak pro kontinuální separaci BS je použití organických rozpouštědel nevhodné. Jako velmi levná a zároveň velmi efektivní metoda pro izolaci BS v kontinuálním režimu lze použít adsorpci na aktivní uhlí. Ve studii Dubey a kol. (2005) bylo aktivní uhlí a další pevné sorbenty (silika gel, aktivní hliník, a zeolite) použity pro izolaci rhamnolipidů v kontinuálním režimu. Při aplikaci 1 % (w/v) aktivního uhlí na bezbuněčné roztok rhamnolipidů za optimálních podmínek (90 min, rozsah pH 5-10, 40 °C) bylo dosaženo 99,5 % účinnosti extrakce. Hlavní výhoda aplikace aktivního spočívá v jeho možném opakovatelném použití.

## 2. Závěr

Biosurfaktanty představují environmentálně šetrnou alternativu pro syntetické surfaktanty, avšak v nynější době nejsou konkurence schopné z hlediska vysokých produkčních nákladů. Tyto náklady jsou především způsobeny nízkými výtěžnostmi bioproduktu. Avšak tyto náklady lze snížit několika přístupy, zahrnující využití odpadních substrátů, zvýšení efektivity bioproduktu. Zároveň produkční náklady zahrnují izolační a purifikační procesy, které mohou představovat až 80 % celkových nákladů. Nalezení cenově afektivních postupů a jejich vhodnou kombinací by mohlo být v budoucnu dosaženo konkurence schopnosti biosurfaktantů a mohly by se stát cenově dostupnou alternativou pro chemické surfaktanty.

## 3. Literatura

- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M. R., Casals, M., Garcia, F., & Manresa, A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*, 17(5), 1367-1371. doi: 10.1021/la0011735
- Amezua-Vega, C., Poggi-Varaldo, H. M., Esparza-Garcia, F., Rios-Leal, E., & Rodriguez-Vazquez, R. (2007). Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresource Technology*, 98(1), 237-240. doi: 10.1016/j.biortech.2005.11.025
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., . . . Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 427-444. doi: 10.1007/s00253-010-2589-0
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., & Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi: ARTN 697 10.3389/fmicb.2014.00697
- Deleu, M., & Paquot, M. (2004). From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. *Comptes Rendus Chimie*, 7(6-7), 641-646. doi: 10.1016/j.crci.2004.04.002
- Dubey, K. V., Juwarkar, A. A., & Singh, S. K. (2005). Adsorption-desorption process using wood-based activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnology Progress*, 21(3), 860-867. doi: 10.1021/bp040012e
- Helmy, Q., Kardena, E., Funamizu, N., & Wisjnuaprpto. (2011). Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for its chemically counterparts. *International Journal of Biotechnology*, 12(1-2), 66-86.
- Henkel, M., Müller, M. M., Kügler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process Biochemistry*, 47(8), 1207-1219. doi: 10.1016/j.procbio.2012.04.018

- Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 428-434. doi: 10.1007/s00253-001-0924-1
- Makkar, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *Amb Express*, 1. doi: Artn 5 10.1186/2191-0855-1-5
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 509-515. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.09.005
- Sarubbo, L. A., Farias, C. B. B., & Campos-Takaki, G. M. (2007). Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. *Current Microbiology*, 54(1), 68-73. doi: 10.1007/s00284-006-0412-z
- Sen, R. (1997). Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 68(3), 263-270. doi: Doi 10.1002/(Sici)1097-4660(199703)68:3<263::Aid-Jctb631>3.3.Co;2-#
- Sen, R., & Swaminathan, I. (2004). Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochemical Engineering Journal*, 21(2), 141-148. doi: 10.1016/j.bej.2004.06.006
- Sen, R., & Swaminathan, T. (1997). Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(4), 358-363.
- Vollbrecht, E., Rau, U., & Lang, S. (1999). Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella spec.* *Fett-Lipid*, 101(10), 389-394.

## Mořské aktinomycey jako zdroj biologicky aktivních látek

Z. Ježková, T. Brányik

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### 1. Úvod do mořských Aktinomycet

Moře a oceány se rozkládají na více než 70% povrchu Země. Tyto oblasti slané vody jsou výjimečné na biologickou rozmanitost (Qasim a kol. 1999). Mimo jiné jsou místem života organismů spadajících do kmene aktinobakterie neboli aktinomycey. Jednotlivé druhy Aktinomycet mají velký potenciál využitelný v mnoha odvětvích od farmaceutického a potravinářského průmyslu až po moderní biotechnologie (Jensen a kol. 2005). Aktinomycey byly izolovány z mořského sedimentu. Jedná se o gram pozitivní aerobní bakterie tvořící větvená vlákna (hyfy). V přírodě se účastní odbourávání organických sloučenin. Podílí se například na procesech hydrolýzy chitinu či celulózy, mineralizaci organické hmoty a fixaci dusíku. Také jsou významní producenti sekundárních metabolitů a důležitým zdrojem antibiotik či pigmentů (Abdelmohsen a kol. 2015).

### 2. Biotechnologicky zajímavé druhy mořských aktinomycet a jejich metabolity

Aktinomycey byly zpočátku považovány pouze za jednu z hlavních skupin mikroorganismů půd. Posléze začalo docházet k odběrům sedimentů z hlubin mořského dna a v blízkosti hydrotermálních prúdů. Například v Bengálském zálivu bylo ze sedimentů izolováno celkem 49 kolonií aktinomycet, z nichž nejvíce zastoupeny byly rody *Streptomyces* a *Micromonospora* (Das a kol. 2008). Biotechnologicky zajímavé druhy řazené do těchto rodů jsou uvedeny společně se sekundárními metabolity, které produkují (Tab. 1).

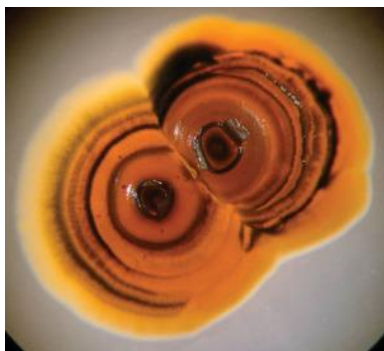
**Tab. 1.:** Vybrané mořské aktinomycet a jejich biologicky aktivní látky (Subramani a kol. 2012, Charan a kol. 2004).

Mikroorganismus	Metabolit	Biologická aktivita
<i>Streptomyces chinaensis</i>	1-hydroxy-1-norresistomycin	antibakteriální, antikarcinogéní
<i>Streptomyces griseus</i>	Frigocyclinone	antibakteriální
<i>Streptomyces sp.</i>	Streptokordin	antitumorický
<i>Micromonospora sp.</i>	Diazepinomicin	antimikrobiální

Velmi zajímavým kmenem mořských aktinomycet, jenž byl v laboratoři poprvé kultivován v roce 1989, a jehož potenciál byl již částečně odkryt, avšak není zcela prozkoumán je rod *Salinispora* (Jensen a kol. 2005).

## 2.1 Rod *Salinispora*

Jedná se o gram pozitivní bakterie vytvářející rozsáhlé větvené hyfy o průměru 0,25 – 0,5 µm. Řadí se dle NCBI do řádu *Actinomycetales*, podřádu *Micromonosporineae* a čeledi *Micromonosporaceae*. Vyskytují se v mořských sedimentech tropických a subtropických oblastech zejména Baham a Karibiku (Jensen a kol. 2015). Prochází dvěma barevnými fázemi. Tvoří okem patrné oranžové kolonie ve vegetativním stádiu a černé spory ve stádiu sporulace. Jsou známi tři druhy a to *Salinispora pacifica* a *S. arenicola* a *S. tropica* (Ng a kol. 2012).



**Obr. 1.:** a) *S. tropica* obrázek převzat z <http://ucsdnews.ucsd.edu/archive/newsrel/science/06-07DiseaseFightingAgentsMA-.asp>, b) *S. tropica* kultivace v Erlenmeyerově baňce v laboratoři optimalizace a modelování bioprocusů VŠCHT Praha.

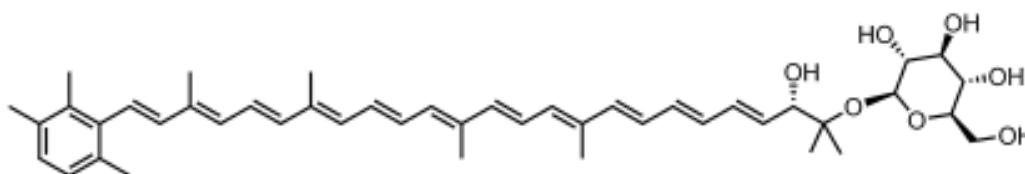
### 2.1.1 Druh *Salinispora tropica* a jeho bioaktivní látky

Jedním ze zástupců rodu *Salinispora* je druh *S. tropica*. V moderní biotechnologii je tento mikroorganismus využitelný převážně díky produkci sekundárních metabolitů, které jsou a mohou být přínosem pro lidské zdraví. V posledních letech je převážně studována v souvislosti s látkou Salinisporamid A, u které byl prokázán protinádorový účinek. Jedná se o přirozeně se vyskytující inhibitor 20S proteozomu a má významný potenciál při léčbě hematologických nádorových onemocnění. Tato látka dostala pracovní název Marizomid® v současné době se nachází ve fázi II. klinického testování na Americkém institutu pro lidské zdraví v rámci léčby mnohočetného myomu (Niewerth a kol. 2014, Jensen a kol. 2015).

Vegetativní stádium kolonií *S. tropica* má typické oranžové zbarvení, tím poukazuje na přítomnost pigmentů, přesněji řečeno karotenoidů. Karotenoidy jsou barevné v lipidech

rozpuštěné sloučeniny tvořené 40 uhlíkovým polyenovým řetězcem. V současné době mají velké využití v kosmetice, potravinářství a farmacii jako přírodní barviva a vitamínové doplňky (Del Campo a kol. 2007). Významná je také jejich antioxidační aktivita a jejich působení proti volným radikálům. Mají využití jako prevence proti kardiovaskulárním onemocněním a mají protizánětlivý účinek. Mezi karotenoidy produkované mořskými organismy patří např. astaxanthin, fucoxanthin,  $\beta$ -karoten, lutein či myxol (Gammone a kol. 2015).

V minulém roce byly publikovány články (Jensen a kol. 2015, Richter a kol. 2015), které definovaly strukturu nově objevené látky v *S. tropica*, jíž je sioxanthin (Obr 1.) Jedná se o terpen, C-40 karotenoid, který má na jednom konci řetězce glykosylovanou vazbu a na druhém konci aryl. Tímto uspořádáním dostává molekula sioxanthinu amfifilní charakter a lze předpokládat, že tato skutečnost ovlivní i její biologický účinek. Amfifilní povaha molekuly je velmi neobvyklá u karotenoidů produkovaných aktinomycetami. Biologická aktivita sioxanthinu je dosud neznámá (Jensen a kol. 2015, Richter a kol. 2015). Tato skutečnost dává prostor pro její studium, když se uváží účinky známých karotenoidů, jako  $\beta$ -karoten (oranžový pigment, prekurzor vitamínu A) nebo astaxanthin (červený pigment, patří do třídy xantofylů, zabraňuje peroxidaci lipidů v biologických membránách, významný antioxidant) (Berendschot a kol. 2000).



**Obr 2.** Sioxanthin (Richter a kol. 2015)

(2'S)-1'-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-3',4'-didehydro-1',2'-dihydro- $\phi,\psi$ -caroten-2'-ol

### 2.1.2 Kultivace *S. tropica*

Kultivace *S. tropica* může probíhat jak na Petriho miskách na pevném médiu, tak v Erlenmeyerových baňkách či bioreaktorech (Infors HT Multifors) v kapalném médiu. Základní médium pro kultivaci *S. tropica* je 2 g/l pepton, 4 g/l kvasničného extrakt, 10 g/l glukosy a 30 g/l mořské soli (Bucarey a kol. 2012). Kultivace v kapalném médiu probíhají při teplotě 28°C.

### 2.1.3 Možnost využití alternativního média

*S. tropica* je mořský organismus, ke svému životu potřebuje mořskou vodu nebo případně slané médium s vyváženým množstvím solí potřebných k růstu. Vzhledem k faktu,



že v České Republice nemáme přímý přístup ke zdroji přírodní mořské vody, je zde určitá možnost využití alternativního média v rámci snížení vstupních nákladů na kultivaci. Jako levný alternativní základ média je možné využít slaný odpadní roztok (SOR) vznikající při procesu demineralizace mléčné syrovátky. Tento roztok produkuje jako odpadní produkt např. mlékárna Moravia Lacto a.s. v Jihlavě. V mlékárně mají značné problémy s tímto roztokem a to převážně z důvodu zvyšování produkce odsolené syrovátky, která posléze vede ke zvyšování nároků na čištění odpadních vod (Diblíková a kol. 2013).

#### **2.1.4 Stanovení celkových karotenoidů (sioxanthinu)**

Biomasa získaná kultivací v Erlenmeyerových baňkách či bioreaktorech v základním i alternativním médiu je využita na testování a izolaci celkových karotenoidů. Celkové karotenoidy z *S. tropica* jsou izolovány extrakční metodou. Jako účinné extrakční činidlo byl po testování vybrán metanol. Karotenoidy jsou citlivé na přítomnost kyslíku a světla, při kterých dochází k jejich degradaci. Je tedy důležité s připraveným extraktem pracovat ve tmě a pod inertní atmosférou dusíku. Pro další testování například biologické aktivity, se na vakuové odparce odpaří rozpouštědlo a získané barvivo se uchová pod inertní atmosférou dusíku. Složení extraktu karotenoidů se charakterizuje pomocí NMR a stabilita extraktu je kontrolována měřením UV-VIS spektra.

#### **2.1.5 Testování biologické aktivity sioxanthinu**

Vyextrahované barvivo bude testováno na biologickou aktivitu, která není dosud známá. Bude se testovat životaschopnost/proliferace buněk a antioxidační aktivita karotenoidů. Analýzy budou prováděny primárně na lidských jaterních buňkách HepG2. Kultivace bude probíhat standardně v DMEM médiu s přidavkem 10% fetálního séra, při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>, v 96-jamkovém formátu. Příslušné testy budou vyhodnocovány pomocí multifunkční fluorescenční čtečky Tecan a průtokového cytometru BD FACSAria III.

### **3. Literatura**

- Abdelmohsen, U. R., Grkovic T., Balasubramanian S., Kamel M. S., Quinn R. J., Hentschel U. (2015) Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances*, 33, 798-811.
- Berendschot T. T., Goldbohm R. A., Klöpping W.A., Van de Kraats J, Van Norel J, Van Norren D. (2000) Influence of lutein supplementation on macular pigment, assessed with two objective techniques. *Investigative Ophthalmology Visual Science* 41, 3322–3326.
- Bucarey A. S, Penn K., Paul L., Fenical W., Jensen R. P. (2012) Genetic complementation of the obligate marine actinobacterium *Salinispora tropica* with the large mechanosensitive channel gene *mscL* rescues cells from osmotic downshock. *Applied and Environmental microbiology* 78, 4175 – 4182.
- Das S., Lyla S.P., Khan A. S. (2008) Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 26, 166 – 177.
- Del Campo J.A., García-González M., Guerrero M.G. (2007) Outdoor cultivation of microalgae for karotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 1163-1174.

- Diblíková L., Čurda L., Kinčl J. (2013) The effect of dry matter and salt addition on cheese whey demineralisation. *International Dairy Journal* 31, 29-33.
- Gammone A. M., Riccioni G., D'Orazio N. (2015) Marine Carotenoids against oxidative stress: effects on human health. *Marine Drugs* 13, 6226 – 6246.
- Charan D. R., Schlingmann G., Janso J., Bernan V., Feng X., Carter T. G. (2004) Diazepinomycin, a New Antimicrobial Alkaloid from a Marine Micromonospora sp. *Journal of Natural Products* 67, 1431 -1433.
- Jensen R. P., Gontang E., Mafnas Ch., Mincer J. T., Fencal W. (2005) Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology* 7, 1039 – 1048.
- Jensen R. P., Moore S. B., Fencal W. (2015) The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. *Natural Product Reports* 32, 738 – 751.
- Niewerth D., Jansen G., Riethoff V. F. L., Meerloo J., Kale J. A., Moore S. B., Assaraf G. Y., Anderl L. J., Zweegman S., Kaspers L. J. G., Cloos J. (2014) Antileukemic activity and mechanism of drug resistance to the marine *Salinispora tropica* proteasome inhibitor Salinosporamide A (Marizomib). *Molecular Pharmacology* 86, 12 -19.
- Ng K. Y., Hewavitharana K. A., Webb R., Shaw N., Fuerst A. J. (2012) Developmental cycle and pharmaceutically relevant compounds of *Salinispora* actinobacteria isolated from Great Barrier Reef marine sponges. *Applied Microbial and Cell Physiology* 97, 3097 -3108.
- Richter S. K. T., Hughes C. Ch., Moor S. B. (2015) Sioxanthin, a novel glycosylated carotenoid, reveals an unusual subclustered biosynthetic pathway. *Environmental Microbiology* 17, 2158–2171.
- Subramani R., Aalbersberg W. (2012) Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research* 167, 571 – 580.
- Qasim S. Z. (1999) *The Indian Ocean: images and realities*. New Delhi: Oxford and IBH, 57 –90.

#### **4. Poděkování**

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20 - SVV/2016)

## Reakce mikroorganismů na přítomnost nanočástic kovů

M. Koukalová, A. Čejková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### Abstrakt

Většina mikroorganismů má schopnost kolonizovat povrchy a vytvářet složité strukturované komunity označované jako biofilmy, kde mají buňky odlišný fenotyp od planktonních buněk. Významnou komplikací, zejména v lékařství, je zvýšená odolnost biofilmových populací vůči antibiotikům. Jednu z možných alternativ ve vývoji nových účinných antibakteriálních látek představují nanočástice kovů, díky svým unikátním vlastnostem, které jsou dány jejich malými rozměry. Na rozdíl od konvenčních antibiotik působí nanočástice na několika místech v metabolismu, proto je nepravděpodobný rozvoj rezistence. V této práci byl sledován vliv nanočástic stříbra a zlata na nárůst bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

### 1. Úvod

Řada patogenních mikroorganismů si vyvinula mechanismus rezistence vůči dnes běžně používaným antimikrobiálním látkám, což v dnešní době působí vážné problémy zejména v medicíně. Většina těchto mikroorganismů má navíc schopnost kolonizovat povrchy a vytvářet strukturované komunity, které jsou známé jako biofilmy. Buňky v biofilmu produkují směs extracelulárních polymerních látek (EPS), které tvoří extracelulární matrix. Matrix je zodpovědná za adhezi buněk k povrchu, stabilizuje trojrozměrnou strukturu biofilmu, ale také se výrazně podílí na zvýšené rezistenci biofilmu vůči okolním vlivům (Markowska a kol., 2013; Silva a kol., 2013). Infekce způsobené biofilmovými populacemi působí vážné komplikace například v lékařství (kolonizace chirurgických implantátů) (Markowska a kol., 2013). Odstranění infikovaného implantátu je poté často jediným možným způsobem léčby z důvodu nedostatečného působení konvenčních antibiotik (Nett a Andes, 2006). Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je jedním z hlavních nosokomiálních patogenů a způsobuje řadu akutních a chronických infekcí. Nejvíce náchylní k infekci touto bakterií jsou pacienti s popáleninami, cystickou fibrosou, chronickou obstrukční plicní nemocí, rakovinou plic nebo syndromem získaného selhání imunity (AIDS) (Dosler a Karaaslan, 2014).

Nanočástice představují jednu z možných alternativ ve vývoji nových účinných antimikrobiálních látek. Díky svým unikátním fyzikálním a chemickým vlastnostem, které jsou dány jejich malými rozměry (1 – 100 nm), mohou nanočástice snadno pronikat buněčnými membránami a interagovat s makromolekulami, což může být pro buňku letální (Blecher a kol., 2011). Nanočástice spojují účinek několika antimikrobiálních látek a proto je rozvoj rezistence velmi nepravděpodobný, protože by bylo potřeba několik současných mutací v jedné buňce. Stříbro je známé pro své antimikrobiální účinky již dlouhou dobu. V minulosti bylo používáno při léčbě ran nebo popálenin. Antimikrobiální účinky stříbra jsou spojeny s uvolněním stříbrných iontů ( $\text{Ag}^+$ ), které interagují s negativně nabitými buněčnými membránami. Primární místa, kde dochází k interakci, jsou molekuly obsahující síru a fosfor. V buňce způsobují poškození DNA a RNA, inhibují replikaci DNA, způsobují denaturaci 30S ribozomální podjednotky, u gram-pozitivních bakterií inhibují syntézu buněčné stěny a v neposlední řadě indukují tvorbu reaktivních forem kyslíku (Allaker a Memarzadeh, 2014; Pelgrift a Friedman, 2013). Zlato samo o sobě je víceméně nereaktivní. Ve formě nanočástic však také vykazuje antimikrobiální účinky, což bylo v několika studiích prokázáno. Antimikrobiální účinky jsou však nižší, než u stříbra (Allaker a Memarzadeh, 2014).

Účinek jednotlivých typů nanočástic je odlišný. Závisí mimo jiné na velikosti a tvaru nanočástic. Obecně platí, že čím menší nanočástice a čím více ploch a hran, tím vyšší je jejich antimikrobiální účinek. Také je účinek závislý na typu rozpouštědla, ve kterém jsou nanočástice suspendovány a v neposlední řadě na druhu mikroorganismu a jeho fyziologickém stavu (Allaker a Memarzadeh, 2014; Seil a Webster, 2012).

V této práci byl sledován vliv nanočástic stříbra a zlata na bakterii *Pseudomonas aeruginosa* jak na suspenzní nárůst, tak na adhezi buněk a tvorbu biofilmu.

## **2. Materiál a metody**

### **2.1. Použitý mikroorganismus a kultivační podmínky**

Pro sledování vlivu nanočástic byla použita gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* DBM 3081, která byla získána ze sbírky Ústavu biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha. Buněčná populace byla uchovávána při teplotě  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  ve formě kryokonzerv (kryoprotektant glycerol). Inokulum bylo připraveno zaočkováním zásobní kultury do sterilního Luria Bertani média (trypton 10 g/l, kvasničný extrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l) a kultivováno 24 hodin ( $150\text{ min}^{-1}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ).

## **2.2. Použité nanočástice**

Stříbrné (AgNP) a zlaté (AuNP) nanočástice byly získány z Ústavu inženýrství pevných látek, VŠCHT Praha a byly připraveny doc. Ing. Petrem Slepíčkou, Ph.D. Oba typy nanočástic měly velikost 20 nm a byly stabilizovány v roztoku polyethylenglykolu a vody.

## **2.3. Sledování vlivu nanočástic na suspenzní populaci**

Suspenzní nárůst byl sledován turbidimetricky pomocí mikrokultivačního zařízení Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd., Finland) v mikrotitračních deskách o 100 jamkách v rozmezí tzv. širokého pásma ( $OD_{\text{wideband}} = 420\text{--}580\text{ nm}$ ). Do každé jamky bylo přidáno 30  $\mu\text{l}$  standartní buněčné suspenze ( $OD_{600} = 0,2$ ), roztok nanočástic a kultivační médium tak, aby výsledný objem byl 300  $\mu\text{l}$ . Rozmezí koncentrací nanočástic bylo pro stříbro 10 mg/l až 50 mg/l a pro zlato 80 mg/l až 180 mg/l. Současně byl sledován nárůst buněčné populace bez přídavku nanočástic. Pro každou koncentraci byly experimenty provedeny v 5 paralelách. Suspenzní nárůst byl sledován po dobu 24 hodin s půlhodinovým intervalem měření při teplotě 37 °C.

