



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**



1. seminář

PIVOVARSTVÍ A KVASNÉ TECHNOLOGIE 2004

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

1. a 2. dubna 2004

Pořádající instituce:

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

Fakulta potravinářské a biochemické technologie
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Přípravný a organizační výbor:

Předseda: Ing. Jaromír Fiala, Ph.D., e-mail: jaromir.fiala@vscht.cz

Členové: Doc. Ing. Karel Melzoch, CSc., e-mail: karel.melzoch@vscht.cz

Ing. Pavel Dostálek, CSc., e-mail: pavel.dostalek@vscht.cz

Ing. Tomáš Brányik, Ph.D., e-mail: tomas@deb.uminho.pt

Dr. Ing. Leona Paulová, e-mail: leona.paulova@vscht.cz

Dr. Ing. Petra Patáková, e-mail: petra.patakova@vscht.cz

Ing. Irena Kolouchová, e-mail: irena.hanzlikova@vscht.cz

Ing. Jan Novák, e-mail: novkin@seznam.cz

Ivana Dušková, e-mail: ivana.duskova@vscht.cz

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004

ISBN 80-7080-542-0

Program:

Čtvrtek 1.dubna 2004 - Konferenční centrum VŠCHT Praha, kolej Sázava, areál vysokoškolských kolejí Praha 4 – Kunratice

8:00 – 9:00 Registrace účastníků

Přednášková sekce

9:00 Zahájení semináře

9:00 – 9:20 Basařová G.: **Historie výuky pivovarství na území dnešní České republiky**

9:20 – 9:30 Fiala J.: **Současnost výuky na Ústavu kvasné chemie a bioinženýrství**

Studijní zaměření:

Sladařství a pivovarství

9:30 – 9:40 Kodysová H., Basařová G., Čížková H., Novák J.: **Rozdíly sladů z geneticky odlišných odrůd ječmene z hlediska obsahu a spektra aminokyselin**

9:40 – 9:50 Straková L., Basařová G., Průcha P., Hlaváček I., Dostálek P.: **Studium změn hořkých látek při skladování chmele a ve stočeném pivu**

9:50 – 10:00 Hofta P., Dostálek P.: **Stanovení prenylflavonoidů v českých odrůdách chmele**

10:00 – 10:10 Sikora P., Dostálek P., Ligotský P.: **Možnosti měření a ovlivnění hodnoty antioxidační kapacity v průběhu pivovarského procesu**

10:10 – 10:20 Zedek J., Dostálek P., Hofta P.: **Zvýšení fyzikálně-chemické stability piva českého typu**

10:20 – 10:30 Petříková M., Dostálek P., Hochel I.: **Stanovení toxických proteinů v pivu**

10:30 – 10:50 *Přestávka*

10:50 – 11:00 Kovářová J., Basařová G., Fiala J., Pichová A.: **Použití metod FACS pro studium procesu stárnutí kvasinky *Saccharomyces cerevisiae***

11:00 – 11:10 Šťavíková J.: **Kyslíkové radikály a jejich souvislost se stárnutím buněk *Saccharomyces cerevisiae***

11:10 – 11:20 Lehnert R., Fiala J., Pichová A., Kovářová J.: **Studium procesu stárnutí kvasinky *Saccharomyces cerevisiae***

11:20 – 11:30 Hronová M., Basařová G., Novák J.: **Vliv způsobu praní a skladování kvasnic**

na fyziologické vlastnosti geneticky odlišných kmenů pivovarských kvasnic

- 11:30 – 11:40 Novák J., Basařová G., Fiala J.: **Studium změn kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v pivovarském procesu průtokovou cytometrií**
- 11:40 – 11:50 Štěrbá K., Dostálek P.: **Isolace stěnových polysacharidů z odpadních pivovarských kvasnic**
- 11:50 – 12:00 Klír O., Dostálek P., Štěrbá K., Karabín M.: **Nový způsob využití odpadních pivovarských kvasnic**
- 12:00 – 12:10 Vohánka J., Fiala J., Kostrouchová M.: **Aplikace PCR pro detekci pivovarské kontaminace**
- 12:10 – 12:20 Klas J., Siglová M., Mikeš J.: **Interakce těžkých kovů s obalovými vrstvami a exopolymerními látkami vytvářenými populacemi vybraných jednobuněčných eukaryot**
- 12:20 – 12:30 Dvořáková M., Páca J., Bárta J.: **Mikrobní degradace aromatických nitrosloučenin**
- 12:30 – 14:00 *Přestávka na oběd*
- 14:00 – 14:10 Kozáková D., Žáčková P., Šviráková E., Plocková M.: **Stanovení kysací schopnosti u kmenů rodu *Lactococcus***