## **2.4. Sledování vlivu nanočástic na adhezi buněk a tvorbu biofilmu**

Pro sledování vlivu nanočástic na adhezi buněk byly použity mikrotitrační desky (96 jamek). Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  standartní buněčné suspenze ( $OD_{600} = 0,6$ ), roztok nanočástic a kultivační médium tak, aby výsledný objem byl 250  $\mu\text{l}$ . Rozmezí koncentrací nanočástic bylo stejné, jako u suspenzního nárůstu. Jako kontrola byla sledována adheze buněk bez přídavku nanočástic. Pro každou koncentraci byly experimenty provedeny v 16 paralelách. Deska byla kultivována na třepačce ( $150\text{ min}^{-1}$ ) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

### **2.4.1. Kvantifikace biofilmu analýzou obrazu**

Každá jamka byla po kultivaci třikrát promyta sterilním fosfátovým pufrům (PBS) k odstranění planktonních buněk a automatizovaným inverzním mikroskopem CellaVista (Roche, Švýcarsko/SynenTec, USA) bylo pořízeno ze středu každé jamky 25 fotografií (čtverec 5x5), které byly vyhodnoceny softwarem pro analýzu obrazu. Pro zhotovení fotografií byly nastaveny následující parametry – zvětšení objektivu 20x, intenzita osvětlení 100 %, čas expozice 25 ms, světelnost kamery (gain) 20x.

#### **2.4.2. Stanovení metabolické aktivity buněk v biofilmu**

Po analýze obrazu byla stanovena metabolická aktivita buněk v biofilmu metodou MTT, která je založena na kolorimetrickém stanovení enzymatické přeměny žluté tetrazoliové soli MTT na fialový formazan. Do vybraných jamek (8 paralel) bylo napipetováno 60  $\mu\text{l}$  roztoku glukosy v PBS a 50  $\mu\text{l}$  roztoku MTT v PBS. Destička byla inkubována ve tmě na třepačce ( $150 \text{ min}^{-1}$ ) při teplotě  $37^\circ \text{C}$ . Inkubace probíhala po dobu nezbytně nutnou k vytvoření fialových krystalů formazanu. Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 100  $\mu\text{l}$  vymývacího roztoku pro rozpuštění vzniklých krystalů formazanu a deska byla inkubována 30 minut na třepačce ( $230 \text{ min}^{-1}$ ). Po inkubaci byla proměřena absorbance na přístroji Reader Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd., Švýcarsko) při vlnové délce 570 nm. Jako kontrola byla sledována metabolická aktivita buněk v biofilmu bez přidavku nanočástic. Výsledný vliv nanočástic byl vztažen ke kontrole, která byla brána jako 100 %.

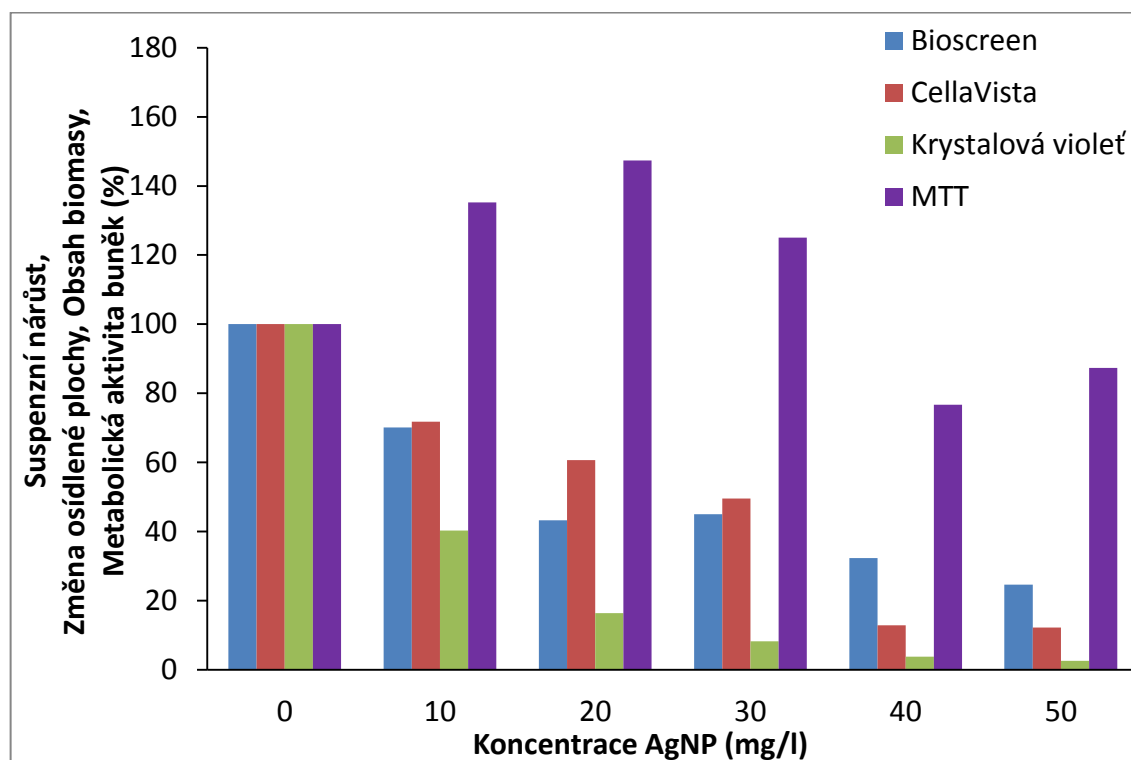
#### **2.4.3. Stanovení celkového množství biomasy v biofilmu**

Do vybraných jamek (8 paralel) bylo napipetováno 250  $\mu\text{l}$  0,1% roztoku krystalové violeti (doba působení 20 minut). Tato nepřímá metoda je založena na schopnosti krystalové violeti nespecificky se vázat na polysacharidy, nukleové kyseliny, proteiny a sacharidy. Dochází tedy k obarvení biofilmu jako celku. Po uplynutí dvaceti minut byly všechny jamky mikrotitrační desky třikrát promyty 300  $\mu\text{l}$  sterilního PBS a do každé jamky bylo napipetováno 200  $\mu\text{l}$  96% roztoku ethanolu (doba působení 10 minut). Absorbance 100  $\mu\text{l}$  tohoto roztoku byla změřena na přístroji Reader Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd., Švýcarsko) při vlnové délce 580 nm. Jako kontrola bylo sledováno celkové množství biomasy v biofilmu bez přidavku nanočástic. Výsledný vliv nanočástic byl vztažen ke kontrole, která byla brána jako 100 %.

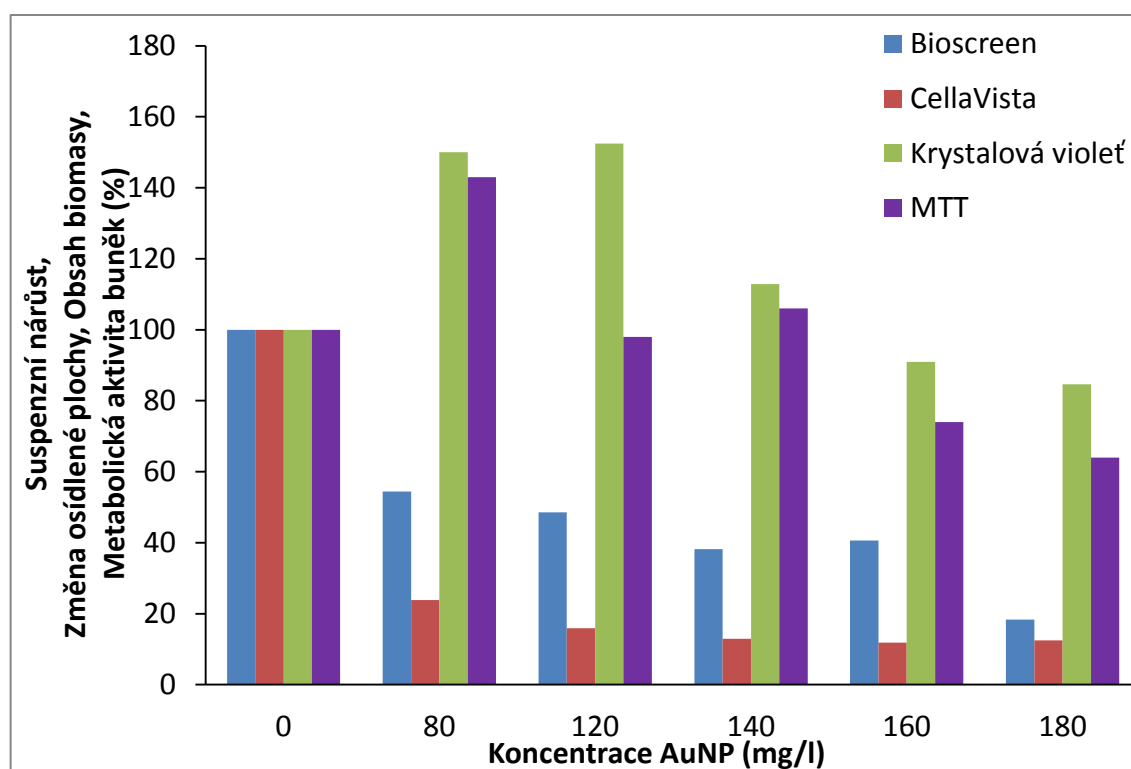
### **3. Výsledky**

Obr. 1 a 2 ilustrují účinky nanočástic stříbra a zlata na modelový mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa*. Hodnoty jsou vyjádřeny v relativních procentech vztažené ke kontrolnímu nárůstu (100 %). U suspenzního nárůstu byl zaznamenán výrazný inhibiční vliv u obou typů nanočástic, ale z obrázků je zřejmé, že pro stejný inhibiční účinek je potřeba vyšší koncentrace AuNP, což potvrzuje jejich nižší antimikrobiální aktivitu (Pelgrift a Friedman, 2013). Z hlediska osídlené plochy v biofilmu byl opět zaznamenán inhibiční vliv u obou typů nanočástic a opět pro srovnatelný inhibiční účinek bylo třeba vyšší koncentrace AuNP. AgNP vykazovaly výrazný inhibiční vliv na celkové množství biomasy v biofilmu, což je

pravděpodobně způsobeno inhibicí produkce EPS. AuNP měly na celkovou biomasu opačný efekt. Do koncentrace 140 mg/l byly zaznamenány vyšší hodnoty ve srovnání s kontrolním nárůstem, při nejvyšší použité koncentraci byl zaznamenán pouze malý pokles celkové biomasy oproti kontrole. Tento jev bude nadále sledován. Ani jeden typ nanočástic neměl výrazný inhibiční vliv na metabolickou aktivitu buněk. Nejnižší zaznamenaná hodnota při použití AgNP byla 77 % při koncentraci 40 mg/l, u AuNP 64 % při nejvyšší použité koncentraci 180 mg/l.



Obr. 1 Vliv různých koncentrací AgNP na nárůst *Pseudomonas aeruginosa*. Výsledky vyjádřeny v relativních procentech vztažených ke kontrole.



Obr. 2 Vliv různých koncentrací AuNP na nárůst *Pseudomonas aeruginosa*. Výsledky vyjádřeny v relativních procentech vztažených ke kontrole.

#### 4. Závěr

Byl prokázán inhibiční vliv stříbrných a zlatých nanočástic na nárůst bakterie *Pseudomonas aeruginosa* na nárůst v suspenzi a v biofilmu z hlediska osídlené plochy. Bylo také prokázáno, že zlaté nanočástice mají nižší antimikrobiální aktivitu v porovnání se stříbrnými nanočásticemi a je potřeba vyšší koncentrace k dosažení srovnatelného inhibičního účinku. Ani jeden typ nanočástic neměl výrazný inhibiční vliv na metabolickou aktivitu buněk. Získané výsledky budou využity pro plánování dalších experimentů, kdy bude sledován vliv nanočástic kovů na mezibuněčnou komunikaci v biofilmu. Také bude sledován vliv dalších typů nanočástic (platina, paladium).

#### 5. Literatura

- Allaker R. P., Memarzadeh K. (2014) Nanoparticles and the control of oral infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43, str. 95 – 104.
- Blecher K., Nasir A., Friedman A. (2011) The growing role of nanotechnology in combating infectious disease. *Virulence*, 2, str. 395 – 401.
- Dosler S., Karaaslan E. (2014) Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*, 62, str. 32 – 37.
- Markowska K., Grudniak A. M., Wolska K. I. (2013) Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochimica Polonica*, 60, str. 523 – 530.



- Nett J., Andes D. (2006) *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*, 9, str. 340 – 345.
- Seil J. T., Webster T. J. (2012) Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. *International Journal of Nanomedicine*, 7, str. 2767 – 2781.
- Silva S., Pires P., Monteiro D. R., Negri M., Gorup L. F., Camargo E. R., Barbosa D. B., Oliveira R., Williams D. W., Henriques M., Azeredo J. (2013) The effect of silver nanoparticles and nystatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic. *Medical Mycology*, 51, str. 178 – 184.
- Pelgrift R. Y., Friedman A. J. (2013) Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, str. 1803 – 1815.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20-SVV/2016)

## Biologické metody využívané k detekci N-acyl-homoserinových laktonů

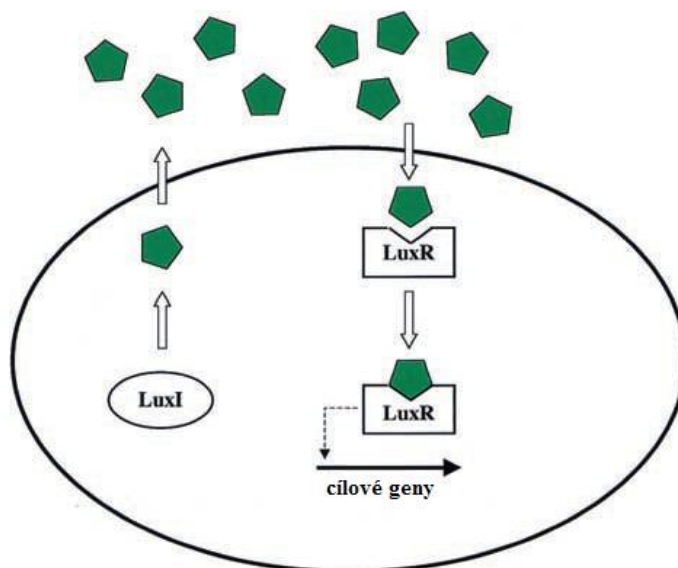
M. Paldrychová, J. Masák

Ústav Biotechnologie, VŠCHT Praha

### 1. Úvod

Velký počet oportunně patogenních gramnegativních bakterií využívá k mezibuněčné komunikaci N-acyl-homoserinové laktony (AHL), „řeč“, která řídí chování celé mikrobiální populace během invaze a kolonizace vyšších organismů (Hentzer a kol., 2002). K produkci AHL dochází v závislosti na populační hustotě buněk, proto se v literatuře setkáváme také s termínem quorum sensing (QS), následná detekce těchto komunikačních molekul buňkami vede ke změně jejich genové exprese (Atkinson a Williams, 2009). Potenciálně patogenní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *Burgholderia capacia*, *Serratia liquefaciens*, *Erwinia carotovora* a *Yersinia enterocolitica* regulují expresi faktorů virulence, jako je např. tvorba biofilmu, produkce antibiotik, pigmentů či enzymů, právě prostřednictvím AHL (Miller a Bassler, 2001).

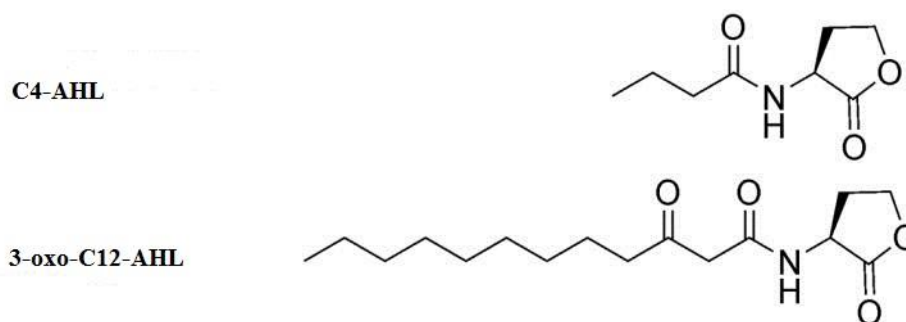
Bioyntéza AHL vyžaduje dva regulační proteiny: N-acylhomoserin lakton syntázu (I protein) a transkripční faktor (R-protein), který svou aktivitou závisí na AHL (Suga a Smith, 2003).



Obr. 1: QS systém LuxI/LuxR gramnegativní bakterie: AHL volně difundují cytoplasmatickou membránou a při vysoké koncentraci aktivují vazbou na promotory cílových genů jejich transkripci (Schauder a Bassler, 2001)

### 1.1 QS systém bakterie *Pseudomonas aeruginosa*

Více než 600 genů *P. aeruginosa* je kontrolováno systémem QS. QS systém této bakterie disponuje dvěma sadami QS proteinů: LasR/I a RhlR/I a vytváří tedy dva AHL: N-(3-oxo-dodekanoyl)homoserin lakton (3-oxo-C12-AHL) a N-butanoylhomoserin lakton (C4-AHL). Obě tyto molekuly aktivují geny, kterými jsou kódovány faktory virulence a další proteiny potřebné pro přežití v lidském hostiteli a pro destrukci hostitelské tkáně během infekčního procesu. Mezi tyto faktory patří např. elastáza, proteáza, dále exotoxin A nebo alkalická fosfatáza (Suga a Smith, 2003).



Obr. 2: Struktura molekul AHL využívaných QS systémem *P. aeruginosa* (Kaufmann a kol., 2008)

*P. aeruginosa* produkuje kromě dvou hlavních signálních molekul, které mají strukturu AHL, také 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolon, neboli *Pseudomonas* chinolon signál (PQS). PQS se podílí např. na biosyntéze a sekreci pyocyaninu a významným způsobem ovlivňuje patogenitu této bakterie během infekcí močových cest. Je nutné podotknout, že všechny tři zmíněné systémy jsou navzájem propojeny (Bala a kol., 2013). Kromě dříve zmíněných faktorů virulence hraje QS zásadní roli při tvorbě biofilmu *P. aeruginosa*, jedné z příčin vzniku antibiotické rezistence. Pokud bychom našli látky, které disponují schopností interference se systémem QS – quorum sensing inhibitory (QSI) a zabránili tak tímto způsobem tvorbě biofilmu, mohli bychom zmírnit onemocnění, jejichž průběh přítomnost této bakterie významným způsobem zhoršuje. Mezi tato onemocnění řadíme především cystickou fibrózu a dále infekce popálenin a dýchacích cest (Suga a Smith, 2003).

## 1.2 Inhibitory systému QS *Pseudomonas aeruginosa*

V zelenině a ovoci je obsažena řada zajímavých látek, které mají potenciál řídit patogenezí bakterií, jelikož u nich byla prokázána interference se systémy QS a to bez ovlivnění životaschopnosti mikroorganismů. Mechanismus anti-patogenní aktivity byl popsán poměrně nedávno, od té doby bylo identifikováno nepřeberné množství QSI, ty mohou být strukturně podobné komunikačním molekulám (v přítomnosti příslušných receptorů se chovají jako antagonisté) nebo urychlují degradaci těchto molekul (Suga a Smith, 2003; Rasmussen a Givskov, 2006).

QS systém bakterie *P. aeruginosa* ovlivňuje např. ajoene, sirá sloučenina obsažená v česneku (Jakobsen a kol., 2012) nebo kyselina salicylová, která tímto mechanismem snižuje produkci faktorů virulence, proteázy IV a elastázy (Bandara a kol., 2006). Monoterpenické látky obsažené v esenciálním oleji *Citrus reticulata* (mandarinka) redukují produkci AHL u *P. aeruginosa* o 33 % a s ní spojenou tvorbu biofilmu (Luciardi a kol., 2016), zatímco furanokumariny obsažené v grapefruitu ovlivňují více tvorbu biofilmu bakterií *E. coli* a *S. typhimurium* ve srovnání s *P. aeruginosa* (Girenavar a kol., 2008).

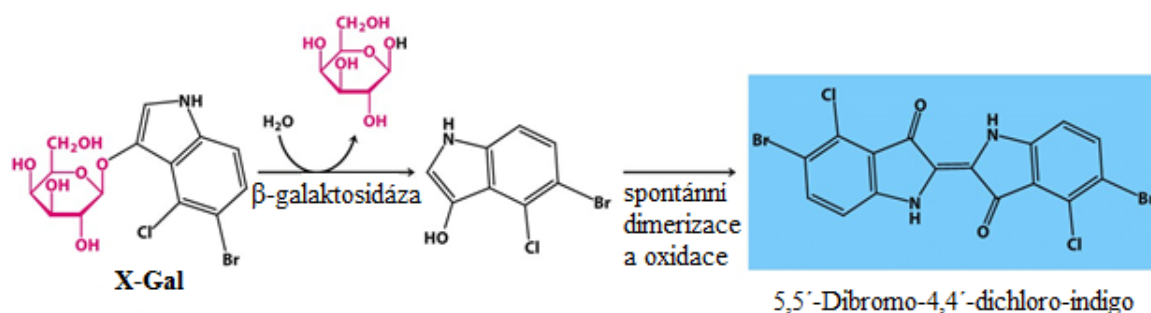
## 1.3 Metody pro sledování mezibuněčné komunikace *P. aeruginosa* a jejich využití pro identifikaci potenciálních QSI

Identifikace QS systémů gramnegativních bakterií prostřednictvím bakteriálních biosenzorů, které jsou schopny detekovat přítomnost AHL je v současné době hojně využívaným přístupem.

Pro detekci AHL s krátkými až středně dlouhými řetězci se nejběžněji využívá produkce violaceinu bakterií *Chromobacterium violaceum*, která je regulována prostřednictvím QS. Biosenzor *C. violaceum* (CV026) neprodukuje žádné vlastní AHL, to je zapříčiněno dvěma transposony vloženými do tohoto biosenzoru. Je-li, ale vystaven přítomnosti exogenních AHL produkuje fialový pigment. Pro detekci C10 - C12 AHL a jejich 3-oxo-derivátů je využíváno bakterie *E. coli*, která vlastní AHL neprodukuje. Je-li do ní vložen plasmid z bakterie *P. aeruginosa*, která produkuje a reaguje na C12-3-oxo-AHL, dochází při vystavení biosenzoru AHL k luminiscenci (Steindler a Venturi, 2007).

Biosenzor *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) NT1 (pZLR4), který je využíván pro detekci širokého spektra AHL, se skládá z kmene připraveného o Ti plasmid, který zodpovídá za produkci vlastních AHL a vloženého plasmidu pZLR4. V přítomnosti AHL dochází k expresi intracelulárního enzymu  $\beta$ -galaktosidázy. Množství vytvořeného

enzymu je závislé na množství AHL přítomných ve vzorku a může být detekováno prostřednictvím X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid). Tento substrát je bezbarvý, ale jeho štěpením vzniká modrý produkt (Obr. 3). Změnu tohoto zbarvení je možné měřit spektrofotometricky (Singh a Greenstein, 2006).



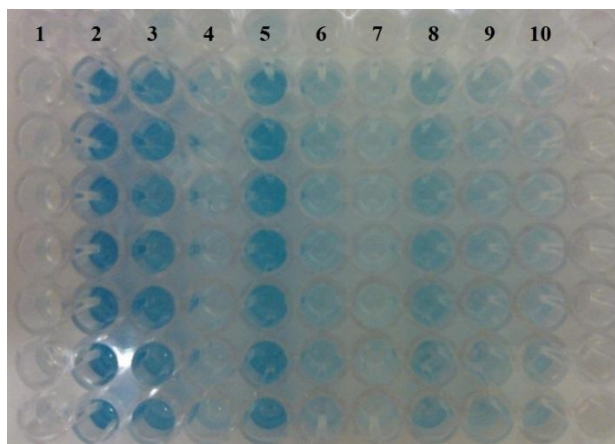
Obr. 3: Mechanismus přeměny X-Gal na modrý produkt (Berg a kol., 2002)

Konkrétní laboratorní postup může vypadat následovně (upraveno dle Singh a Greenstein 2006): Nejprve je biosenzor kultivován v minimálním médiu s obsahem gentamicinu. Po 24 hodinové kultivaci je upravena optická denzita inokula a dále probíhá jeho kultivace v mikrotitrační destičce v přítomnosti vzorků, pocházejících z kultivace biofilmu

*P. aeruginosa*, který je již ovlivněn přírodní látkou, jejíž efekt na QS sledujeme. Po dobu 16 – 18 dochází v závislosti na množství přítomných AHL ve vzorku k vytváření beta-galaktosidázy. Poté jsou buňky lyzovány přidávkem lyzačního pufru, za účelem uvolnění enzymu, který štěpí přidanou X-Gal na modrý produkt. Lyzační pufr obsahuje azid sodný a kationtový tenzid cetyl trimethylammonium bromid (CTAB), který je vhodný k izolaci makromolekul nacházejících se uvnitř buňky. Složení lyzačního pufru musí být optimalizováno, tak aby docházelo k lyzi buněk, ale zároveň nedocházelo k poškození enzymu. Na Obr. 4 je vidět aplikace lyzačního pufru o nevhodném složení (sloupce 1, 4, 7, 9 a 10).

Aktivita  $\beta$ -galaktosidázy je ke sledování genové exprese v molekulární biologii využívána velice často. Nejčastěji používaným chromogenním substrátem pro monitorování této aktivity je *o*-nitro-fenyl- $\beta$ -D-galaktosid (ONPG). Množství ONP vytvořeného z ONPG závisí na aktivitě enzymu, která se vyjadřuje v Millerových jednotkách. Pro vstup ONPG do buněk je ovšem vyžadována permeabilizace k níž se standardně využívá toluen nebo chloroform v kombinaci s SDS, z tohoto důvodu není pro testování možné využití klasických

plastových mikrotitračních destiček, které umožňují analýzu řady vzorků najednou (Griffith a Wolf, 2002).



Obr. 4: Působení lyzačních pufrů o různých koncentracích jednotlivých složek

## 2. Závěr

AHL molekuly hrají významnou roli během nástupu virulence *P. aeruginosa in vitro* a stejně tak *in vivo*. Tato skutečnost poukazuje na to, že je důležité vyvíjet metody pro detekci těchto molekul. Díky těmto metodám je nám totiž umožněno nejen monitorovat průběh onemocnění spojených s výskytem tohoto mikroorganismu, ale zároveň také identifikace potenciálních inhibitorů QS pocházejících nejen z přírodních zdrojů. V této souvislosti byly již popsány biologické metody využívající ke stanovení AHL biosenzorů, ale také přesnější analytické metody, které nám umožní komunikační molekuly ve vzorcích přesněji kvantifikovat.

## 3. Literatura

- Atkinson, S. and P. Williams (2009). "Quorum sensing and social networking in the microbial world." *Journal of the Royal Society Interface*: rsif20090203.
- Bala, A., R. K. Gupta, S. Chhibber and K. Harjai (2013). "Detection and quantification of quinolone signalling molecule: A third quorum sensing molecule of *Pseudomonas aeruginosa* by high performance-thin layer chromatography." *Journal of Chromatography B* 930: 30-35.
- Bandara, M. B., H. Zhu, P. R. Sankaridurg and M. D. Willcox (2006). "Salicylic acid reduces the production of several potential virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with microbial keratitis." *Investigative ophthalmology & visual science* 47(10): 4453-4460.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2002). *Biochemistry*. 5th, New York: WH Freeman.
- Girenavar, B., M. L. Cepeda, K. A. Soni, A. Vikram, P. Jesudhasan, G. Jayaprakasha, S. D. Pillai and B. S. Patil (2008). "Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria." *International journal of food microbiology* 125(2): 204-208.
- Griffith, K. L. and R. E. Wolf (2002). "Measuring  $\beta$ -galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays." *Biochemical and biophysical research communications* 290(1): 397-402.
- Hentzer, M., M. Givskov and M. R. Parsek (2002). "Targeting quorum sensing for treatment of chronic bacterial biofilm infections." *Laboratory Medicine* 33(4): 295-306.

- Jakobsen, T. H., M. van Gennip, R. K. Phipps, M. S. Shanmugham, L. D. Christensen, M. Alhede, M. E. Skindersoe, T. B. Rasmussen, K. Friedrich and F. Uthe (2012). "Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56(5): 2314-2325.
- Kaufmann, G. F., J. Park, J. M. Mee, R. J. Ulevitch and K. D. Janda (2008). "The quorum quenching antibody RS2-1G9 protects macrophages from the cytotoxic effects of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signalling molecule N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone." *Molecular immunology* 45(9): 2710-2714.
- Luciardi, M. C., M. A. Blázquez, E. Cartagena, A. Bardón and M. E. Arena (2016). "Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*." *LWT-Food Science and Technology* 68: 373-380.
- Miller, M. B. and B. L. Bassler (2001). "Quorum sensing in bacteria." *Annual Reviews in Microbiology* 55(1): 165-199.
- Rasmussen, T. B. and M. Givskov (2006). "Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs." *International Journal of Medical Microbiology* 296(2-3): 149-161.
- Schauder, S. and B. L. Bassler (2001). "The languages of bacteria." *Genes & Development* 15(12): 1468-1480.
- Singh, M. P. and M. Greenstein (2006). "A simple, rapid, sensitive method detecting homoserine lactone (HSL)-related compounds in microbial extracts." *Journal of microbiological methods* 65(1): 32-37.
- Steindler, L. and V. Venturi (2007). "Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors." *FEMS Microbiol Lett* 266(1): 1-9.
- Suga, H. and K. M. Smith (2003). "Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target." *Current Opinion in Chemical Biology* 7(5): 586-591.

## Vliv zdroje dusíku na tvorbu pigmentů houbou *Monascus purpureus*

M. Patrovský, B. Branská, P. Patáková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### Abstrakt

Houba *Monascus purpureus* produkuje sekundární metabolity, mezi které patří červené, oranžové a žluté pigmenty. Žluté pigmenty tvoří především monascin a ankaflavin a lze je považovat za biologicky aktivní látky. Naše práce byla zaměřena na produkci žlutých pigmentů sbírkovým CBS 109.07 a izolovaným, průmyslově využívaným kmenem *Monascus purpureus* v submerzní kultivaci. Bylo testováno šest zdrojů dusíku (pepton, dusičnan sodný, kvasničný extrakt, glutaman sodný, síran amonný, močovina) s počátečním pH média 5,5. Výsledky byly získány pomocí analytických metod spektrofotometrie a HPLC. Nejvyšší koncentrace žlutých pigmentů 23,22 g/l byla získána sbírkovým kmenem při použití síranu amonného. Mykotoxin citrinin nebyl v etanolových extraktech detekován. Výsledky ukazují, že vhodně zvoleným zdrojem dusíku a nastavením určitých kultivačních podmínek lze produkovat převážně žluté pigmenty vybraným druhem *Monascus purpureus*.

### 1. Úvod

Vláknitá houba *Monascus purpureus* je používána již po staletí pro výrobu tradičních pokrmů a své uplatnění nalézá i fermentačních procesech. Nejznámějším produktem houby je červená fermentovaná rýže, která se používá především v Jihovýchodní Asii jako potravinářské barvivo či jako ochucující složka potravin (Patáková, 2013). Houba tvoří biologicky aktivní látky, mezi něž lze zařadit pigmenty; červené, oranžové a žluté. Žluté pigmenty tvoří monascin a ankaflavin a mohly by vykazovat jisté účinky v léčbě rakoviny, obezity, zánětům či cukrovky (Feng a kol., 2012). Houba produkuje také nežádoucí mykotoxin citrinin (Lin a kol., 2008).

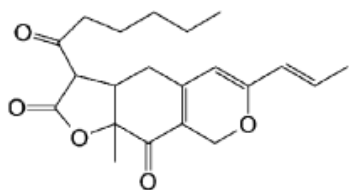
Výzkum byl zaměřen na produkci žlutých pigmentů v submerzní kultivaci dvěma kmeny *Monascus purpureus*, sbírkovým a izolovaným, průmyslově využívaným kmenem. Bylo testováno šest zdrojů dusíku (pepton, dusičnan sodný, kvasničný extrakt, glutamát sodný, síran amonný, močovina) a jejich vliv na tvorbu monascinu a ankaflavinu. Po kultivaci houby



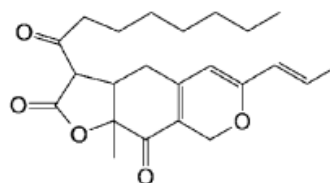
se mycelium extrahovalo etanolem a extrakty byly podrobeny spektrofotometrickému a HPLC měření. Byla také sledována tvorba nežádoucího mykotoxinu citrininu.

Pro stanovení pigmentů a mykotoxinu byla zavedena vhodná analytická metoda pomocí HPLC a zhodnocen vliv dusíku na tvorbu žlutých pigmentů.

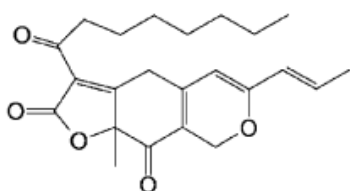
Následující obrázky (1. - 5.) znázorňují strukturální vzorce stanovených látek: žluté (monascin, ankaflavin), oranžové (monaskorubrin, rubropunktatin) pigmenty a mykotoxin citrinin.



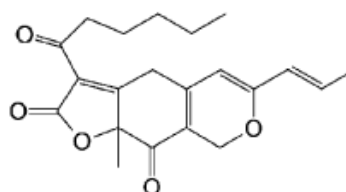
Obr. 1. Monascin



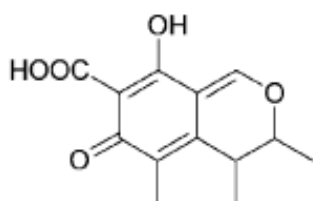
Obr. 2. Ankaflavin



Obr. 3. Monaskorubrin



Obr. 4. Rubropunktatin



Obr. 5. Citrinin

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Mikroorganismus

V rámci experimentální práce byly použity dva kmeny houby *Monascus purpureus*: Sbírkový kmen CBS 109.07 a průmyslový kmen izolovaný ze vzorku nesterilní červené fermentované rýže. Houby byly uchovávány na Sabouraudově agaru (Roth) ve zkumavkách se šikmým agarem při teplotě 7 °C.

### 2.2. Kultivační média

Složení pre-kultivačního média: glukosa 20 g, pepton 10 g, kvasničný extrakt 3 g, KCl 0,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01 g a  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01 g v 1 l destilované vody. Složení kultivačního média: glukosa 40 g, jeden ze zkoumaných zdrojů dusíku - pepton 8,84 g/dusičnan sodný 6,44 g/kvasničný extrakt 10,6 g/glutaman sodný 14,17 g/síran amonný 5 g nebo močovina 2,27 g, KCl 0,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g a  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,01 g v 1 l destilované vody. Hodnota pH kultivačních médií byla upravena na 5,5 použitím 1M HCl nebo 1M NaOH. V každém kultivačním médiu byl stejný obsah dusíku: 1,06 g/l.

### **2.3. Kultivace**

Pro pre-kultivaci, ze šikmého agaru byly sterilní vodou smyty spory mycelia houby a následná suspenze převedena do pre-kultivačního média o objemu 50 ml ve 250 ml Erlenmeyerově baňce. Oba dva kmeny byly pre-kultivovány při 30 °C, na třepačce (180 rpm) po dobu 30 h. (New-Brunswick-Scientific).

Po pre-kultivaci bylo 5 ml pre-kultivačního média převedeno do kultivačního o objemu 50 ml v 250 ml Erlenmeyerově baňce. Produkční kultivace probíhala pro sbírkový kmen 109.07 při 30 °C, na třepačce (180 rpm) po dobu 7 dní. Kultivace pro průmyslový izolát probíhala při 30 °C, na třepačce (100 rpm) po dobu 14ti dní.

### **2.4. Filtrace**

K oddělení fermentovaného tekutého média a vzrostlého houbového mycelia byla kultivační média byla přefiltrována přes filtrační papír Whatman č.1.

### **2.5. Extrakce**

K získání intracelulárních pigmentů bylo mycelium houby extrahováno ve 20 ml 70% etanolu o pH2 po dobu 1 hod., na třepačce při 100 rpm.

### **2.6. Analytické metody**

#### **2.6.1. Spektroskopie**

K získání orientační znalosti o přítomnosti a množství pigmentů byly jednotlivé filtráty (fermentovaná média) a etanolové extrakty proměřeny na spektrofotometru (Varian Cary 50 UV/Vis) pro získání absorpčních spekter v rozmezí vlnových délek od 350 nm do 550 nm.

#### **2.6.2. Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)**

Pro stanovení pigmentů a mykotoxinu byla použita metoda HPLC. Žluté a oranžové pigmenty byly stanoveny na HPLC Agilent 1100 s fotodiodovým detektorem při vlnových

délkách 390 nm pro žluté a při 470 nm pro červené pigmenty (Obrázek 7., Obrázek 8.). Mykotoxin citrinin byl stanoven na HPLC Waters Alliance 2695 s fluorescenčním detektorem s emisní vlnovou délkou 331 nm a excitační vlnovou délkou 500 nm (Obrázek 9.). Pro stanovení pigmentů a citrininu byla použita kolona Watrex SN7632, 250x4 mm, Reprosil 100 C<sub>18</sub> 5 μm. Mobilní fáze byla složena z 360 ml demi vody a 640 ml acetonitrilu + 0,5 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> na 1 litr. Průtok byl nastaven na 1ml/min.

### 3. Výsledky a diskuse

V rámci provedených pokusů, sledující vliv šesti zdrojů dusíku na produkci vybraných sekundárních metabolitů produkovaných dvěma kmeny houby *Monascus purpureus*, byly zjištěny zřetelné rozdíly jak v množství vytvořených pigmentů, tak v zastoupení jednotlivých zástupců pigmentů. Kang a kol. (2014) a Shi a kol. (2015) uvádějí, že vliv zdroje dusíku výrazně ovlivňuje složení pigmentů houby. Ze spektrofotometrického měření vyplývá, že v případě použití síranu amonného došlo ke dvojnásobně vyšší produkci žlutých pigmentů než oranžových a o 25 % vyšší produkci žlutých pigmentů než červených. Za použití peptonu jako zdroje dusíku došlo ke snížení produkce o 50 % jak červených, tak oranžových pigmentů (Shi a kol., 2015).

System HPLC umožnil rychlé a účinné stanovení jak pigmentů, tak mykotoxinu (Tabulka 1., Tabulka 2.) Všechny čtyři námi sledované pigmenty byly stanoveny v rámci jedné analýzy s izokratickou elucí do 15 min. Mykotoxin citrinin byl stanoven pomocí citlivějšího fluorescenčního detektoru za použití stejné kolony i mobilní fáze. Wu a kol. (2011) již úspěšně provedl stanovení pigmentů a citrininu pomocí HPLC, kdy byla využita kombinace fotodiodové a fluorescenčního detektoru za použití kolony LUNA C<sub>18</sub> s izokratickou elucí a mobilní fází složenou z demi voda:acetonitril (37,5:62,5) + 0,05 TFA. Průtok byl nastaven na 1 ml/min (Wu a kol., 2011).

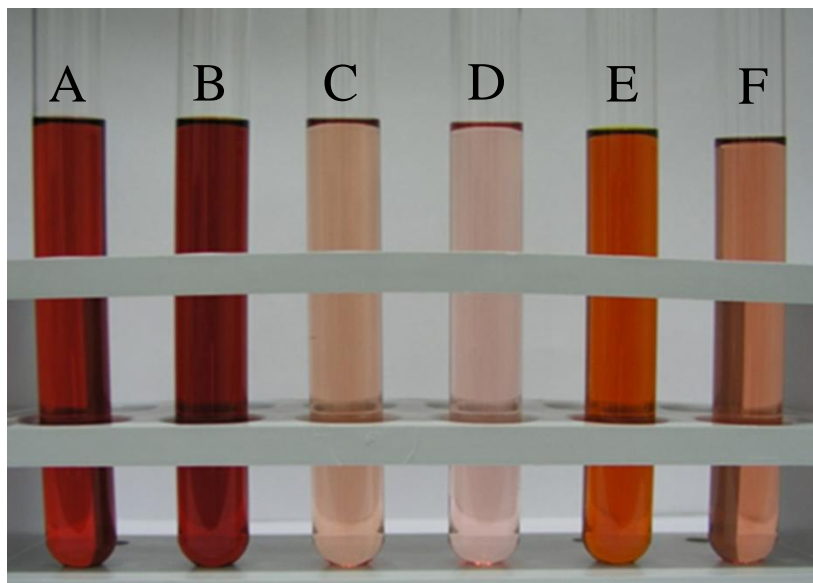
Námi stanovované žluté ani oranžové pigmenty nebyly stanoveny ve filtrátu (fermentované médium) u obou dvou kmenů, přestože médium bylo viditelně zbarvené. Mykotoxin citrinin však byl nalezen ve filtrátech kultivačního média obou kmenů.

Zheng a kol. (2009) uvádí, že mykotoxin citrinin je produkován ve stopovém množství (0,1 - 500 mg/l), zatímco pigmenty jsou tvořeny v řádově vyšších koncentracích (10 - 100 g/l), což potvrzují i naše výsledky.

Etanolové extrakty získané z kultivace sbírkového kmene vykázaly nejvyšší produkci jak žlutých (23,2 g/l), tak oranžových pigmentů (174 mg/l) za použití síranu amonného jako zdroje dusíku. Zatímco v přítomnosti glutamanu sodného jako zdroje dusíku nedošlo k žádné

produkcí námi sledovaných pigmentů. Mykotoxin citrinin nebyl detekován v žádném etanolovém extraktu.

Etanolové extrakty získané z kultivace průmyslového izolovaného kmene (Obrázek 6.) ukázaly nejvyšší výtěžnost jak žlutých (13,34 g/l), tak oranžových pigmentů (1,67 g/l) v případě použití dusičnanu sodného jako zdroje dusíku. Mykotoxin citrinin byl přítomen ve všech etanolových extraktech, ale jeho nejnižší koncentrace (1,95 mg/l) byla nalezena v případě použití síranu amonného jako zdroje dusíku.



Obrázek 6. Etanolové extrakty z narostlého mycelia houby *Monascus purpureus* získané z kultivací lišících se použitým zdrojem dusíku (A-pepton, B-dusičnan sodný, C-kvasničný extrakt, D-glutaman sodný, E-síran amonný, F-močovina)

Tabulka 1.

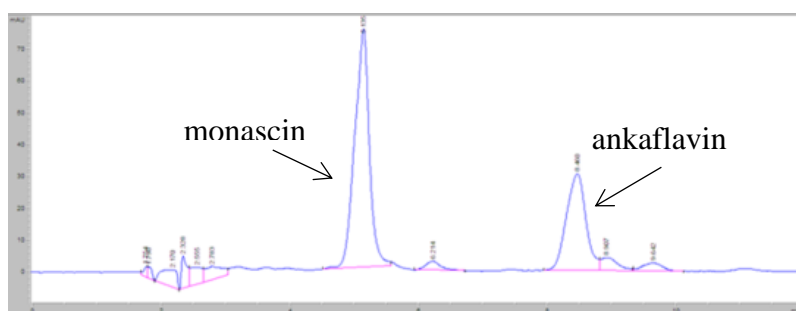
Stanovení pigmentů a citrininu produkovaných *M. purpureus* - sbírkový kmen 109.07; (mg/l)

zdroj dusíku (1,06 g/l)	<i>Monascus purpureus</i> - sbírkový kmen 109.07					
	extrakt					filtrát
	žluté pigmenty		oranžové pigmenty		mykotoxin	mykotoxin
	monascin	ankaflavin	rubropunctatin	monaskorubrin	citrinin	citrinin
pepton	243,93 ± 78,31	1217,63 ± 174,30	/	/	/	1,31 ± 0,88
dusičnan sodný	1843,32 ± 257,90	10222,72 ± 1308,66	/	/	/	1,73 ± 0,51
kvasničný extrakt	83,92 ± 14,01	485,53 ± 61,67	/	/	/	6,40 ± 2,93
glutaman sodný	/	/	/	/	/	1,34 ± 0,09
síran amonný	5841,68 ± 22,47	17374,78 ± 10,72	31,22 ± 1,36	142,74 ± 11,24	/	1,39
močovina	164,65 ± 42,54	657,16 ± 109,94	/	/	/	0,83 ± 1,93

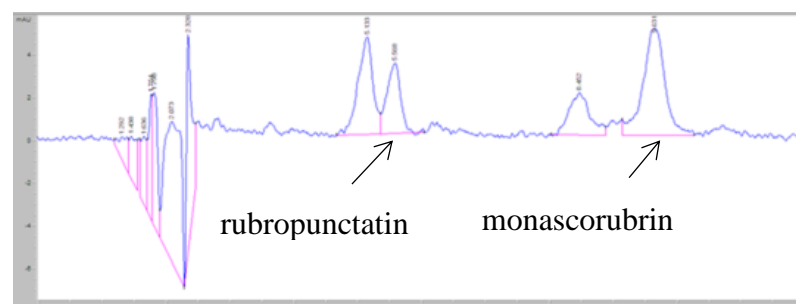
Tabulka 2.

Stanovení pigmentů a citrininu produkovaných *M. purpureus* - průmyslový izolát; (mg/l)

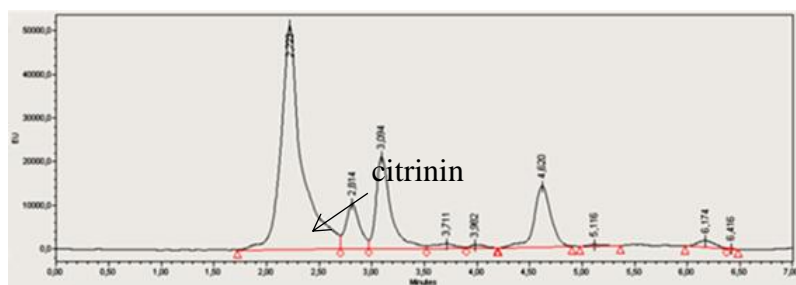
zdroj dusíku (1,06 g/l)	<i>Monascus purpureus</i> - izolát					
	extrakt					filtrát
	žluté pigmenty		oranžové pigmenty		mykotoxin	mykotoxin
	monascin	ankaflavin	rubropunctatin	monaskorubrin	citrinin	citrinin
pepton	2107,27 ± 193,12	5409,10 ± 227,94	251,57 ± 15,02	336,65 ± 24,86	6,92 ± 3,82	41,64 ± 17,05
dusičnan sodný	2623,32 ± 10,63	10712,13 ± 390,18	640,23 ± 33,61	1025,47 ± 222,15	9,00 ± 2,00	9,85 ± 4,21
kvasničný extrakt	961,56 ± 25,86	2136,11 ± 44,24	104,36 ± 9,07	147,38 ± 0,78	29,08 ± 4,51	45,83 ± 4,54
glutaman sodný	1151,55 ± 348,78	5517,71 ± 2192,27	21,29	83,07	57,05 ± 17,45	97,92 ± 11,47
síran amonný	1724,64 ± 42,54	3388,45 ± 891,65	354,02 ± 82,35	482,12 ± 90,92	1,95 ± 0,04	3,38 ± 0,44
močovina	1276,99 ± 171,61	5788,56 ± 947,97	31,45 ± 9,95	94,31 ± 8,46	3,44 ± 3,35	47,41 ± 19,06



Obrázek 7. Detekce žlutých pigmentů při 390 nm



Obrázek 8. Detekce oranžových pigmentů při 470 nm



Obrázek 9. Detekce citrininu

#### 4. Závěr

Byla zavedena vhodná analytická metoda pro stanovení vybraných sekundárních metabolitů (monascin, ankaflavin, rubropunktatin, monaskorubrin, citrinin) produkovaných houbou *Monascus purpureus* pomocí HPLC. Citrinin byl uvolňován oběma dvěma kmeny do média. Pro sbírkový kmen byl pro produkci pigmentů vyhodnocen jako nejvhodnější zdroj dusíku síran amonný. Přítomnost citrininu v extraktu nebyla zaznamenána. Pro průmyslový kmen vykázal nejvyšší koncentraci dusičnan sodný pro žluté i oranžové pigmenty, zatímco citrinin byl nalezen v nejnižší koncentraci za použití síranu amonného.

#### 5. Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. SVV/2016).

#### 6. Literatura

Patakova P. (2013) *Monascus* secondary metabolites: Production and biological activity, Journal of Industrial Biotechnology 40, 169-181.

- Feng Y., Shao Y., Chen F. (2012) *Monascus* pigments, Applied Microbiology and Biotechnology 96, 1421-1440.
- Lin, Y. L., Wang T. H., Lee M. H., Su N. W. (2008) Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review, Applied Microbiology and Biotechnology 77, 965-973.
- Shi K., Song D., Chen G., Pistozzi M., Wu Z., Quan L. (2015) Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation, Journal of Bioscience and Bioengineering 120, 145-154. (2015).
- Kang B., Zhang X., Wu Z., Wang Z., Park Z. (2014) Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH, Enzyme and Microbial Technology 55, 50-57.
- Wu C. L., Kuo Y. H., Lee C. L., Hsu Y. W., Pan T. M. (2011) Synchronous high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector and mass spectrometry for the determination of citrinin, monascin, ankaflavin, and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice, Journal of the Association of Official Agricultural Chemists 94, 179-190.
- Zheng Y., Xin Y., Guo Y. (2009) Study on the fingerprint profile of *Monascus* products with HPLC-FD, PAD and MS, Food Chemistry 113, 705-711.

## **Intenzita gushingu v závislosti na tlaku**

<sup>1</sup>D.Bandy, <sup>1,2</sup>M. Poštulková, <sup>1</sup>K.Zítková, <sup>2</sup>M. Růžička, <sup>1</sup>T. Brányik

1 Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

2 Ústav chemických procesů AV ČR

### **Abstrakt**

Gushing (přepěňování) je spontánní a intenzivní únik pěny z láhve či plechovky. Obecně se gushing dělí na dva typy. Primární gushing souvisí s plísňovou kontaminací ječmene, přesněji řečeno s hydrofobiny, což jsou malé hydrofobní proteiny produkované plísněmi. Hydrofobiny, společně s nezbytnou podmínkou vzniku gushingu – oxidem uhličitým – jsou zodpovědné za primární přepěňování. Sekundární gushing je způsoben jinými prekurzory - například ionty kovů, krystaly šťavelanu vápenatého nebo chmelovými iso-extrakty.

Cílem této práce bylo zjištění vlivu tlaku oxidu uhličitého na intenzitu gushingu. Jako zástupce měření primárního gushingu byl připraven extrakt hydrofobinů HFBII a pro měření sekundárního gushingu byl použit roztok hovězího sérového albuminu (BSA) v koncentraci 0,5g/L. Experimenty byly provedeny pomocí prototypu desaturační cely na měření přepěňování sycených nápojů, která je schopná přesně simulovat chování láhve po jejím otevření za požadovaných podmínek.

V případě měření s BSA bylo zjištěno, že dochází ke zvýšení intenzity gushingu do tlaku o hodnotě přibližně 5 bar, poté dochází k jejímu poklesu. Při experimentech s extraktem hydrofobinů HFBII výsledky potvrzují, že s rostoucím tlakem se zvyšuje intenzita přepěňování, ale na rozdíl od měření s BSA nebylo zjištěno maximum. Tento rozdíl může být důkazem rozdílných mechanismů primárního a sekundárního gushingu.

## **Urychlení scezování sladiny pomocí polyfenolových extraktů**

V. Hanko, L. Jelínek, M. Karabín

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### **Abstrakt**

Vzhledem k tomu, že scezování je jedním z nejdelších kroků teplého úseku výroby piva, je snaha o jeho zkrácení, které může vést ke snížení časových prodlev mezi jednotlivými várkami a tím i k finančním úsporám. V minulosti bylo zjištěno, že dobu scezování sladiny lze zkrátit například přidávkem gallotaninu izolovaného z čínského ořechu během rmutování.

Odhořčené chmelové materiály obsahují vysoké množství aktivních polyfenolových látek, a proto lze předpokládat, že chmelové zbytky mají potenciál nahradit kontroverzní gallotanin, jehož účinek byl v této práci také testován. K těmto účelům byl do varní vody přidáván gallotanin a laboratorně připravený taninový extrakt připravený z mechanicky odhořčeného Žateckého poloraného červeňáku (zbytek po výrobě pelet T45). Bylo zjištěno, že taninový extrakt i gallotanin mohou zrychlit scezování o 20 – 25 rel.%, přičemž taninový extrakt chmele dosahovat těchto výsledků již při dávce 0,5 ml/l (zhruba poloviční dávka v porovnání s gallotanimem). Oba dva preparáty musí navíc být čerstvé, jelikož, jak bylo v této práci prokázáno, jejich oxidací dochází k rapidnímu snížení účinnosti.

V další části práce byl přidávky látek vykazujících různé aktivity (antioxidační a zákalotvornou) poodhalen mechanismus působení gallotaninů a taninového preparátu chmele v problematice rychlosti scezování, kdy antioxidační aktivita měla oproti zákalotvorné aktivitě na tento děj významnější vliv. Bylo také zjištěno, že významnou roli hrají další, dosud neznámé vlivy, které se zatím nepodařilo určit. Pravděpodobně se jedná zejména o profil fenolových látek a stupeň jejich polymerace.



## Možnosti potlačování primárního přepěňování

K. Zítková<sup>1</sup>, M. Poštulková<sup>1,2</sup>, M. Růžička,<sup>2</sup> T. Brányik<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

<sup>2</sup> Ústav chemických procesů AV ČR

### Abstrakt

Přepěňování neboli gushing je spontánní nežádoucí jev, jež se může vyskytovat v pivu. V případě rychlého poklesu tlaku v láhvi obsahující pivo s tendencí k přepěňování, tj. po jejím otevření, dochází k velmi rychlému úniku pěny z láhve. V některých případech dochází ke ztrátě velkého množství nápoje, protože pěna s sebou strhává i značnou část kapaliny.

Jednou z hlavních příčin přepěňování je přítomnost amfifilních proteinů – hydrofobinů, jež jsou syntetizovány plísněmi kontaminujícími ječmen nebo slad určený pro výrobu piva. Hydrofobiny jsou schopny během kvašení piva stabilizovat nově vznikající bublinky oxidu uhličitého a brání tak v jejich rozpouštění v kapalině. Takto stabilizované bublinky CO<sub>2</sub> jsou původci primárního přepěňování piva.

Jednou z možností jak potlačit primární přepěňování je přidavek chmelových silic. V tomto konkrétním případě se jednalo o myrcen nebo ocimen, které reagují s hydrofobiny prostřednictvím hydrofobních interakcí a ty dále nemohou interagovat s bublinkami CO<sub>2</sub> a stabilizovat je. Jejich schopnost potlačovat přepěňování byla vyhodnocena modifikovaným Carlsberg testem (MCT), kdy je tendence k přepěňování vyhodnocena na základě váhového úbytku vypěněného množství tekutiny. Tímto testem bylo potvrzeno, že přísady těchto chmelových silic byly schopny potlačit přepěňování způsobené hydrofobiny v různých koncentracích v závislosti na kontaminaci hydrofobinů. Dle tohoto testu vykazoval myrcen silnější potlačující účinek než ocimen. Nicméně, použitá koncentrace myrcenu i ocimenu by byla dle tabulek (ASBC, Methods of Analysis) vždy vyšší než prahová hodnota senzoričného vnímání v konečném produktu.

## **Studium profilu těkavých látek v ciderech a obdobných nápojích**

J. Nešpor, M. Karabín

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### **Abstrakt**

Ačkoliv cider jako alkoholický nápoj zatím nepatří na českém trhu k nejpoblárnějším, jeho obliba každým rokem stoupá. Se zvyšující se poptávkou se rozšiřuje i množství producentů. Odlišné „tradiční“ či „intenzifikované“ technologické přístupy k výrobě, společně s volbou konkrétních směsí odrůd jablek, tvoří jádro výsledných organoleptických vlastností hotového produktu. Společně s vývojem nových technologií vzrůstá potřeba vyvíjet i nové kontrolní metody. Kromě senzorické analýzy, která svými výsledky podává stěžejní informace o kvalitě výrobku, je nezbytné pokračovat i ve zdokonalování metod analytických.

Cílem této studie byla optimalizace extrakčního kroku SPME, kombinovaného s GC-MS, prostřednictvím centrálně kompozičního návrhu experimentu, pro studium profilu těkavých látek cidrů. Touto metodou byl následně proveden screening 33 českých i zahraničních cidrů a cidrových nápojů. Ve vzorcích byly stanovány obsahy 23 těkavých látek, které se významně podílí na celkovém senzorickém profilu hotových výrobků.

Metodou faktorové analýzy byla prokázána odlišnost v analytických profilech související zejména s rozdíly v obsazích vyšších větvených alkoholů a esterů. Ze získaných dat byla prokázána statisticky průkazná odlišnost výrobků malo a velkoproducentů vycházející z používaných surovin i konkrétních technologií.

## **Možnosti využití odpadních surovin ze zpracování vinných hroznů**

P. Cviner, K. Pádrová, I. Kolouchová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### **Abstrakt**

*Vitis vinifera* (réva vinná) je jednou z nejpěstovanějších plodin světa. Při výrobě vína tvoří odpad až 20 hm. % celkového množství vstupních surovin. Vedlejší odpadní produkty vznikají také během prací na vinohradu, při osečkování vinohradu v průběhu vegetace a při řezu révy v zimních měsících. Vinařský průmysl se tak stává jedním z hlavních producentů bioodpadu. Skutečnost, že tyto odpadní suroviny disponují vysokým obsahem polyfenolických látek (resveratrol, polydatin) s antioxidační aktivitou, které mohou být využité nejen ve formě potravinových doplňků, ale také jako účinná směs látek s antimikrobiální aktivitou, zůstává často opomíjena.

Předložená práce se zabývá možnostmi využití odpadních látek z vinařského průmyslu jako potenciálního zdroje antioxidantů. Byly analyzovány vzorky odpadů ze zpracování modrých a bílých odrůd *Vitis vinifera* poskytnuté Vinicí sv. Kláry v Tróji a Vinicí Grébovka v Praze. Jednalo se o vzorky třapin, matolin a letorostů. Zvolená jednoduchá extrakční metoda je vhodná pro následné využití fenolických látek jak pro potravinářské tak medicínské účely. Byl sledován antimikrobiální účinek vybraných extraktů *Vitis vinifera* na mikrobiální růst gram negativní bakterie *Escherichia coli*.

## **Vliv nanočástic kovů na biochemické vlastnosti modelových mikroorganismů**

J. Novotná, K. Pádrová, A. Čejková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### **Abstrakt**

Vzrůstající počet mikroorganismů rezistentních vůči konvenčním antimikrobiálním látkám přináší problémy jak z medicínského, tak společenského hlediska, a je proto nutné vyvíjet stále nové preparáty. V této souvislosti je předmětem současného výzkumu studium aplikace nanočástic na bázi kovů, jako alternativy běžných antibiotik. Jejich jedinečnost spočívá především ve specifické velikosti a reaktivitě, díky čemuž mohou ovlivnit životaschopnost exponované buňky na několika klíčových místech současně. Vzhledem ke skutečnosti, že mikrobiální rezistence představuje proces vývoje a adaptace mikroorganismů v reakci na selektivní tlak určité látky, aplikace nanočástic by mohla toto riziko významně snížit. Cílem výzkumu bylo studium antimikrobiálních účinků nanočástic zlata a stříbra a vůči modelovým prokaryotním a eukaryotním mikroorganismům. Kromě studia viability exponovaných buněk byla práce zaměřena na sledování přítomnosti oxidativního stresu, který je pravděpodobně jedním z klíčových mechanismů působení kovových nanočástic. Vybraným parametrem popisujícím míru oxidativního poškození byla peroxidace lipidů. U studovaných nanočástic byl prokázán toxický účinek. Vznik oxidativního stresu byl však pozorován pouze v případě nanočástic stříbra, a to po expozici koncentracím vyšším než stanovené minimálně inhibiční koncentrace.

## **Studium exprese a charakterizace proteinu CotJC ze sporového pláště *Clostridium pasteurianum***

F. Kaufman

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### **Abstrakt**

Mikroorganismus *C. pasteurianum* je využíván pro biotechnologickou produkci organických rozpouštědel, která probíhá souběžně se sporulací. Z tohoto důvodu je důležité použití jednoduchého a přesného způsobu detekce a kvantifikace spor.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit možnost využití proteinu CotJC, přítomného pouze ve sporách *C. pasteurianum*, pro detekci a kvantifikaci spor.

Během měření této diplomové práce byly testovány a optimalizovány tři metody: ELISA test, imunochemické fluorescenční barvení preparátu pro průtokovou cytometrii a semikvantitativní Western blot. Tyto metody vyžadovaly přípravu dvou konjugátů protilátky proti proteinu CotJC. Pro ELISA test byla připravena protilátka s konjugovanou křenovou peroxidasou a pro fluorescenční barvení byl připraven konjugát s Atto 565. Z důvodu špatné dostupnosti proteinu CotJC ve sporách, jehož předpokládaná lokalizace na povrchu spor se bohužel nepotvrdila, nebylo stanovení ELISA testem ani fluorescenční barvení pro stanovení pomocí průtokové cytometrie průkazné.

Nejlépších výsledků bylo dosaženo při použití semikvantitativního Western blotu. Ke kalibraci metody byl použit rekombinantně připravený protein CotJC. Touto metodou bylo v pěti nezávislých pokusech stanoveno, že  $10^5$  spor *C. pasteurianum* obsahuje přibližně 100 ng proteinu CotJC.

Další část diplomové práce byla zaměřena na biochemickou charakterizaci proteinu CotJC, jehož funkce ve sporách není známa. Využitím imunochemické transmisní elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že protein CotJC se, oproti očekávání, nachází uvnitř spor. Protein CotJC je na základě aminokyselinové podobnosti a přítomnosti vazebných domén predikován jako člen rodiny mangan obsahujících katalas, námi naměřená data jasně ukazují, že rekombinantně připravený protein a protein izolovaný ze spor nevykazují katalasovou aktivitu.

## Sledování průběhu ABE fermentace pomocí mikroskopie a fluorescenční mikroskopie

M. Drahekoupil, J. Kolek, B. Branská

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### Abstrakt

Tato práce se zabývá sledováním průběhu ABE fermentace a stanovením viability u rodu *Clostridium pasteurianum* pomocí fluorescenčního značení a průtokové cytometrie v závislosti na vlivu fyziologického a morfologického stádia inokula. K inokulaci byla použita kultura s buňkami ze začátku exponenciální fáze růstu - tedy v pohyblivém stadiu, kultura s maximální intenzitou fluorescence po hydrolýze karboxyfluorescein diacetátu a nakonec kultura z pozdní exponenciální fáze růstu ve stádiu duření. Viabilita spolu s fyziologickými změnami obou populací byly sledovány pomocí propidium jodidu v kombinaci s karboxyfluorescein diacetátem. Proces ABE fermentace nebyl danými typy inokula výrazně ovlivněn a celková produkce rozpouštědel byla ve všech případech obdobná, nicméně kromě inokulace pohyblivým stádiem klostridií byl u ostatních inokulací pozorován pozdější nástup solventogenní fáze.

### 1. Úvod

Aceton-butanol-etanolová (ABE) fermentace je proces, který využívá bakteriální kultivace k produkci rozpouštědel acetonu, butanolu a etanolu. Nejčastějšími bakteriemi využívanými k tomuto procesu jsou bakterie rodu *Clostridium*, především *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum* a *C. beijerinckii* (Patáková a kol., 2013).

Zájem o ABE fermentaci v posledních letech stoupá a to především z hlediska alternativní možnosti výroby biopaliv. Výzkumu solventogenních klostridií se proto věnuje celá řada pracovišť, ať už v podobě genetických manipulací nebo optimalizací kultivačních podmínek. Pro oba přístupy je ovšem klíčové znát podrobně metabolismus těchto mikroorganismů, jeho regulace a mít účinný nástroj ke sledování fyziologického stavu kultury. K tomu slouží mnoho metod, mezi něž patří například fluorescenční techniky využívající mikroskopii nebo průtokovou cytometrii.

V posledních letech má průtoková cytometrie, jakožto metoda pro rychlé stanovení počtu buněk, stále širší využití. Na optimalizaci metody pro kultivaci solventogenních klostridií je

zaměřeno několik výzkumů. Největší problém při této metodě je najít vhodnou kombinaci fluorescenčních sond, které by kvalitně odrážely životaschopnost a fyziologický stav dané kultury jak v exponenciální, tak ve stacionární fázi růstu.

Linhová a kol. (2012) testovali šest nejběžnějších fluorescenčních sond (propidium jodid-PI, ethidium bromid - EtBr, fluorescein diacetát - FDA, karboxyfluorescein diacetát - CFDA, bis-oxonol a Rhodamin123) s cílem posoudit, zdali jsou tyto sondy vhodné pro identifikaci životaschopných a mrtvých buněk *C. pasteurianum* a *C. beijerinckii* v suspenzi. Bylo zjištěno, že nejvhodnější pro hodnocení viability se jeví fluorescenční sondy PI, BOX a CFDA, tedy sondy k detekci membránové integrity, membránového potenciálu a intracelulární esterázové aktivity, resp. (Linhová a kol., 2012).

Na základě dostupné literatury a předchozích zkušeností byla k hodnocení fyziologických změn v populaci klostridií zvolena kombinace PI a CFDA, pomocí níž byly sledovány změny viability v průběhu ABE fermentací vedených za stejných podmínek, inokulovaných různými morfologickými stádii exponenciálně rostoucí kultury *C. pasteurianum*.

## 2. Materiál a metody

Pro jednotlivé experimenty byly sestaveny bioreaktory INFORS HT Multifors, které byly opatřeny pH elektrodou, teploměrem, vzduchovými filtry s porozitou 0,2  $\mu\text{m}$ , pumpou pro přívod báze, příváděcími lahvemi s 200 ml 10% roztoku NaOH pro úpravu pH, přívodem oxidu uhličitého, aeračním věncem, míchadlem a vzorkovacím zařízením (samplerem) pro odebrání vzorků během kultivace. Byly nakalibrovány pH elektrody pomocí dvoubodové kalibrace, a to v rozmezí pH od pH 4,01 do pH 7.

Nakonec byly reaktory naplněny TYA živným médiem o objemu 630 ml, a poté spolu se všemi součástmi vysterilovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 min. Po zchladnutí reaktoru bylo médium probubláno CO<sub>2</sub> pro vytvoření anaerobního prostředí, pomocí 10% roztoku NaOH bylo upraveno pH na hodnotu 6,3. Médium bylo zaočkováno připravenou kulturou *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 o koncentraci  $8 \cdot 10^9$  buněk/l v následujících stádiích: pohyblivém stadiu, kultura s maximální intenzitou fluorescence po hydrolýze karboxyfluorescein diacetátu a nakonec kultura z pozdní exponenciální fáze růstu ve stadiu duření. Kultivace byla prováděna v anaerobním prostředí za teploty 37 °C, bez regulace pH a za stálého míchání.

### 2.1 Analýza pomocí průtokové cytometrie

Analýza byla prováděna na průtokovém cytometru Accuri C6 (BD Biosciences, USA), jako nosná kapalina byla použita odplyněná demineralizovaná voda, rychlost analýzy byla

nastavena na průtok 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Průtokový cytometr Accuri C6 byl vybaven laserem o vlnové délce 488 nm, FSC detektorem pro dopředný rozptyl, SSC detektorem pro boční rozptyl a detektory FL 1 - 4, proměření fluorescence v celé oblasti viditelného spektra.

Jako fluorescenční barvivo byl zvolen propidium jodid (PI) o koncentraci 1 mg/ml rozpuštěný v  $\text{H}_2\text{O}$ , v kombinaci s karboxyfluorescein diacetátem (CFDA), kdy CFDA mělo koncentraci 1 mg/ml v DMSO.

Z každého odebraného vzorku pro daný čas a reaktor byl odebrán 1 ml narostlé biomasy. Biomasa byla odstředěna při 2000 x g, 3 min a dvakrát promyta fyziologickým roztokem. Vzorek byl naředěn filtrovaným (0,22  $\mu\text{m}$ ) fyziologickým roztokem, o koncentraci 9 g/l NaCl, na hodnotu  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5 \pm 0,1$ . Následně bylo z každého vzorku pipetováno 0,2 ml pro analýzu pomocí průtokového cytometru. Ke vzorku bylo přidáno 2  $\mu\text{l}$  PI a 2  $\mu\text{l}$  CFDA.

Vzorky byly promíchány a uloženy do temna na 10 min. Takto připravený vzorek byl následně naředěn 100 x filtrovanou (0,2  $\mu\text{m}$ ) demineralizovanou  $\text{H}_2\text{O}$ , zanalyzován pomocí průtokového cytometru a vyhodnocen.

## 2.2. Analýza pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie HPLC

Analýza obsahu glukózy a metabolitů byla prováděna na přístroji HPLC Agilent Series 1200. Podmínky HPLC jsou shrnuty v Tab. I.

Tab. I – Podmínky HPLC

Kolona	Watrex 250×8 mm polymer IEX H+
Průtok	0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Mobilní fáze	5 mM $\text{H}_2\text{SO}_4$ v demi $\text{H}_2\text{O}$
Teplota kolony	60 °C
Detektor	Refraktometrický
Velikost nástřiku	20 $\mu\text{l}$
Doba analýzy	50 min

## 3. Výsledky a diskuze

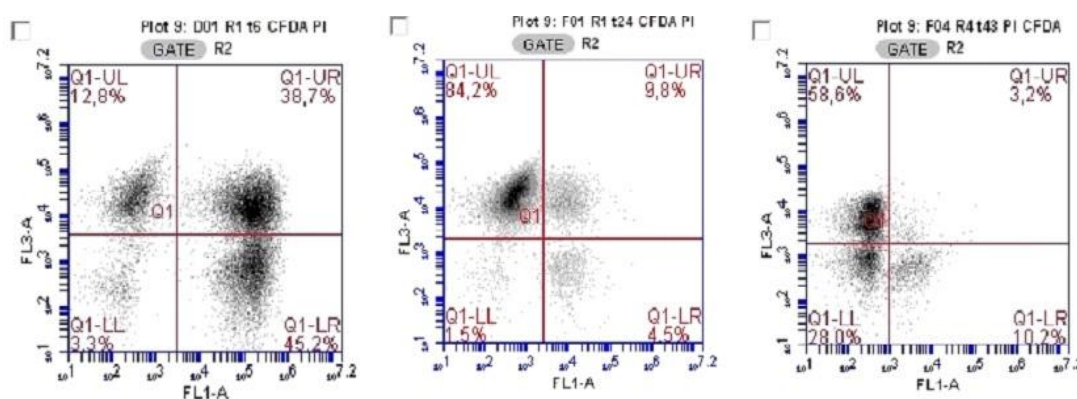
### 3.2. Fluorescenční značení prostřednictvím PI a CFDA

Karboxyfluorescein diacetát je nefluorescentní látka schopná přecházet do buněk volnou difuzí, v buňkách je hydrolytickou aktivitou esteráz štěpen na zeleně fluorescenční karboxyfluorescein, který na rozdíl od původní molekuly nese negativní náboj a nemůže přecházet volně přes membrány. Aktivní buňky s neporušenými membránami jsou tak značeny zeleně (Branská a kol., 2011). Karboxyfluorescein byl používán v kombinaci s propidium jodidem. Propidium jodid neprochází neporušenými membránami živých buněk; pokud mají buňky poškozenou cytoplazmatickou membránu, může volně proudit do buněk.



Po vazbě na nukleové kyseliny se jeho fluorescence zvýší až 40x a fluorescenční excitační maximum je posunuto o 30-40 nm do červené oblasti. Toho se využívá k detekci mrtvých buněk, kde barvivo uvnitř poškozené buňky po excitaci vhodným zářením emituje intenzivně červené světlo (Nieminen a kol., 1992).

Vyhodnocení bylo provedeno graficky formou dvouparametrových „dotplotů“, kdy buňky byly od nebuněčných částic odděleny na základě parametrů dopředného (FSC-forward scatter) a bočního (SSC-side scatter) rozptylu. Pro stanovení fluorescenčních charakteristik byly proti sobě vyneseny intenzity červené (FL3) a zelené (FL1) fluorescence viz. Obr. 1.



Obr. 1 - Vyhodnocení výsledků analýzy pomocí průtokové cytometrie pro kmen *C. pasteurianum* v 6-té, 24-té a 43-tí hodině kultivace. Barvení buněk bylo provedeno kombinací fluorescenčních barviv PI a CFDA.

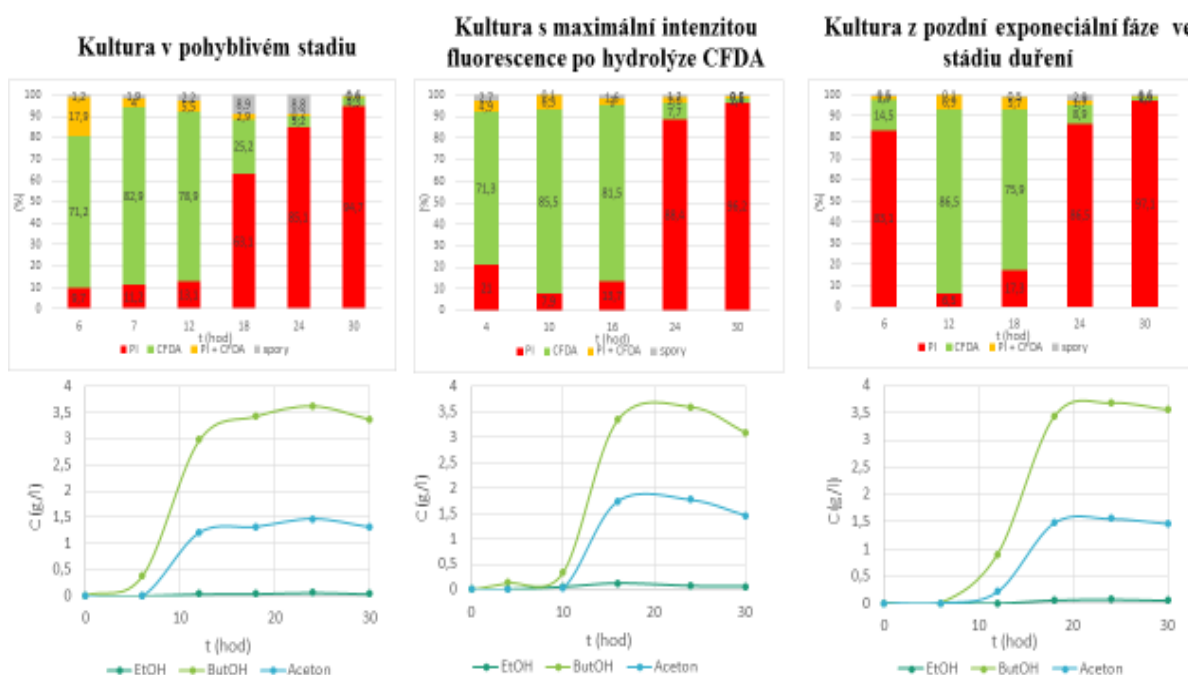
Na Obr. 1 jsou uvedeny „dot-ploty“ pro buňky značené PI/CFDA v exponenciální, počátku stacionární a pozdní stacionární fázi. Je zřejmé, že daná populace může být rozdělena nejméně do čtyř subpopulací, které jsou podle intenzit daných fluorescencí vyhodnoceny jako: i) buňky „mrtvé“ – buňky s nejvyšší intenzitou červené fluorescence PI (levý horní kvadrant); ii) buňky „živé“ – buňky s nejvyšší intenzitou zelené fluorescence CFDA (pravý dolní kvadrant); iii) buňky značené jak červeně, tak zeleně (pravý horní kvadrant) – představující dvojice, částice s presporou nebo buňky, jež nejsou plně permeabilizované; iv) buňky s nízkou intenzitou fluorescence (dolní levý kvadrant) - nebuněčné částice a spory.

### 3.3. Testování vlivu růstové fáze inokula na produkci rozpouštědel

Výše uvedené fluorescenční značení v kombinaci s analýzou na průtokovém cytometru bylo v další části práce využito ke sledování změn ABE fermentace, kde byl testován vliv stádia inokula na viabilitu populace a produkci rozpouštědel. K inokulaci byla

použita: kultura v pohyblivém stádiu, kultura ve stádiu duření a kultura v exponenciální fázi růstu s maximální metabolickou aktivitou.

Jednotlivé grafy (Obr. 2) jsou seřazeny podle způsobu očkování média.



Obr. 2 – Grafy zobrazující rozdělení buněk kmene *C. pasteurianum*, pro jednotlivé kultivace očkované kulturou v daném fyziologickém a morfologickém stádiu do jednotlivých subpopulací po značení PI a CFDA, v závislosti na čase ve srovnání s produkčními grafy pro daný typ inokulace.

Z grafů je patrné, že pro všechny tři typy inokula bylo maximální produkce butanolu dosaženo v 16 – 18 h. Tomuto odpovídá i spotřeba glukózy a grafy viability. V případě inokulace již duřícími buňkami byla vstupní koncentrace životaschopných buněk poměrně nízká, ale přenesením kultury do čerstvého média došlo rychle k obnově kultury a v dalších měřeních byla viabilita srovnatelná se zbývajícími typy inokula.

Z výpočtů plyne, že nejvyšší produktivity butanolu 0,15 g/l/h bylo dosaženo při inokulaci kulturou ve stádiu duření, ovšem nejvyšší koncentrace celkových rozpouštědel bylo získáno kulturou v exponenciální fázi růstu s maximální intenzitou fluorescence CFDA, což platí také pro specifickou rychlost růstu biomasy, viz. Tab. II.

Tab. II – Porovnání produkčních a růstových parametrů podle typu inokula

Kultura	ButOH (g/l/h)	Celk. rozp. (g/l/h)	Celk. kys. (g/l/h)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
Pohyblivé st.	0,13	0,18	0,02	0,19
Zduřelé st.	0,15	0,21	0,02	0,18
Exponenciální růst	0,14	0,22	0,08	0,23

Z výsledků plyne, že růstová fáze nemá v testovaném rozsahu na produkci rozpouštědel významný vliv, jelikož celková koncentrace produkovaných rozpouštědel byla téměř shodná viz. Tab. II.

#### 4. Závěr

Byly provedeny experimenty, při kterých byl sledován vlivy růstové fáze inokula na celkovou produkci acetonu, butanolu a etanolu a viabilitu bakterií rodu *Clostridium pasteurianum*. Ke sledování viability kultury byla úspěšně využita metoda fluorescenčního značení pomocí karboxyfluorescein diacetátu v kombinaci s propidium jodidem a následná analýza průtokovou cytometrií. Získaná data odpovídala produkčním charakteristikám. Na základě porovnání dat bylo zjištěno, že růstová fáze inokula v testovaném rozsahu neměla významný vliv na výslednou produkci rozpouštědel.

#### 5. Literatura

- Branská B., Linhová M., Patáková P., Paulová L., Melzoch K. (2011) Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chemické listy*, 105, str. 586-593.
- Linhová M., Branská B., Patáková P., Lipovský J., Fribert P., Rychtera M., Melzoch K. (2012) Rapid flow cytometric method for viability determination of solventogenic clostridia. *Folia Microbiologica*, 57, str. 307 – 311.
- Patáková P., Linhová M., Rychtera M., Paulová L., Melzoch K. (2013) Novel and neglected issues of acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation by clostridia: Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. *Biotechnology Advances*, 31, str. 58–67.
- Nieminen, A. L., Gores, G. J., et al. (1992) A novel cytotoxicity Screening assay using a multiwell fluorescence scanner. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 115, str. 147-155.

## Využití zemědělských a průmyslových odpadních surovin jako substrátu pro výrobu kyseliny mléčné

L. Gharwalová, L. Paulová, B. Branská

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### Abstrakt

Předmětem práce bylo využít odpadní a zemědělské suroviny jako základ médií pro produkci kyseliny mléčné pomocí mléčných bakterií. Nejprve byl proveden screening možných producentů kyseliny mléčné, během kterého byla sledována škála využívaných zdrojů uhlíku a energie na modifikovaných MRS médiích, nárůst biomasy a produkce kyseliny mléčné. Kmen *Lactobacillus casei* CCDM 198 dosáhl nejlepší produkci kyseliny mléčné na glukóze, laktóze a xylóze s hodnotami výtěžnosti 116,6%, 77,7%, 43,0%. Kmen *Lactobacillus reuteri* LHR14 dosáhl nejlepší produkci kyseliny mléčné na sacharóze, arabinóze a celobióze. Výtěžnosti na těchto substrátech byly 111,0%, 49,3%, 81,3%. Tyto kmeny byly dále použity pro sledování produkce kyseliny mléčné na následujících odpadních a zemědělských surovinách, které sloužily jako zdroj uhlíku, případně dalších živin: pšeničná sláma, pivovarské mláto, pšeničné lihovarské výpalky, cassava a melasa. Byla též testována možnost náhrady zdroje dusíku odpadními surovinami a vedlejšími produkty z potravinářské výroby. Konkrétně byl použit alkalický hydrolyzát kuřecího peří, syrovátkový protein a melasové lihovarské výpalky. Suroviny vybrané na základě baňkových experimentů byly poté využity pro produkci kyseliny mléčné v laboratorním bioreaktoru v režimu vsádkové a přítokované kultivace. Nejlepší výtěžnost ve vsádkové kultivaci dosáhl kmen *L. reuteri* LHR14 na médiu z cassavy (79,1%). Jako vhodná náhrada dusíku v médiu se osvědčil hydrolyzát kuřecího peří a syrovátkový protein.

### 1. Úvod

Kyselina mléčná je organická kyselina s jedním chirálním uhlíkem. Jedná se o středně silnou kyselinu využívanou v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Často se při fermentační výrobě kyseliny mléčné jako zdroj uhlíku využívají rafinované cukry jako glukóza či sacharóza, kromě toho se do média musí přidávat komplexní zdroje dusíku jako kvasničný extrakt, pepton nebo hovězí extrakt. Tento postup je ekonomicky nevýhodný, protože čistý cukr a komplexní zdroje dusíku jsou drahé, zatímco kyselina mléčná je relativně levný produkt (Auras a kol., 2011).

Světový trh kyseliny mléčné se v roce 2015 odhadoval na 330 000 tun (Holger a Czermak, 2014). Existuje řada výrobců kyseliny mléčné fermentačním způsobem, mezi největších patří firma Purac (Nizozemsko), Galactic (Belgie), Cargill (USA) a několik čínských producentů. Komerční ceny potravinářské kyseliny mléčné se pohybují v rozmezí 1,38 US \$/kg (50% čistota) a 1,54 US \$/kg (88% čistota) (Wee a kol., 2006). Tradiční využití je v potravinářském průmyslu na okyselení, konzervování potravin nebo výrobu emulgátorů. Médium obsahující kyselinu mléčnou, může po obohacení dusíkem být použito jako doplňkové krmivo pro přežvýkavce. V neposlední řadě je však kyselina mléčná používána při výrobě kyseliny polymléčné (Zhang a kol., 2007). Polymléčná kyselina je lineární, alifatický, termoplastický polyester, který je odbouratelný enzymatickými cestami. Komerčně používané PLA jsou většinou kopolymery kyseliny poly-L-mléčné (PLLA) a kyseliny poly-D, L- mléčné (PDLA) (Martin a Avérous, 2001).

## 2. Materiály

V práci byly použity kmeny, které byly laskavě poskytnuty Ing. Šárkou Horáčkovou z Ústavu mléka a tuků VŠCHT Praha (*Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* CCM 1828, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 617, *Lactobacillus casei* CCDM 198) a kmeny, které byly dodány průmyslovým partnerem - TVL výzkumné centrum Pardubice (*Lactobacillus salivarius* LBM 9, *Lactobacillus acidophilus* Ru, *Lactobacillus plantarum* VT2 *Lactobacillus reuteri* LHR14. *Lactobacillus salivarius* 10A).

Jako inokulační média byla použita standardní MRS média. Pro produkci kyseliny mléčné byla použita modifikovaná MRS média, ve kterých byla glukóza a/nebo komplexní zdroje dusíku nahrazeny odpadní nebo zemědělskou surovinou. Pro prvotní screening využitelnosti různých zdrojů uhlíku a energie bylo připraveno MRS médium, ve kterém byla glukóza nahrazena jiným sacharidem (laktóza, sacharóza, glycerol, arabinóza, xylóza, celobióza).

Pro hodnocení využitelnosti zdroje uhlíku a energie pro produkci kyseliny mléčné byla využita statická kultivace v Erlenmayerových baňkách a v mikrotitračním zařízení. Vsádková a přítokovaná kultivace byla provedená v laboratorním bioreaktoru Multifors.

## 3. Analytické metody

Pro stanovení koncentrace produkovaných metabolitů a zdrojů uhlíku byla použita metoda vysokotlakové kapalinové chromatografie (HPLC). Stanovení koncentrace kyseliny mléčné, glukózy a dalších zdrojů uhlíku, etanolu a kyseliny octové probíhalo na přístroji HPLC Agilent 1200 Series s refraktometrickým detektorem a polymerní kolonou IEX H+ (Watrex

250x8 mm). Jako mobilní fáze pro analýzu byla použita 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, doba analýzy vzorku byla 30 minut, teplota a objem nástřiku byly 80°C a 20 µl. Stanovení nárůstu biomasy probíhalo gravimetrickým stanovením suché biomasy a spektrofotometrickým stanovením koncentrace biomasy při 600 nm.

#### 4. Výsledky a diskuze

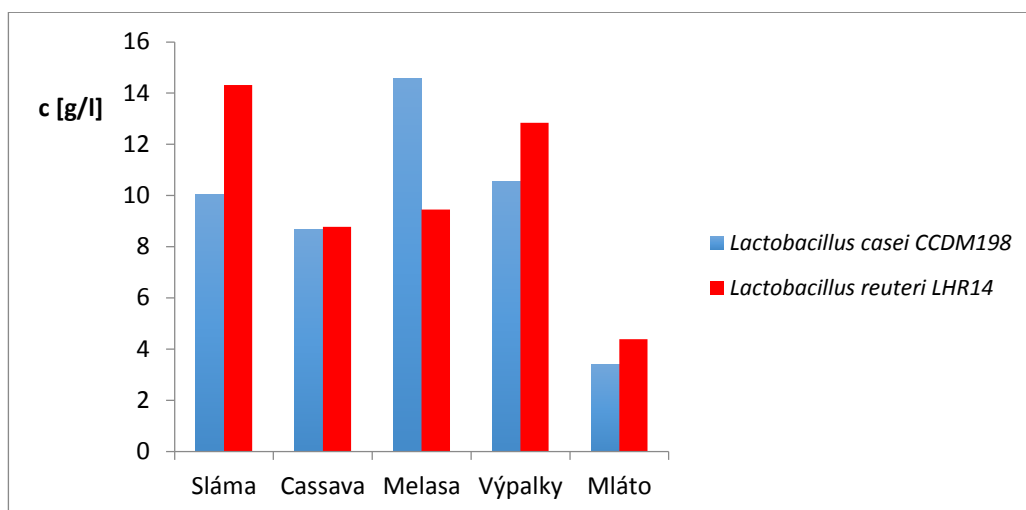
##### 4.1 Výběr produkčních kmenů

Z testovaných kmenů byly jako nejvhodnější producenti kyseliny mléčné na odpadních a zemědělských materiálech vybrány následující kmeny. Kmen *Lactobacillus reuteri* LHR14 dosáhl nejlepší produkce kyseliny mléčné na sacharóze (výtěžnost 100%) , arabinóze (výtěžnost 49%) a celobióze (výtěžnost 81%). Testovaný kmen *Lactobacillus reuteri* LHR14 se jevil vhodný pro produkci kyseliny mléčné na lignocelulózových materiálech, které po enzymové hydrolýze obsahují glukózu, pentózy (xylóza, arabinóza) a celobiózu a na melase. Kmen *Lactobacillus casei* CCDM 198 dosáhl nejlepší produkci kyseliny mléčné na xylóze (výtěžnost 43%) a laktóze (výtěžnost 78%) a glukóze (výtěžnost 100%), proto je vhodné jej použít pro produkci kyseliny mléčné na škrobnatých nebo lignocelulózových materiálech nebo syrovátce. Žádný z testovaných kmenů nebyl schopen využít glycerol ani z něho produkovat kyselinu mléčnou.

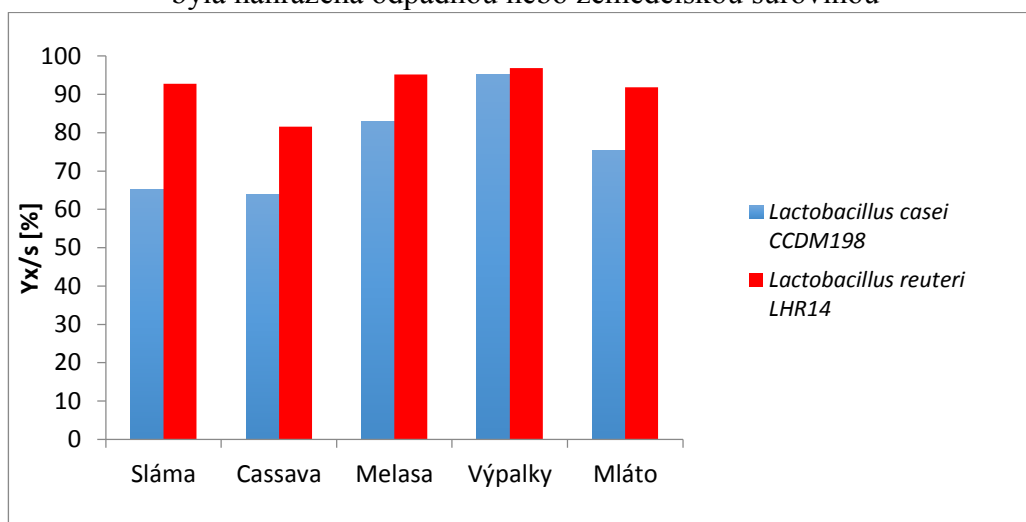
##### 4.2 Produkce kyseliny mléčné na odpadních a zemědělských surovinách

Vybrané kmeny byly poté použity k produkci kyseliny mléčné na odpadních a zemědělských surovinách. Všechny testované lignocelulózové materiály (pšeničná sláma, mláto, pšeničné lihovarské výpalky) obsahovaly po enzymové hydrolýze glukózu, pentózy a malé množství celobiózy, proto byly pro jejich fermentaci použity oba testované kmeny. Kmen *Lactobacillus reuteri* LHR14 dosahoval na pšeničných lihovarských výpalcích po přidávku živin z MRS média výtěžnost kyseliny mléčné až 76%.

Melasa je vedlejší surovinou z výroby cukru. *Lactobacillus casei* CCDM 198 měl na médiu připraveném z melasy produkovat kyselinu mléčnou s 83 %. Cassava, škrobnatá plodina hojně pěstovaná v Asii a Africe, byla po zcukření použita pro přípravu médií pro produkci kyseliny mléčné. *Lactobacillus casei* CCDM 198 a *Lactobacillus reuteri* LHR14 dosahovaly na cassavě výtěžnosti 64% a 82% vzhledem na spotřebovanou glukózu. Porovnání koncentrací a výtěžností vyprodukované kyseliny mléčné na odpadních a zemědělských surovinách jsou uvedeny na Obr. 1 a 2.



Obr. 1 Konečné koncentrace kyseliny mléčné na mediích, v nichž glukóza (20 g/l) byla nahrazená odpadnou nebo zemědělskou surovinou



Obr. 2 Výtěžnosti kyseliny mléčné na mediích, v nichž glukóza byla nahrazená odpadnou nebo zemědělskou surovinou

Cena média se dá snížit i nahrazením komplexních zdrojů dusíku potřebných pro kultivaci. Oba vybrané produkční kmeny byly schopné růst a produkovat kyselinu mléčnou na modifikovaných MRS médiích s nahrazenými komplexními zdroji dusíku hydrolyzátem peří. Testované kmeny *Lactobacillus casei* CCDM 198 a *Lactobacillus reuteri* LHR14 produkovaly kyselinu mléčnou i na médiích složených pouze z hydrolyzátu peří a glukózy s přídavkem fosforu, výtěžnost byla 41% a 44% (vztažené na počáteční koncentraci glukózy v médiu).

Syrovátkový protein byl použit při kultivaci v baňkách jako náhrada komplexních zdrojů dusíku. Na modifikovaných MRS médiích s glukózou a syrovátkovým proteinem bylo dosaženo výtěžnosti kyseliny mléčné 87% pro *L. casei* CCDM 198 a 99% pro *L. reuteri* LHR14. Lihovarské melasové výpalky získané po destilaci nebo z odparky neobsahovaly

žádný zdroj uhlíku a energie pro produkci kyseliny mléčné, proto byly využity jako ředící kapalina pro přípravu média. Po přidání glukózy byly testované kmeny schopné produkce na lihovarských výpalcích z destilace, zatímco výpalky z odparky neobsahovaly dostatek živina. Kmen *Lactobacillus casei* CCDM 198 dosáhl na výpalcích z destilace výtěžnost kyseliny mléčné 98%, kmen *Lactobacillus reuteri* LHR14 dosáhl na tomtéž médiu výtěžnost 56%.

Cena MRS média je tvořena zhruba z 50% cenou komplexních zdrojů dusíku a ze 7% cenou glukózy. Při výpočtu byly použity ceny uvedené na stránce dodavatele chemikálií (Sigma Aldrich, 2016). Nejlepší efekt na snížení ceny substrátu má náhrada jak zdroje uhlíku, tak i dusíku v produkčním médiu levnější surovinou. Kromě již zmíněných pšeničných výpalků, byly testované i společné hydrolyzáty slámy a peří, které sdílejí společný krok alkalické hydrolyzy. Oba kmeny byly schopné produkce kyseliny mléčné na tomto typu média. Kmen *L. casei* CCDM 198 dosáhl nejlepší výtěžnost kyseliny mléčné 73% na hydrolyzátu peří s počáteční koncentrací peří 17,5 g/l, přičemž spotřeboval téměř všechnu glukózu přítomnou v médiu. Kmen *L. reuteri* LH14 produkoval lépe na hydrolyzátu s počáteční koncentrací peří 10,25 g/l a dosáhl výtěžnost 98%, přičemž spotřeboval 44% glukózy v médiu.

#### **4.3 Produkce kyseliny mléčné v laboratorním bioreaktoru**

Pro produkci v bioreaktoru byly vybrány jako suroviny cassava, melasa, hydrolyzát pšeničné slámy, kuřecí peří a syrovátka. Před vsádkovou kultivací na cassavě proběhlo nejprve zcukření škrobu, poté byly doplněny živiny MRS média. Náš kmen *Lactobacillus reuteri* LHR14 dosáhl ve vsádkové kultivaci výtěžnost 79 %, konečná koncentrace kyseliny mléčné byla 15 g/l. Po skončení vsádkové kultivace byl do bioreaktoru přítokován koncentrovaný hydrolyzát cassavy s obsahem glukózy 80 g/l. Během přítokování média byla glukóza v médiu akumulována až do koncentrace 20 g/l. Po ukončení přítoku byla během 4 hodin všechna glukóza v médiu spotřebována. Rychlost spotřeby glukózy byla trojnásobná po ukončení přítoku než během přítokování. Rychlost produkce kyseliny mléčné ve vsádkové kultivaci byla 1,2 g/h, během přítokování klesla na 1,1 g/h a po ukončení přítokování se rychlost produkce zvýšila na 1,85 g/h.

Dále byla produkována kyselina mléčná na melasovém médiu. Kmen *Lactobacillus casei* CCDM 198 dosáhl ve vsádkové kultivaci 77% výtěžnost kyseliny mléčné a spotřeboval všechnu sacharózu přítomnou v médiu. Poté bylo přítokováno koncentrované melasové médium s obsahem sacharózy 250 g/l, po spuštění přítokování byla sacharóza prvních 6 hodin spotřebovávaná rychlostí 3,8 g/h, následně byla rychlost spotřeby snížena na 0,6 g/h z

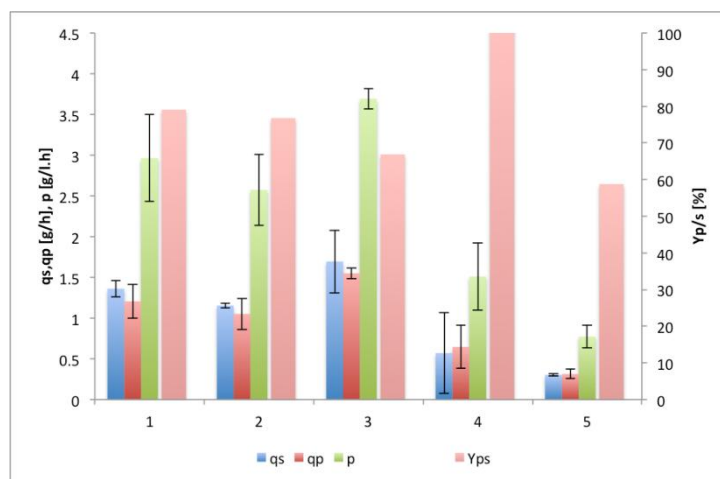


důvodu akumulace sacharózy. Rovněž i rychlost tvorby produktu rapidně poklesla z 2,9 g/h na 0,5 g/h. Konečná koncentrace kyseliny mléčné byla 46 g/l.

Vsádkovou kultivací na hydrolyzátu slámy se syrovátkovým proteinem, jako zdrojem dusíku, byla dosažena 67% výtěžnost. Rychlost spotřeby glukózy ve vsádkové kultivaci byla 1,7 g/h, rychlost spotřeby xylózy byla 0,64 g/h. Na konci kultivace bylo v médiu přítomných 53 g/l kyseliny mléčné.

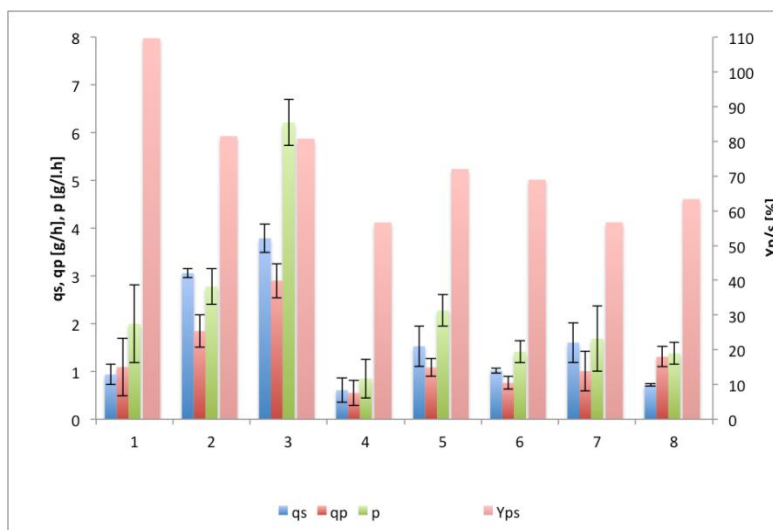
Vsádkovou kultivací hydrolyzátu slámy a peří připraveném separátní hydrolyzou obou surovin byla dosažena výtěžnost 59% vzhledem na spotřebovanou glukózu, xylózu, arabinózu a celobiózu. Hydrolyzát slámy byl do reaktoru přiváděn rychlostí 53 ml/h. Během přítokování hydrolyzátu slámy byla glukóza v médiu akumulována do koncentrace 1,6 g/l. Nespotebovaná glukóza z média byla kompletně vyčerpána do 4 hodin po ukončení přítokování. Rychlost spotřeby substrátu byla 0,72 g/h, což je o 2- násobně méně než v případě přítokování čistého roztoku glukózy u společného hydrolyzátu slámy a peří. Výtěžnost přítokované kultivace na společném hydrolyzátu slámy a peří byla 63% a na konci kultivace bylo v médiu 39 g/l kyseliny mléčné.

Rychlost spotřeby glukózy resp. sacharózy, rychlost produkce kyseliny mléčné, produktivita a výtěžnost vsádkové a přítokované kultivace na jednotlivých surovinách (hydrolyzát cassavy, melasové médium, hydrolyzát slámy se syrovátkovým proteinem a hydrolyzát slámy a peří připraven zvlášť) jsou uvedené na obr. 3 a 4.



1-cassava, 2- melasa, 3- hydrolyzát slámy se syrovátkovým proteinem, 4- společný hydrolyzát slámy a peří, 5- hydrolyzát slámy a peří připraven separátní hydrolyzou

Obr. 3 Vsádková kultivace na odpadních surovinách- vypočtené parametry



1- cassava (přítok), 2- cassava (po ukončení přítokování), 3- melasa přítok, 4- melasa přítok (po hromadění sacharózy) 5- sláma se syrovátkovým proteinem (přítok 6 ml/h), 6- sláma se syrovátkovým proteinem (přítok 1,8 ml/h), 7- hydrolyzát slámy a peří připraven zvlášť (přítok - hydrolyzát peří), 8- společný hydrolyzát slámy a peří (přítok- koncentrovaný roztok glukózy)

Obr. 4 Přítokovaná kultivace na odpadních surovinách- vypočtené parametry

## 5. Závěr

Na základě screeningových experimentů byly jako nejvhodnější kmeny mléčných bakterií pro produkci kyseliny mléčné z odpadních materiálů vybrány *Lactobacillus casei* CCDM 198, který dosáhl nejlepší produkci kyseliny mléčné na glukóze, laktóze a xylóze a kmen *Lactobacillus reuteri* LHR14, který je vhodný pro produkci kyseliny mléčné ze sacharózy, arabinózy a celobiózy. Jako vhodná náhrada zdroje dusíku v MRS médiu byly vyhodnoceny hydrolyzát kuřecího peří a syrovátkový protein. Jako vhodný zdroj uhlíku a energie se po vyhodnocení produkce kyseliny mléčné ukázal hydrolyzát pšeničné slámy, hydrolyzát cassavy a melasa.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo kultivací v bioreaktoru na hydrolyzátu cassavy. Kmen *L. reuteri* LHR14 vyprodukoval při vsádkové kultivaci 14,5 g/l kyseliny mléčné s výtěžností 79,1 %. Během přítokované kultivace byla koncentrace kyseliny mléčné zvýšená na 30 g/l.

## 6. Literatura

- Auras, R.A., Lim, L.-T., Selke, S., Tsuji, H. (2011) Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 528 stran.
- Holger, Z., Czermak, P. (2014) Biotechnology of Food and Feed Additives, Berlin: Springer, 301 stran.
- Martin, O., Avérous, L. (2001) Polylactic acid: plasticization and properties of biodegradable multiphase systems, *Polymer*, 42, str. 6209-6219.
- Sigma- Aldrich [on line]. Poslední aktualizace 2016 [27. 4. 2016]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com>
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Ryu, H.-W. (2006) Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications, *Food Technology and Biotechnology*, 44, str. 163–172.
- Zhang, Y., Chen, X., Luo, J., Qi, and Wan, (2014) An efficient process for lactic acid production from wheat straw by a newly isolated *Bacillus coagulans* strain IPE22, *Bioresource Technology*, 158, str. 396–399.

## **Produkce kyseliny mléčné jako prekurzor pro výrobu bioplastů**

J. Chmelík, S. Vilčková, L. Paulová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha (pokud jsou autoři z více institucí, odlišit číslováním v horním indexu)

### **Abstrakt**

Efektivita procesu produkce kyseliny mléčné je závislá na mnoha faktorech, od složení médií přes produkční mikroorganismus až po režim vedení kultivace. Cílem práce bylo pro vybraný bakteriální kmen nalézt nejvhodnější způsob kultivace, který by umožňoval produkci kyseliny mléčné jako prekurzoru pro výrobu polymléčnanu – biodegradovatelného bioplastu. Po screeningu 16 bakteriálních kmenů a stanovení vlivu kultivačních podmínek na produkční vlastnosti kmene byl pro další experimenty vybrán *Lactobacillus casei* CCM 198. Pro nalezení vhodného způsobu kultivace byla porovnána produkce kyseliny mléčné ve vsádkovém, přítokovaném a kontinuálním spořádání. Pro vsádkovou kultivaci byla stanovena nejvhodnější počáteční koncentrace zdroje uhlíku a energie (glukosy) 60 g/l, za těchto podmínek bylo vyprodukováno 59 g/l kyseliny mléčné (91% tvořila L-forma), výtěžnost byla 97 % vztaženo na spotřebovanou glukosu a produktivita 4,86 g/l/h. Pro přítokovanou kultivaci byl určen jako nejvhodnější způsob konstantní přítokování koncentrovaného roztoku glukosy, za těchto podmínek bylo vyprodukováno 91 g/l kys. mléčné s výtěžností 93 % a produktivitou 5,41 g/l/h. V režimu kontinuální kultivace byly porovnány kultivace suspenzní populace a populace imobilizované na částicích kukuřičného oklasku v intervalu zřed'ovacích rychlostí 0,05 až 0,3 1/h. Nejvyšší vyprodukované koncentrace (20,54 g/l) kys. mléčné bylo dosaženo imobilizovanou populací při zřed'ovací rychlosti 0,1 1/h. Nejvyšší produktivity 4,36 g/l/h bylo dosaženo při zřed'ovací rychlosti 0,2 1/h a to opět pro imobilizovanou populaci.

## **Vliv N-acetylcysteinu a cinnamaldehydu na stabilitu biofilmu oportunně patogenních mikroorganismů**

Lokočová K., Masák J., Paldrychová M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### **1. Úvod**

Zachycení buňky v biofilmu jí poskytuje ochranu před nepřízní okolního prostředí. Mikroorganismy v biofilmu mají schopnost kolonizovat tkáň a vyznačují se zvýšenou odolností vůči běžným lékům (Řezanka a kol., 2012). Literatura uvádí, že více než 80 % mikrobiálních infekcí v lidském těle je vyvoláno biofilmy patogenních mikroorganismů (Costerton a kol., 1999). K medicínsky významným bakteriím vytvářejícím biofilmové uspořádání patří *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a obecně čeleď *Enterobacteriaceae* (kam patří např. *Escherichia coli*) (Byers, 2008; Costerton a kol., 1999), k oportunně patogenním kvasinkám náleží rod *Candida*, *Trichosporon*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* a *Cryptococcus* (Fanning a Mitchell 2012).

Z důvodu vlivu tvorby biofilmu na patogenitu a rezistenci mikroorganismů je zájem o aplikaci přírodních látek, které disponují antibiofilmovou aktivitou. Možným řešením této problematiky je modulace systému quorum sensing, jenž je častým cílem pro vývoj nových protiinfekčních přípravků (Jha a kol., 2013).

Je známo mnoho inhibitorů quorum sensing, jenž dokáží inhibovat produkci respektive způsobovat degradaci signálních molekul. Použití těchto inhibitorů může být klíčové pro léčbu perzistentních infekcí způsobených biofilmy a představovat nový směr v řešení problémů rezistence biofilmů vůči antibiotikům (Norizan a kol., 2013).

### **2. Biofilm**

Biofilm můžeme definovat jako společenství mikroorganismů přisedlých k různým povrchům (Worthington a kol., 2012). Existuje řada mechanismů, kterými mikroorganismy přichází do těsného kontaktu s povrchem a pevně se k němu váží. Tvorba biofilmu zahrnuje několik fází zahájených adhezí prvních buněk na povrch. Zralý biofilm je pak třídímenzionální struktura, jejíž složení se mění v závislosti na druhu mikroorganismu a podmínkách vnějšího prostředí. Formace biofilmu závisí významně na produkci extracelulárních látek, které pak tvoří extracelulární matrix. Extracelulární matrix je typicky tvořena proteiny,

exopolysacharidy a obvykle též DNA a udržuje buňky pohromadě v mnohobuněčné komunitě (Wilkins a kol., 2014).

### **2.1 Ovlivnění stability biofilmu**

Ve snaze nalézt vhodná činidla působící proti biofilmu, byly extrahovány a analyzovány přírodní produkty z nesčetného množství rostlin a mořských živočichů. Mnohé z těchto sloučenin jsou sekundárními metabolity, generované produkčním organismem jako odpověď na vnější vlivy, jako je konkurenční boj o prostor a potenciální predátoři (Stowe a kol., 2011). Přírodní produkty mohou mít vliv na tvorbu biofilmu ve všech fázích a rovněž mohou interagovat se zralým biofilmem. Mohou ovlivňovat fyzikálně-chemické vlastnosti prostředí (např. povrchové napětí) a také strukturu vrstev buněk adheřujících k povrchu. Přírodní látky jsou schopny velmi účinně modulovat tvorbu biofilmu na úrovni regulačních systémů (Řezanka a kol., 2012).

### **2.2 Quorum sensing**

Tvorba biofilmu je často řízena procesem zvaným quorum sensing (QS). QS umožňuje bakteriím změnit genovou expresi na základě hustoty populace (Worthington a kol., 2012). Komunikace mezi bakteriemi je zprostředkována produkcí, difúzí, detekcí a odpovědí na chemické signální molekuly známé jako autoinduktory. Chemické signály v prostředí buněk řídí regulační mechanismy tvorby biofilmu a vývoje nového fenotypu mikroorganismů (Řezanka a kol., 2012). Regulace exprese genů pro virulenci je u mnoha patogenních bakterií rovněž závislá na systému QS (Jha a kol., 2013). Bakterie využívají několik QS systémů. QS systém je u gramnegativních bakterií realizováno sadou dvou proteinů. První protein je zodpovědný za produkci signální molekuly, obvykle označována jako autoinduktor (AI), zatímco druhý protein reaguje s autoinduktorem. Autoinduktory jsou řazeny do několika tříd podle sdílených molekulárně biologických vlastností. Tyto skupiny zahrnují N-acyl-homoserinové laktony (AHL), autoindukující peptidy (AIP) a autoinduktor-2 (AI-2) (Worthington a kol., 2012). Gramnegativní bakterie používají zejména LuxR/I-typ QS systému, zatímco grampozitivní bakterie využívají primárně oligopeptidové signalizační systémy (Chong-Lek Koh a kol., 2013).

### **2.3 N-acyl-homoserinové laktony (AHL)**

N-acyl-homoserin laktony (AHL) jsou běžnými signálními molekulami (autoinduktory) gramnegativních bakterií (Řezanka a kol., 2012). Postranní řetězec je tvořen čtyřmi až

osmnácti atomy uhlíku (Řezanka a kol., 2012). Jedná se o biologicky aktivní L-izomery (Worthington a kol., 2012).

AHL molekuly regulují tvorbu EPS a podílejí se na regulačních mechanismech faktorů virulence a syntéze rhamnolipidů (povrchově aktivních látek). Dále tyto AHL molekuly regulují tvorbu struktur - pilů a bičíků, které mají přímý vliv na tvorbu biofilmu. Molekuly AHL byly předmětem řady studií pro návrh možných inhibitorů biofilmů za posledních třicet let (Worthington a kol., 2012).

## **2.4 *Pseudomonas aeruginosa***

Rod *Pseudomonas* zahrnuje velké množství druhů, se kterými se můžeme setkat jak v biotechnologických procesech, tak v roli vážných lidských nebo rostlinných patogenů. *Pseudomonas* snadno vytváří biofilm na různém typu povrchu (Masák a kol., 2014). Samotný vývoj biofilmu *P. aeruginosa* je závislý na zdroji uhlíku. (Klausen a kol., 2003). Biofilm *P. aeruginosa* v tekoucí vodě se vyznačuje heterogenní strukturou s houbovými mikrokoloniemi při využití glukózy jako zdroje uhlíku (Stewart a kol., 1993). Pokud byl použit jako zdroj uhlíku citrát, biofilmy byly hladké, jednotné a hustší (Heydorn a kol., 2002).

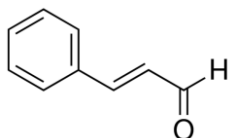
Bakterie *P. aureginosa* patří k nejlépe prostudovaným z rodu *Pseudomonas*. Jsou u ní známy tři vzájemně propojené QS systémy. Dva systémy využívají acyl-homoserinové laktony a třetí využívá signalizační molekulu, která má charakter chinolonu (Jakobsen a kol., 2013). U *P. aeruginosa* existují systémy proteinů LuxI a LuxR (LasI a LasR) pro syntézu a odpověď na přítomnost AHL. N-butanoyl-homoserin lakton (C4-AHL, pro *rhl* systém) a 3-oxo-C12-AHL (pro systém *las*) patří k nejdůležitějším molekulám AHL zodpovědných za QS (Worthington a kol., 2012). Oddělení jednotlivých buněk nebo celých bloků biofilmu může být způsobeno podmínkami prostředí (střížnými silami, chemickými podmínkami atd.) nebo je řízeno regulačními mechanismy mikrobiálních populací. Biofilmy *P. aureginosa* tvořené mukoidními kmeny mohou být fatální pro pacienty s cystickou fibrózou. Důležitou složkou biofilmové matrix je alginát. Také jiné druhy rodu *Pseudomonas* využívají biofilmový růst, který jim umožňuje kolonizovat různá prostředí a půdní matrice, rostliny, tkáň atd. (Masák a kol., 2014).

## **2.5 Látky s anti-biofilmovou aktivitou**

### **2.5.2 Cinnamaldehyd**

Esenciální olej z *Cinnamomum cassia*, který se získává z rostlinných druhů také známých jako *China cinnamon*, je jedním z nejúčinnějších esenciálních olejů ve smyslu

inhibice růstu mikroorganismů (Oussalah a kol., 2007). Zajímavým rysem esenciálního oleje z kůry tohoto druhu je zvýšený obsah cinnamaldehydu (viz Obr. 1), což je fenylypropanoid s vysokou biologickou aktivitou (Ooi a kol., 2006; Gill a kol., 2006).

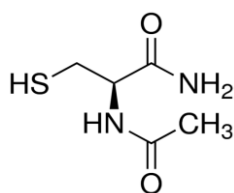


Obr. 1 Cinnamaldehyd

Cinnamaldehyd má antipatogenní potenciál a působí proti řadě grampozitivních a gramnegativních bakterií (Bowles a kol., 1995). Cílem mnoha antibakteriálních látek je narušit cytoplazmatickou membránu. Interakce bakteriálních membrán s biocidy často způsobují zásadní změny ve struktuře a funkci membrány (Dennyer, 1990). Pokud dojde k poškození membrány, uvolní se intracelulární enzymy ven z buňky. Hamera a Heel (2012) sledovali změny membránové polarity a propustnosti u *S. aureus*, *S. epidermidis* a *E. faecalis* po expozici cinnamaldehydem. Výsledky této studie ukazují, že cinnamaldehyd mění vlastnosti membrány snížením polarity a zvýšením propustnosti v závislosti na čase a koncentraci. Možnost, že cinnamaldehyd proniká do buněk prostřednictvím porinových proteinů procházejících vnější membránou, byla navržena týmem Helander a kol. (1998). Některé další zprávy naznačují, že cinnamaldehyd inhibuje ATPasovou aktivitu membrány (Bhatia a kol., 2012). Inhibice enzymu může hrát významnou roli při snížení míry růstu při subletálních koncentracích (Gill a Holly, 2006). Cinnamaldehyd jako přírodní lék má nízkou toxicitu a mikroorganismy nejsou tak náchylné k tvorbě rezistencí vůči této přírodní látce. Je také efektivní z hlediska nákladů, a proto byl navrhnout jako antimikrobiální činidlo pro ošetření biofilmové infekce (Jia a kol., 2011).

### 2.5.3. N-acetylcystein

N-acetylcystein (Obr. 2) je z chemického hlediska thiol a je antioxidačním a mukolytickým činidlem (Stey a kol., 2000). N-acetylcystein je široce využíván k léčbě cystické fibrózy, kdy narušuje intramolekulární vazby polymeru hlenu a tím snižuje viskozitu a elasticitu hlenu. (Smyth a kol., 2013). Díky přítomnosti sulfhydrylové skupiny dochází k redukci disulfidických můstků proteinů hlenu (Špičák a kol., 2008).



Obr. 4 N-acetylcystein

N-acetylcystein je přírodní látka, která má antimikrobiální vlastnosti a účinně redukuje biofilmové seskupení lékařsky významných gram pozitivních a gram negativních bakterií včetně *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* (Perez-Giraldo a kol., 1997). Je schopen zvýšit terapeutickou aktivitu některých antimikrobiálních látek, jako jsou ciprofloxacín a tigecyklin proti tvorbě bakteriálních biofilmů (El-Feky a kol., 2009). Bylo zjištěno, že N-acetylcystein účinně narušuje zralé biofilmy. N-acetylcystein je schopen narušit biofilm pravděpodobně vzhledem k jeho účinku na produkci exopolysacharidů (EPS). Sulfhydrylová skupina N-acetylcysteinu je schopna rozrušit disulfidové vazby bakteriálních enzymů, které se podílejí na produkci EPS nebo na reakci thiol-disulfidové výměny. NAC může v důsledku své antioxidační aktivity nepřímo ovlivnit metabolismus buněk bakterií a produkci EPS (Perez-Giraldo a kol., 1997).

### 3. Literatura

- Bhatia R., Shreaz S., Khan N., Muralidhar S., Basir S. F., Manzoor N. (2012) Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. *Journal of Basic Microbiology*, 52, str. 504-512.
- Bowles B. L., Sackitey S. K., Williams A. C. (1995) Inhibitory effects of flavour compounds on *Staphylococcus aureus* WRRC B124. *Journal of Food Safety*, 15, str. 337-347.
- Bryers J. D. (2008) Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 100, str. 1-18.
- Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, str. 1318-1322.
- Denyer S. P. (1990) Mechanisms of action of biocides. *International Biodeterioration*, 26, str. 89-100.
- El-Feky M. A., El-Rehewy M. S., Hassan M. A., Aboulella H. A., Abd El-Baky R. M., Gad G. F. (2009) Effect of ciprofloxacín and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. *Polish Journal of Microbiology*, 58 (3), str. 261-267.
- Gill A. O., Holley R. A. (2006) Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 111, str. 170-174.
- Hammera K. A., Heel K. A. (2012) Use of multiparametr flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in staphylococci and enterococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, str. 239 - 245.
- Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J. (1998) Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, str. 3590-3595.
- Heydorn A., Ersbøll B., Kato J., Hentzer M., Parsek M., Tolker-Nielsen T., Givskov M., Molin S. (2002) Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: Impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, str. 2008-2017.
- Fanning S., Mitchel A. P. (2010) The Fungal Pathogen *Candida albicans*. *American Society for Microbiology*, 46, str. 751-758.



- Jakobsen T. H., Bjarnsholt T., Jensen P. O., Givskov M., Høiby N. (2013) Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors. *Future Microbiology*, 8, str. 901–921.
- Jha B., Kavita K., Westphal J., Hartmann A., Schmitt-Kopplin P. (2013) Quorum sensing inhibition by *Asparagopsis taxiformis*, a marine alga: Separation of the compound that interrupts bacterial communication. *Marine Drugs*, 11 (1), str. 253-265.
- Jia P., Xue Y. J., Duan X. J., Shao S. H. (2011) Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 53 (4), str. 1-8.
- Klausen M., Heydorn A., Ragas P., Lambertsen L., Aaes-Jørgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), str. 1511-1524.
- Koh Ch. L., Sam Ch. K., Yin W. F., Tan L. Y., Krishnan T., Chong Y. M., Chan K. G. (2013) Review Plant-Derived Natural Products as Sources of Anti-Quorum Sensing Compounds. *Sensors*, 13, str. 6217-6228.
- Masák J., Čejková A., Schreiberová O., Řezanka T. (2014) Minireview *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their kontrol. *FEMS Microbiology Ecology*, 89, str. 1-14.
- Norizan S. N. M., Yin W-F., Chan K-G. (2013) Caffeine as a Potential Quorum Sensing Inhibitor. *Sensors*, 13, str. 5117-5129.
- Ooi L. S. M., Li Y., Kam S. L., Wang H., Wong E. Y. L., Ooi V. E. C. (2006) Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal Herb *Cinnamomum cesia* Blume. *The American Journal of Chinese Medicine*, 34, str. 511–522.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L. Lacroix M. (2007) Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, str. 414–420.
- Perez-Giraldo C., Rodriguez-Benito A., Moran F., Hurtado C., Blanco M. T., Gomez-Garcia A. C. (1997) Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39, str. 643–646.
- Stey C., Steurer J., Bachmann S., Medici T. C., Tramer M. R. (2000) The effect of oral N-acetyl-cysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review. *European Respiratory Journal*, 16, str. 253–62.
- Řezanka T., Čejková A., Masák J. (2012) Natural Products: Strategic Tools for Modulation of Biofilm Formation. In Atta-ur-Rahman, editor: *Studies in Natural Products Chemistry*, Amsterdam: The Netherlands, 38, str. 269 – 303.
- Smyth H. D. C., El-Sherbiny I., Jason M. (2013) Update on Polymers Drug Delivery. *Smithers Rapra Technology*, str. 261.
- Špičák J., Bureš J., Gurlich R., Leffler J., Lukáš M., Martínek J., Petrášek J., Rejchrt S., Šperl J., Tachecí I., Taimr P., Trunečka P., Urbánek P. (2008) Novinky v gastroenterologii a hematologii, str. 420.
- Stowe S. D., Richards J. J., Tucker A. T., Thompson R., Melander C., Cavanagh J. (2011) Review Anti-Biofilm Compounds Derived from Marine Sponges. *Marine Drugs*, 9, str. 2010-2035.
- Stewart P. S., Peyton B. M., Drury W. J., Murga R. (1993) Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, str. 327–329.
- Wilkins M., Hall-Stoodley L., Allan R. N., Faust S. N. (2014) New approaches to the treatment of biofilm-related infections. *Journal of Infection*, 69, str. 47-52.
- Worthington R. J., Richards J. J., Melander C. (2012) Small molecule control of bacterial biofilms. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10, str. 7457-7474.

## Vliv chitosanu na tvorbu a stabilitu biofilmu

Marková L., Kvasničková E., Čejková A.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### 1. Úvod

Kvasinky *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* a *Trichosporon cutaneum*, schopné růstu ve formě biofilmu, jsou více mechanicky odolné a rezistentní vůči běžně používaným antibiotikům, a proto jsou v posledních letech považovány za stále více virulentní. Největší riziko biofilmu kvasinek představuje jeho schopnost kolonizovat povrchy lékařských zařízení, jako jsou například umělé srdeční chlopně, kloubní náhrady a dlouhodobě zavedené nitrožilní katétry pro umělou výživu. V případě vzniku kandidóz na těchto lékařských zařízeních je mnohdy jedinou možností vyjmutí implantátu z těla pacienta. Léčba se tak mnohdy mnohonásobně prodlužuje, prohlubuje se trauma pacienta a celý proces je finančně nákladnější (Schindler, 2008; Kuhn a kol., 2002; Silva-Dias a kol., 2014, Samaranyake a kol., 1994a,b).

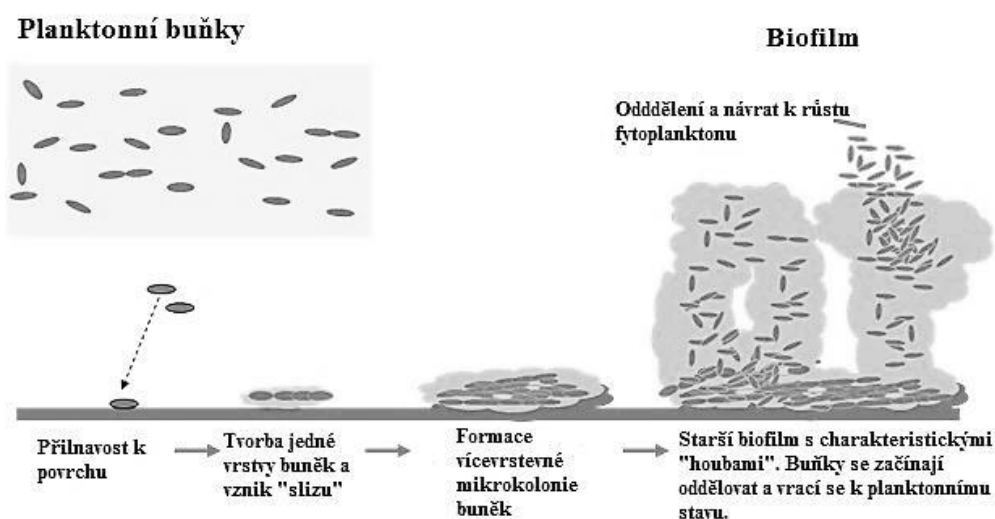
Kromě běžně dostupných antibiotik jsou jednou z možností ovlivnění tvorby a stability biofilmu přírodní látky, mezi které řadíme i chitosan. Jako přírodní biopolymer je zajímavý pro své antimikrobiální vlastnosti, netoxičnost a biologickou odbouratelnost v těle pacienta (Sinha a kol., 2004; Silva-Dias a kol., 2014).

### 2. Biofilm

Strukturu biofilmu tvoří buňky jednoho či více druhů jednobuněčných mikroorganismů tvořících komunitu připojenou k pevnému podkladu. Mohou růst v hříbových nebo kuželovitých mikrokoloniích, jenž jsou uzavřeny v exopolysacharidové matici (EPS) a jsou navzájem propojeny sítí kanálků (Thien-Fah a George, 2001; Flemming a Wingender, 2010; Schindler, 2008).

Biofilm vzniká náhodným přisednutím planktonní buňky na pevný povrch pomocí adhezínů, dochází ke změně fenotypu buňky a buňka začne produkovat EPS (Obr. 1). Kromě polysacharidů je matrice tvořena proteiny, nukleovými kyselinami a lipidy, které poskytují buňkám v biofilmu větší mechanickou stabilitu a tvoří soudržnou polymerní síť (Watnick a Kolter, 2000; Schindler, 2008). Při dlouhodobě nevyhovujícím životním podmínkám se mohou buňky v horní vrstvě biofilmu oddělit a kolonizovat jiný povrch (Watnick a Kolter,

2000). Růst ve formě biofilmu je pro buňky výhodný zejména pro větší odolnost buněk. U přírodních biofilmů exopolysacharidy zabraňují vysychání buněk a chrání tak kolonii před změnami vlhkosti (Sutherland, 2001).



Obr. 1: Vznik biofilmu (BioTuesday: BiofilmDevelopment. [online]. [cit. 2014-11-14]. Dostupné z:<http://biotuesdays.com/2010/10/19/innovotech-targets-personalized-medicine-for-bacteria/biofilm-development-4/> - upraveno)

### 3. Mikroorganismy způsobující kandidózy

Do rodu *Candida* je zahrnuta různorodá skupina jednobuněčných eukaryot čítající téměř 150 asporogenních kvasinek. Často jsou to neškodní komenzálové savců, ale některé druhy mohou být patogenní pro lidi s oslabenou imunitou (Samaranayake a kol., 1994b, Silva a kol., 2012). V laboratorních podmínkách se pro růst kolonií rodu *Candida* používá okrově žlutý SDA agar (Sabouraud-dextrose agar). Narostlé kolonie kvasinek mohou být v závislosti na druhu hladké, lesklé, suché, matné a při standardních podmínkách mohou vytvářet hyfy nebo pseudohyfy (Silva a kol., 2012).

*C. albicans* je typickým zástupcem kvasinky způsobující nozokomiální infekce u imunodeficientních pacientů a je v pořadí čtvrtou nejčastější příčinou těchto infekcí v nemocnicích. Roste jako typická kvasinka kulatého až vejčitého tvaru o velikosti 4 – 6  $\mu\text{m}$  a tvoří mikrokolonie o velikosti 2 – 4 mm. Je schopná se přizpůsobit řadě fyziologicky extrémních podmínek a kolonizovat širokou škálu anatomicky odlišných tkání. Řadí se proto mezi významné lidské patogeny způsobující závažné kandidózy. Nejvíce jsou ohroženi pacienti s oslabenou imunitou, jako například pacienti s onemocněním AIDS a novorozenci, kteří ještě nemají plně vyvinutý imunitní systém (Calderone a Fonzi, 2001, Ryan a kol., 2004,

Haynes, 2001). Rozvoj kandidózy je obvykle spojen se zavedením zdravotnického materiálu do těla pacienta, který slouží jako nosič pro tvorbu a růst biofilmu kvasinek (Chandra, 2001).

Další oportunně patogenní kvasinkou je *C. krusei*. Jedná se o kvasinku vejčitého tvaru, polodlouhé, proměnlivé velikosti od 2 do 15  $\mu\text{m}$ , připomínající tvar rýžového zrnka (Samaranayake a kol., 1994b). Dříve byla tato kvasinka považována za druh s nízkou virulencí, ale s rostoucím výskytem infekcí byla zařazena mezi oportunně patogenní mikroorganismy. Oproti *C. albicans* má tato kvasinka až 4x vyšší afinitu k akrylovým povrchům, k epiteliálním buňkám, a zároveň má vyšší potenciál k tvorbě biofilmu na katétu z polyvinylchloridu (Samaranayake a kol., 1994a).

*C. parapsilosis* je typicky vejčitého tvaru o velikosti buňky 2,5 – 4  $\mu\text{m}$ . Obdobně jako u předchozího druhu kvasinky, se zvýšil výskyt infekcí způsobených *C. parapsilosis*, která dříve nebyla považována za virulentní druh. Také se projevuje vysokou schopností kolonizovat povrch lékařských nástrojů, na kterých snadno vytváří biofilm (Silva a kol., 2012).

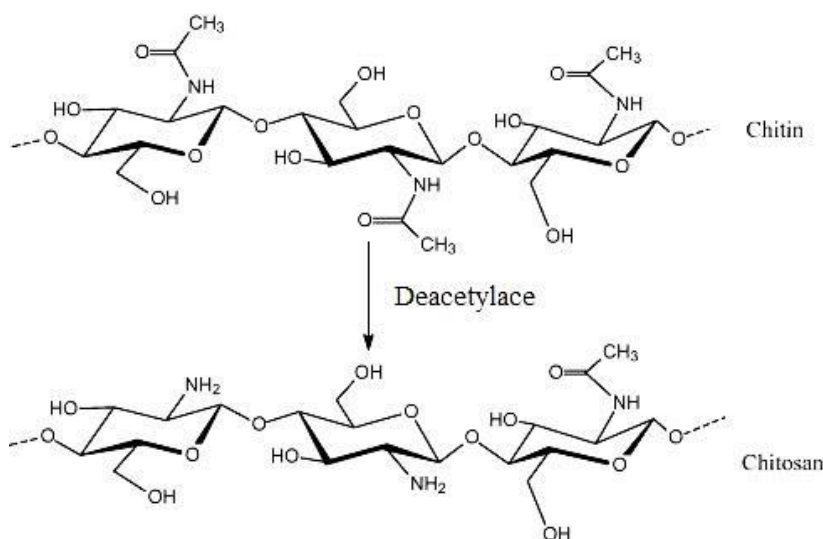
*T. cutaneum* je vláknitá kvasinka řadící se do rodu *Trichosporon*, který je fenotypově charakterizován tvorbou hyf, pseudohyf, blastokonídií, arthrokonídií a přítomností multilamelárních buněčných stěn (Colombo a kol., 2011; Sugita a kol., 1994). U imunodeficientních pacientů způsobuje kvasinka viscerální trichosporózu a proto byl *T. cutaneum* zařazen mezi oportunně patogenní mikroorganismy. U lidí je především původcem lidského bílého píedra, povrchní mykózy ve vlasech (Colombo a kol., 2011, Evans a kol., 1980; Sugita a kol., 1994).

#### 4. Chitosan (poly-D-glukosamin)

Jedná se o přírodní polymer polysacharidového typu, odvozený od chitinu (v přírodě druhý nejrozšířenější polysacharid po celulóse), který je hlavní součástí schránek korýšů. Přirozeně se chitosan vyskytuje jen u pár druhů hub rodu *Aspergillus* a *Mucor*, jako součást jejich buněčné stěny. Průmyslově se získává alkalickou deacetylací chitinu (Obr. 2) nebo enzymatickou hydrolýzou v přítomnosti chitinové deacetylázy (Vavřínková a Vinšová, 2009; Sinha a kol., 2004).

Chitin se vyznačuje především svou biologickou aktivitou, netoxičností, biokompatibilitou, a dále svou schopností cíleného podávání léčiva, kde figuruje jako biodegradabilní nosič účinné látky. Mezi jeho další přínosy patří obecně posílení imunity, kancerostatická a hypocholesterolemická aktivita (podpora absorpce vápenatých a železitých iontů) a v zažívacím traktu působí obdobně jako vláknina. Z tohoto důvodu mu jsou mimo

jiné přisuzovány i významné účinky na redukci váhy, které ovšem nebyly dosud vědecky prokázány (Vavřínková a Vinšová, 2009).



Obr. 2: Vznik chitosanu alkalickou deacetylací chitinu (IOP Science: Somebiomedicalapplicationsofchitosan-based hybrid nanomaterials. [online]. [cit. 2014-012-13]. Dostupné z: <http://iopscience.iop.org/2043-6262/2/4/045004/fulltext/>)

Po chemické stránce je chitosan (1→4)-2-amino-deoxy-β-D-glukan N-deacetylovaný derivát chitinu. Tento kopolymer je složený z glukosaminových a N-acetylglukosaminových jednotek a jeho molekula obsahuje tři typy reaktivních funkčních skupin: primární aminoskupiny na poloze C – 2, primární hydroxyskupinu na poloze C – 3 a jednu sekundární hydroxyskupinu na poloze C – 6. Díky volným aminoskupinám a jejich snadné dostupnosti nese celá molekula chitosanu kladný náboj, zároveň je slabě zásaditá, nerozpustná ve vodě i v organických rozpouštědlech. Je však rozpustná ve zředěných vodných roztocích při pH <6,5, ve kterých dochází ke konverzi glukosaminových jednotek na rozpustné R–NH<sub>3</sub><sup>+</sup> (Vavřínková a Vinšová, 2009; Sinha a kol., 2004; Xia a kol., 2011).

Chitosan je pro své významné vlastnosti vhodný jako přídavek do biomedicínských a farmaceutických přípravků, například s hypobilirubinémickými a hypocholesterolemickými účinky, dále jako antacida a antiulcerika, na hojení popálenin, pro immobilizaci enzymů a živých buněk a v oftalmologii (Sinha a kol., 2004). Kromě toho má chitosan další biologické účinky, kdy napomáhá vylučování toxinů ze střev, snižuje otravu těžkými kovy, vykazuje radioprotektivní vlastnosti a reguluje mikrobiální metabolismus ve střevech (Xia a kol., 2011).

Mechanismus antimikrobiální aktivity chitosanu spočívá v jeho mukoadhezivní vlastnosti, kdy v důsledku molekulární přitažlivé síly vznikající elektrostatickou interakcí se

pozitivně nabitě molekuly chitosanu váží na negativně nabitě slizniční povrchy mikroorganismů (Sinha a kol., 2004). Předpokládá se, že kladně nabitě chitosanové částice interagují s negativně nabitými buněčnými membránami kvasinek. Snížení buněčného metabolismu kvasinek vede k rozrušení buněčné stěny, tvorbě pórů, úniku intracelulárních iontů a v konečném důsledku k buněčné smrti. Druhá teorie možného mechanismu ovlivnění biofilmu chitosanem zahrnuje jeho pronikání do jádra kvasinky, jeho vazbu na DNA a inhibici RNA-syntézy se zjevnými následky na buněčný metabolismus (Silva-Dias a kol., 2014). Dále je antimikrobiální aktivita závislá na molekulové hmotnosti chitosanu a rozpouštědla. Je nepřímo ovlivněna hodnotou pH, kdy při nižším pH vykazuje chitosan vyšší antimikrobiální aktivitu, tudíž nejlepších antimikrobiálních účinků dosahuje v kyselém prostředí (Qi a kol., 2004; Xia a kol., 2011).

## 5. Amfotericin B

Poprvé bylo toto polyenové makrolidové antibiotikum izolováno v roce 1995 z mikroorganismu *Streptomyces nodosus* (Volmer, 2009). Je to silné antimykotické antibiotikum s širokým spektrem působení. Jeho mechanismus účinku spočívá ve vysoké afinitě k ergosterolu vyskytující se převážně v buněčné stěně hub. Amfotericin B s ergosterolem vytváří komplex polyenů a sterolů a tvoří kanálky v buněčné membráně, jimiž dochází ke ztrátě malých molekul a iontů. Kromě ergosterolu má amfotericin B v menší míře afinitu i k cholesterolu, který je obsažen v savčích buněčných membránách. Proto se u amfotericinu B vyskytují závažné nežádoucí účinky na organismus pacienta (především nefrotoxicita) při jeho dlouhodobém užívání. Při léčbě může být amfotericin B podáván systémově i lokálně, ale jeho systémové využití je omezeno jeho toxicitou související s terapeutickou dávkou a nízkou rozpustností antibiotika ve vodě (Caffrey a kol., 2001; Gauwerky a kol., 2009). U léčby kandidózy způsobené kvasinkou *C. krusei* je antibiotikum amfotericin B dodnes lékem první volby a jedná se o obecně nejdéle používané antimykotikum. U ostatních kandidóz se dělí o prioritu v léčbě s flukonazolem (Zazula a kol., 2005).

## 6. Závěr

Na základě těchto poznatků lze konstatovat, že chitosan je potenciálně alternativní látkou pro léčbu rozsáhlých kandidóz, a dalších infekcí způsobených biofilmy mikrobiálních hub, která by mohla nahradit značně nefrotoxické, komerčně dostupné a dlouho používané antibiotikum amfotericin B. Další variantou je využití vzájemného synergistického působení obou látek za účelem potencionálního snížení terapeutických dávek amfotericinu B v

kombinaci s chitosanem, čímž by bylo docíleno výrazného snížení nežádoucích účinků amfotericinu B na lidský organismus.

## 7. Literatura

- Caffrey P., Lynch S., Flood E., Finnan S., Oliynyk M. (2001) Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem Biol*, 8, str. 713 – 723.
- Calderone R. A., Fonzi W. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 9, str. 327 – 335.
- Colombo A. L., Padovan A. C. B., Chaves G. M. (2011) Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev*, 24, str. 682 – 700.
- Evans H. L., Kletzel M., Lawson R. D., Frankel L. S., Hopfer R. L. (1980) Systemic mycosis due to *Trichosporon cutaneum*. A report of two additional cases. *A cancer soc*, 45, str. 367 – 371.
- Flemming H. C., Wingender J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8, str. 623-633.
- Gauwewerky K., Borelli C., Korting H. C. (2009) Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. Elsevier Science Publisher, 14, str. 214 – 222.
- Chandra J., Kuhn D. M., Mukherjee P. K., Hoyer L. L., McCormick T., Ghannoum M. A. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*, 183, str. 5385 – 5394.
- Kuhn D. M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. (2002) Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*, 70, str. 878-888. 73
- Qi L, Xu Z., Jiang X., Hu C., Zou X. (2004) Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Res*, 339, str. 2693-2700.
- Ryan K. J. (2004) *Candida*, *Aspergillus* and other opportunistic fungi (Sherris medical microbiology: an introduction to infection disease. New York: McGraw-Hill, str. 659 – 663. ISBN 0838585299.
- Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P. (1994b) *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol*, 41, str. 295-310.
- Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P., SO M., Yuen K.Y., Wu P.C. (1994a) Adhesion and colonisation of *Candida krusei* on host surfaces. *J Med Microbiol*, 41, str. 250-258.
- Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D. W., Azeredo J. (2012) *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 36, str. 288-305.
- Silva-Dias A., Palmeira-de-Oliveira A., Miranda I.M., Branco J., Cobrado L., Monteiro-Soares M., Queiroz J.A., Pina-Vaz C., Rodrigues A.G. (2014) Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. *Med Microbiol Immunol*, 203, str. 25-33.
- Sinha V.R., Singla A.K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R., Bansal K., Dhawan S. (2004) Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharmaceut*, 274, str. 1-33. 75
- Sugita T., Nishikawa A., Shinoda T. (1994) Reclassification of *Trichosporon cutaneum* by DNA relatedness by the spectrophotometric method and the chemiluminometric method. *J Gen Appl Microbiol*. 40, str. 397 – 408.
- Sutherland I.W. (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky Framework. *Microbiol Mini-Rev*, 147, str. 3-9.
- Thien-Fah C. M., George A. O. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 9(1), str. 34-39.
- Vavřínková E., Vinšová J. (2009) Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chem. Listy*, 103, str. 56-65.
- Volmer A. A., Szpilman A. M., Carreira E. M. (2009) Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. *Nat Prod Rep*, 27, str. 1329 – 1349.
- Watnick P., Kolter R. (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*, 182, str. 2675-2679.
- Xia W., Liu P., Zhang J., Chen J. (2011) Biological activities of chitosan and chitoooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25, str. 170-179.
- Zazula R., Schindler I., Spálený A., Vašáková M., Dutka J. (2005) Současný pohled na mykotické plicní infekce. *Interní medicína pro praxi*, 7, str. 349 – 353.

## Vliv rhamnolipidů na tvorbu a stabilitu biofilmu na titanových materiálech

T. Vučková, R. Ježdík, J. Masák

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

### Abstrakt

Hlavním problémem v oblasti transplantační medicíny jsou infekce, které zpomalují hojení ran a prodlužují tak rekonvalescenci pacientů. Jedním z patogenů, které způsobují tyto infekce je mimo jiných *Staphylococcus epidermidis*. K léčbě těchto infekcí se v současnosti nejčastěji používají antibiotika. Jejich alternativou nebo aditivní složkou léčiva mohou být v budoucnu biosurfaktanty.

Tato práce se věnuje vlivu rhamnolipidů na tvorbu a stabilitu biofilmu *S. epidermidis* na titanových materiálech. Byly použity rhamnolipidy produkované dvěma kmeny bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (DBM 3777 a DBM 3775). Byly prováděny kultivace na titanových materiálech a následná kvantifikace adherovaných buněk probíhala spektrofotometrickými metodami s MTT a krystalovou violetí.

### 1. Úvod

*S. epidermidis* je  $G^+$  kokovitá bakterie osidlující převážně aerobní prostředí. V hojně míře ji nalezneme na kůži a sliznicích člověka (obličej, končetiny, vlasové folikuly), kde je původcem řady infekcí především u imunosuprimovaných pacientů (infekce katetrů, umělých chlopní, kloubních náhrad) (Ziebuhr *et al.*, 2006). K léčbě těchto infekcí jsou používány antimikrobiální látky, převážně antibiotika. Jejich alternativou mohou být biosurfaktanty, jejichž potenciál a využití v posledním desetiletí značně vzrostl.

Rhamnolipidy jsou biosurfaktanty bakteriálního původu s významnou antimikrobiální aktivitou. Jejich struktura má amfifilní charakter. Obsahuje hydrofobní část nejčastěji složenou z 1 nebo 2 molekul rhamnosy a hydrofobní část obsahující 1 nebo 2 molekuly  $\beta$ -hydroxymastných kyselin. Jsou produkovány vždy jako směs kongenerů a jejich hlavním producentem je bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Jsou schopné působit na lipidové složky buněčné membrány nebo na vnější proteiny, čímž způsobují strukturální změny v membráně vedoucí k inhibici růstu. Působí především proti  $G^+$  bakteriím a některým kvasinkám a jejich



hlavní výhodou je jejich nízká akutní toxicita (Lovaglio *et al.*, 2015).

Práce navazuje na předešlou studii věnovanou adhezi rhamnolipidů na titanové materiály, kde byly sledovány závislosti koncentrace a času na adhezi rhamnolipidů na povrch materiálu. Testován je vliv rhamnolipidu na tvorbu a stabilitu biofilmu oportunně patogenního mikroorganismu *Staphylococcus epidermidis* DBM 3179. Byly použity rhamnolipidy produkované bakteriálními kmeny *P. aeruginosa* DBM 3777 a *P. aeruginosa* DBM 3775. Byly stanoveny hodnoty jejich MIC a provedeny kultivace v koncentrační závislosti rhamnolipidů. Vytvořený biofilm byl kvantifikován spektrofotometrickými metodami založenými na barvivech MTT a krystalová violet.

## 2. Materiál a metody

### 2.1 Biosurfaktant

Rhamnolipidy použité v této práci byly připraveny pomocí bakterií *P. aeruginosa* DBM 3777 (RL A) a *P. aeruginosa* DBM 3775 (RL B) v laboratoři Biotechnologie, Ústav Biotechnologie, VŠCHT Praha.

### 2.2 Použité roztoky

**Roztok MTT** byl připraven rozpuštěním MTT ve sterilním PBS v koncentraci 1 mg/ml. Připravený roztok byl filtrován membránovou filtrací (porozita 0,2 $\mu$ m).

**Roztok glukózy** byl připraven rozpuštěním bezvodné glukózy ve sterilní PBS v koncentraci 57,4 g/l.

**Vymývací roztok pro MTT** byl připraven smícháním čistého DMF s 2% kyselinou octovou v PBS (v poměru 4 díly DMF a 6 dílů 2% kyseliny octové). Následně bylo v tomto roztoku rozpuštěno SDS, aby koncentrace výsledného roztoku byla 160 g/l. Nakonec bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 4,7 pomocí kyseliny octové, resp. hydroxidu sodného.

### 2.3 Mikroorganismy

V této práci byl při kultivacích použit mikroorganismus *Staphylococcus epidermidis* DBM 3179 (Sbírka mikroorganismů Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha). Kultura je uchovávána ve formě kryokonzerv při teplotě -70 °C.

### 2.4 Růstové médium a podmínky růstu

Buňky *S. epidermidis* byly kultivovány v TSB médiu. Inokulum bylo připraveno zaočkováním kryokonzervy do 100 ml TSB média v 250 ml Erlenmeyerově baňce a kultivováno 24 hodin při teplotě 37 °C a 100 min<sup>-1</sup>.

Kultivace na titanových materiálech byly prováděny ve 3 ml inokula o koncentraci  $OD_{600} = 0,6$  za stejných kultivačních podmínek, po dobu 72 hodin.

## 2.5 Titanové materiály

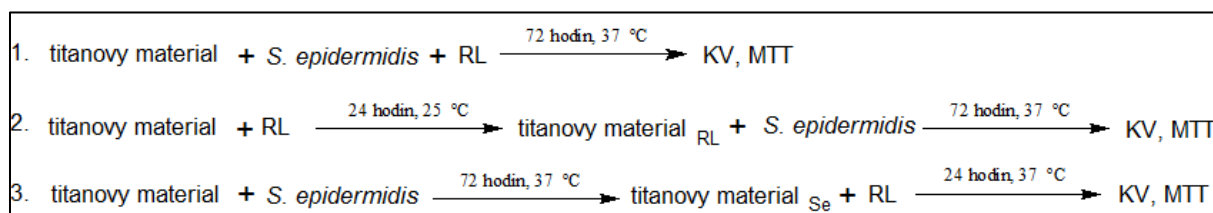
Pro simulaci povrchu kloubních náhrad byly použity titanové žetony vyrobené ze slitiny  $Ti_6Al_4V$ . Stejná slitina se běžně používá při výrobě titanových kloubních náhrad. Žetony mají průměr 16 mm a tloušťku 1,75 mm (firma ProSpon).

## 2.6 Metody kultivací

Kultivace na titanových materiálech byly prováděny 3 metodami (viz. Obr. 1) – inhibice adheze buněk, prekondicionace titanového materiálu rhamnolipidy a eradikace adherovaných buněk. Při inhibici adheze bylo do buněčného inokula přidáno dané množství rhamnolipidu a dále probíhala kultivace dle podmínek výše.

U prekondicionace byly nejprve titanové žetony ponořeny na 24 hodin do roztoku rhamnolipidu o koncentraci 200 mg/l. Žetony byly poté sušeny v sušárně při 40 °C po dobu 30 minut. Takto upravené žetony byly vloženy do 3 ml inokula. Dále probíhala kultivace dle podmínek výše.

Při eradikaci adherovaných buněk byly titanové žetony vloženy do 3 ml inokula a po 72 hodinách růstu *S. epidermidis* byly žetony šetrně opláchnuty roztokem PBS tak, aby nedošlo k odstranění adherovaných buněk. Opláchnuté žetony byly následně vloženy na 24 hodin do roztoků RL o daných koncentracích.



**Obr. 1:** Metodiky kultivací na titanových materiálech

## 2.7 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC)

MIC je nejnižší koncentrace biologicky aktivní látky, která prokazatelně inhibuje růst mikroorganismu po 24hodinové inkubaci. Toto stanovení se používá k určení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám.

Inokulum bylo připraveno zaočkováním kryokonzervy *S. epidermidis* do 100 ml média v 250ml Erlenmeyerově baňce. Kultivace probíhala při 37 °C a 100 otáčkách za minutu po dobu 24 hodin. Po této době byly buňky odstředěny a bylo připraveno inokulum tak, aby v každé jamce mikrotitrační destičky byla koncentrace biomasy odpovídající  $OD_{400} = 0,2$ .

MIC byla stanovena v přístroji Bioscreen C na mikrotitrační destičce. Do každé jamky bylo pipetováno médium, inokulum a rhamnolipid o dané koncentraci. Stanovení bylo provedeno v 5 paralelách pro každou koncentraci. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin. Absorbance v bílém světle (420 – 580 nm) byla měřena každých 30 minut.

## **2.8 Metoda barvení pomocí krystalové violeti**

Pro stanovení obsahu celkové biomasy buněk adherovaných na povrch titanového materiálu byla použita metoda barvení pomocí krystalové violeti.

Vazbou na negativně nabitě molekuly dochází k obarvení. Toto zabarvení se následně kolorimetricky stanovuje měřením absorbance při 580 nm.

Do čistých plastových vzorkovnic byl pipetován 1 ml roztoku PBS a 250 µl roztoku krystalové violeti (0,1% (hm.)). Žeton s biofilmem byl opatrně opláchnut 1 ml roztoku PBS. Následně byl vložen do vzorkovnice s připraveným roztokem krystalové violeti a inkubace probíhala 20 min při laboratorní teplotě. Žeton byl poté opláchnut 1 ml roztoku PBS a vložen do čisté vzorkovnice s 2 ml ethanolu (96%) pro uvolnění barviva a opět ponechán 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě.

Po této době bylo 100 µl roztoku pipetováno na mikrotitrační destičku pomocí automatického readru byla stanovena koncentrace barviva (580 nm).

## **2.9 Metoda MTT**

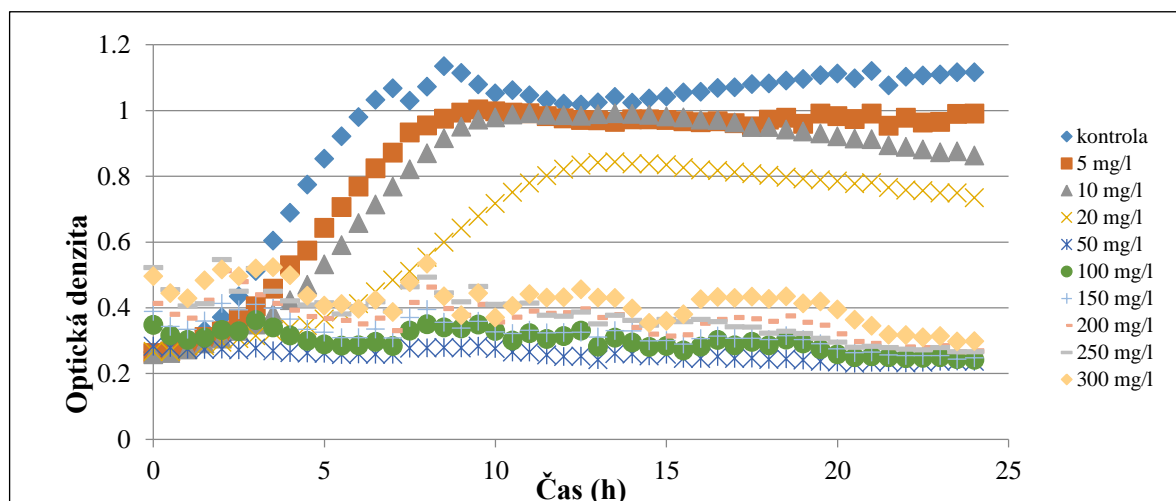
Ke stanovení množství životaschopných adherovaných buněk byla použita metoda MTT. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid) je žlutá sůl, která je metabolicky aktivními buňkami redukována na fialový produkt – formazan, který lze stanovit spektrofotometricky (570 nm).

Do vzorkovnic bylo pipetováno 275 µl roztoku glukózy a 225 µl roztoku MTT. Opláchnuté žetony (1 ml roztoku PBS) byly vloženy do vzorkovnic. Vzorkovnice byly třepány ve tmě po dobu 2 hodin na rotační třepačku (37 °C při 150 min<sup>-1</sup>). Po této době bylo do vzorkovnic přidáno 500 µl vymývacího roztoku, čímž došlo k rozpuštění krystalků formazanu. Vzorkovnice byly opět inkubovány 30 minut při 37 °C a 150 min<sup>-1</sup>. Po inkubaci byla v roztoku stanovena koncentrace barviva.

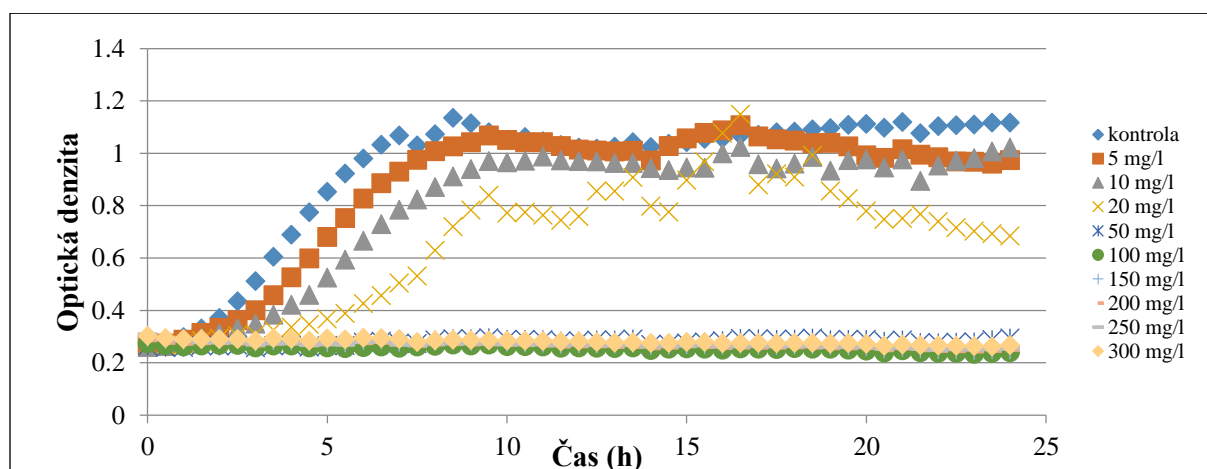
### 3. Výsledky

#### 3.1 Stanovení MIC

Byla stanovena MIC u rhamnolipidů produkovaných pomocí *P. aeruginosa* DBM 3777 (RL A) a *P. aeruginosa* DBM 3775 (RL B). Výsledky jsou znázorněny na obrázcích 1 a 2. Pro oba použité rhamnolipidy byla stanovena MIC na 50 mg/l.



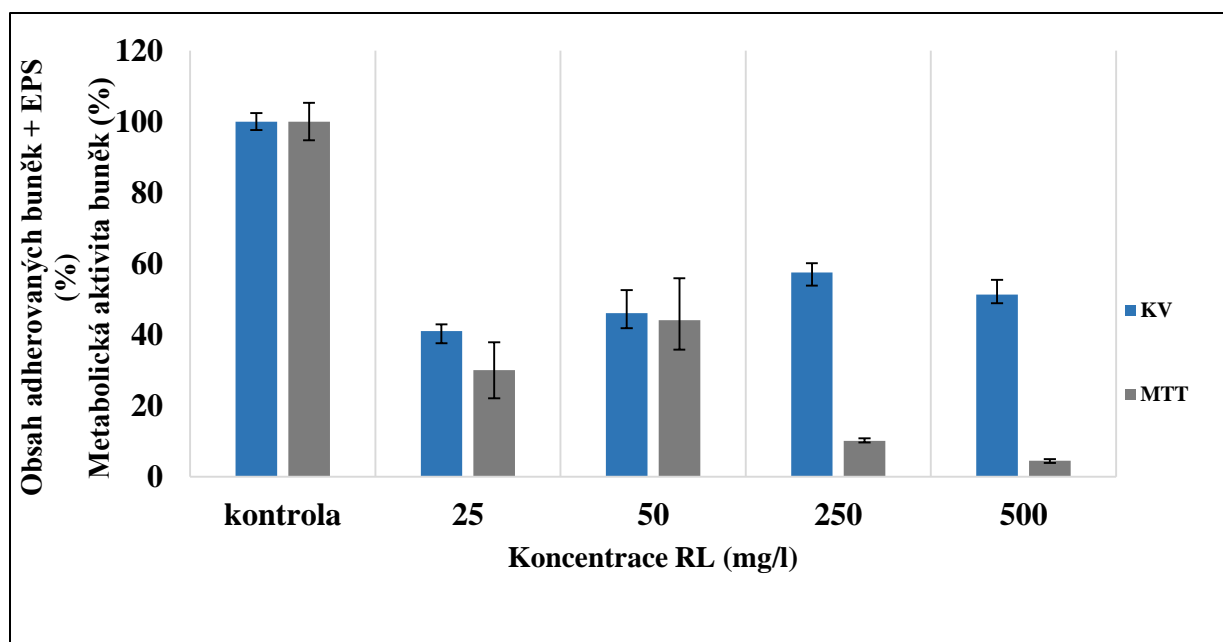
Obr. 1: Stanovení MIC RL *P. aeruginosa* DBM 3777 pro *S. epidermidis*



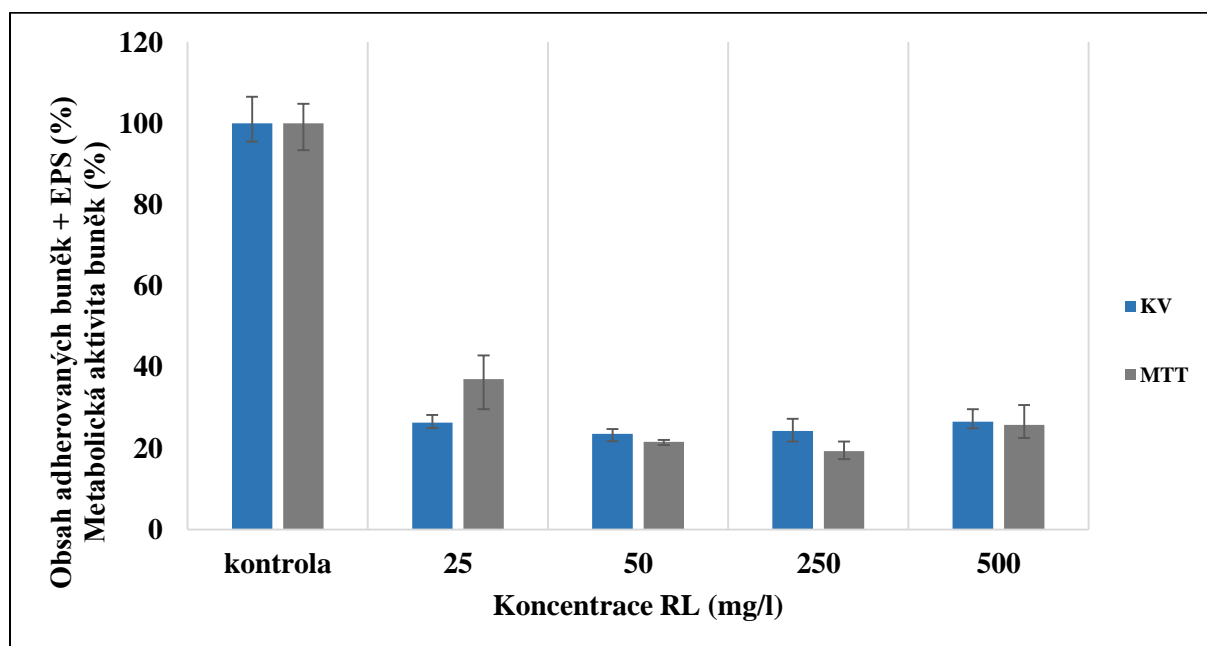
Obr. 2: Stanovení MIC RL *P. aeruginosa* DBM 3775 pro *S. epidermidis*

#### 3.2 Inhibice adheze buněk na titanové materiály

Množství adherované biomasy a metabolická aktivita buněk byly stanoveny oproti kontrolnímu vzorku bez přídavku RL. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 3 a 4. Při přídavku daných koncentrací RL A nedocházelo k výrazné změně množství biomasy, ale došlo k výraznému snížení metabolické aktivity při koncentraci 500 mg/l. U RL B se opět výrazně neměnilo množství adherované biomasy, ale zároveň při koncentracích vyšších než MIC výrazně neklesala metabolická aktivita.



**Obr. 3:** Vliv koncentrace RL *P. aeruginosa* DBM 3777 na obsah adherované biomasy a metabolickou aktivitu *S. epidermidis*.

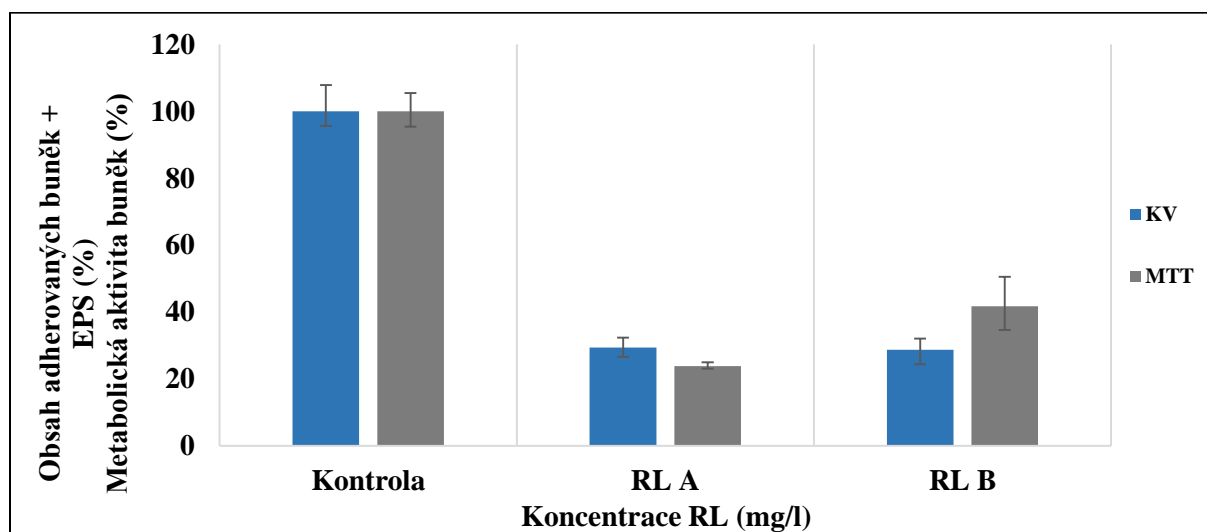


**Obr. 4:** Vliv koncentrace RL *P. aeruginosa* DBM 3775 na obsah adherované biomasy a metabolickou aktivitu *S. epidermidis*.

### 3.3 Prekondicionace povrchu titanového materiálu

Prekondicionace žetonů probíhala v roztocích RL o koncentraci 200 mg/l po dobu 24 hodin (koncentrace i doba adheze byla zvolena na základě předešlých měření, za těchto podmínek jsou na žetonu adherovány cca 4  $\mu$ g RL). Následně byly na vysušených žetonech prováděny kultivace a stanovováno množství adherované biomasy a metabolická aktivita

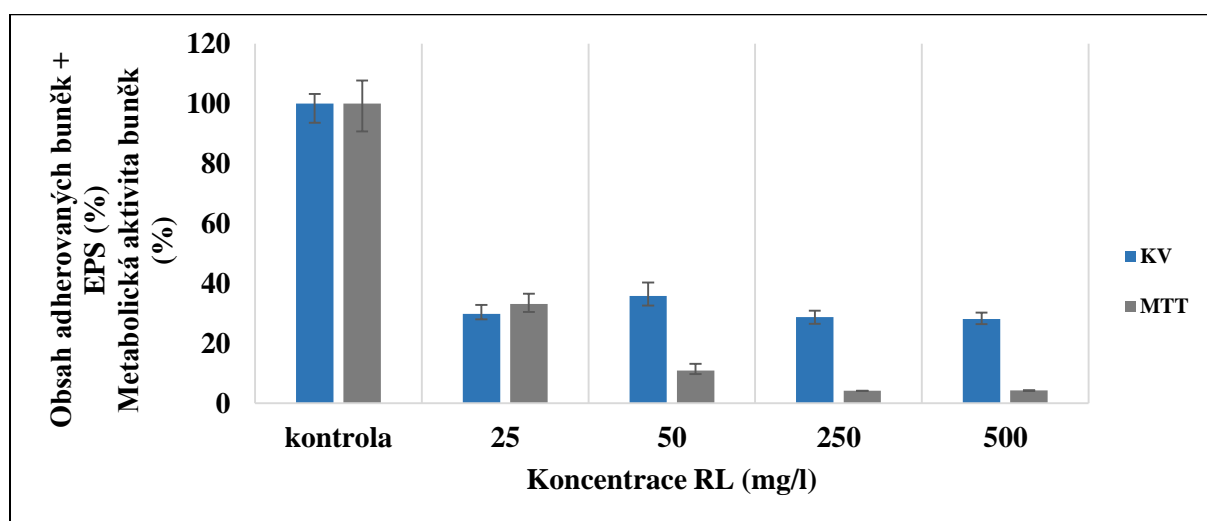
buněk. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 5. Množství adherované biomasy bylo po prekondicionaci pomocí dvou RL téměř identické, nižší metabolická aktivita buněk však byla naměřena u žetonů prekondicionovaných RL A.



**Obr. 5:** Vliv prekondicionace titanových žetonů RL *P. aeruginosa* na obsah adherované biomasy a metabolickou aktivitu buněk *S. epidermidis*.

### 3.4 Eradikace adherovaných buněk pomocí RL A

K eradikaci adherovaných buněk byl použit RL A. Eradikace probíhala v plastových vzorkovnicích s roztoky o daných koncentrací RL po dobu 24 hodin. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 6. Množství adherované biomasy se v rozmezí koncentrací výrazně neměnilo, oproti tomu metabolická aktivita výrazně poklesla při koncentracích RL 250 a 500 mg/l.



**Obr. 6:** Vliv koncentrace RL *P. aeruginosa* DBM 3777 na eradikaci biofilmu a metabolickou aktivitu buněk *S. epidermidis*.

#### 4. Závěr

V práci je dokumentován vliv množství a druhu přidaného RL na množství adherované biomasy na titanové materiály a metabolickou aktivitu adherovaných buněk za různých experimentálních podmínek. Výsledky ukázaly, že při přidavku RL do růstového média dochází k výraznému poklesu adherované biomasy i metabolické aktivity ve všech použitých koncentracích. Při inhibici adheze buněk na titanové materiály se ukázalo jako efektivnější použití RL *P. aeruginosa* DBM 3777 (RL A) v koncentraci 500 mg/l, při které došlo k nejvýraznějšímu poklesu metabolické aktivity. Stejně tak u prekondicionace titanových žetonů RL, byl účinnější RL *P. aeruginosa* DBM 3777 (RL A) s poklesem metabolické aktivity přibližně na 25 % aktivity původní (bez přidavku RL). Pro eradikaci adherovaných buněk byla jako nejefektivnější stanovena koncentrace 250 mg/l u RL *P. aeruginosa* DBM 3777 (RL A).

#### 5. Literatura

- Lovaglio, R.; Silvaa, V.; Ferreira, H.; et al. Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. *Biotechnol. Adv.* 2015, 33 (8), 1715–1726.
- Ziebuhr, W.; Hennig, S.; Eckart, M.; et al. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2006, 28 (1), 14–20.

**Sborník souhrnů a plných textů konference  
KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2016**

---

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

**Editoři:** Olga Maťátková, Irena Kolouchová

**Rok vydání:** 2016

**Počet stran:** 80

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