Studijní zaměření: Kvasná chemie a technologie

- 14:10 – 14:20 Piterková L., Skarkeová M., Melzoch K.: **Studium termofilních mikroorganismů z hlediska molekulární genetiky**
- 14:20 – 14:30 Klišová T., Rychtera M., Ferzik S., Petříková K.: **Prověření různých metod kultivace termofilních bakterií v bioreaktoru**
- 14:30 – 14:40 Maráková M., Rychtera M., Ferzik S., Petříková K.: **Úprava fermentačního média a kultivace termofilních mikroorganismů v podmínkách oxistatu**
- 14:40 – 14:50 Ferzik S., Melzoch K.: **PID regulace DOC a teploty a její využití při degradaci lihovarských výpalků**
- 14:50 – 15:00 Churavá A., Paulová L., Šiříšřová L.: **Identifikace kmenů termofilních bakterií na základě profilu mastných kyselin**
- 15:00 – 15:20 *Přestávka*
- 15:20 – 15:30 Maternová J., Melzoch K., Sekavová B.: **Identifikace mikrobiálních kmenů ve**

směsných populací optickými metodami

15:30 – 15:40 Křozová J., Melzoch K., Hábová V., Lapišová K.: **Využití membránových technik při zpracování fermentačních médií**

15:40 – 15:50 Lapišová K., Melzoch K.: **Uplatnění membrán při zpracování odpadů z potravinářského průmyslu**

15:50 – 16:00 Horová P., Vlček R., Paulová L.: **Kultivace kvasinek v bioreaktoru**

Prezentace firem

16:00 – 17:00 Prezentace firem; Diskuse

17:00 Závěr 1. dne

Pátek 2.dubna 2004 - Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Posterová sekce

Diskuse v prostorách Ústavu kvasné chemie a bioinženýrství

Možnost návštěvy vybraných laboratoří a technologické haly ÚKCHB

Sraz účastníků 9:00 hodin před knihovnou ÚKCHB, VŠCHT Praha - budova A, Technická 5, Praha 6, 1. patro

Souhrny příspěvků

Historie výuky pivovarství na území dnešní České republiky

Basařová Gabriela – Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Čeští sládkové od pradávna dbali na odbornost lidí, kteří vařili pivo. Cechy ve středověku na rozdíl od okolních států povolovali připravovat pivo pouze právovárečnickům, kteří se k tomu řádně vyučili. V roce 1585 vydal český univerzitní profesor Tadeáš Hájek z Hájku knihu „De cerevisiae eiusque coficiendi katione natura, viribus, facuktatibus opusculum“ („O pivě, jeho výrobě, silách a vlastnostech“), což byla zřejmě první pivovarská technologie ve světě. Legendární sládek František Ondřej Poupě kromě velké reformy pivovarské výroby a četných odborných pivovarských publikací založil na sklonku 18. století v Brně první pivovarskou školu v Evropě. Na základě požadavku pražských sládků z roku 1816 byla v roce 1818 zahájena na pražské technice (založena 1707) samostatná výuka pivovarství, což nemělo ve světě obdoby.

V roce 1868 byla v Praze (z podnětu prof. Bělohoubka) založena dvouletá a v roce 1910 (z podnětu prof. Kruise) čtyřletá pivovarská škola. Tím mělo české pivovarství zajištěno výchovu jak vysokoškolských tak středoškolských odborníků. Pokračovatelem pivovarské školy je dnešní Střední průmyslová škola potravinářské technologie v Praze.

Na pražské technice vědecky a pedagogicky působila řada mezinárodně uznávaných osobností jako prof. J. Steimann, první přednášející předmětu Pivovarství, „velmistr zymotechniky“ prof. K.N. Balling, který odvodil attenuační zákony kvašení a vzorec pro výpočet původní koncentrace mladiny z hodnot alkoholu a extraktu piva, prof. A. Bělohoubek, zakladatel časopisu Chemické Listy, Výzkumného ústavu sladařského a pivovarského v Praze (založen v roce 1887), v roce 1876 prosazoval založení samostatné katedry pro kvasné technologie, jejímž pokračovatelem je dnešní Ústav kvasné chemie a bioinženýrství VŠCHT Praha. Vedoucí této katedry prof. K. Kruis, který zde působil na přelomu 19. a 20. století zařadil do výuky kvasných technologií enzymologii a mikrobiologii a založil na technice první pokusný pivovárek. Prof. J. Šatava, který v nové dnešní budově VŠCHT Praha (postavena v roce 1937) vybudoval technologickou halu s pivovarem a lihovarem. V 2. světové válce byla vysokoškolská i středoškolská výuka pivovarství přerušena v důsledku uzavření všech vysokých a odborných škol u nás. V roce 1952 se od pražské techniky oddělila samostatná Vysoká škola chemicko technologická. Katedru kvasné chemie a technologie, v roce 1970 přejmenovanou na Katedru kvasné chemie a bioinženýrství a v roce 1991 Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, postupně vedli prof. Ing. J. Dyr, DrSc. (1951-1970), prof. Ing. V. Grégr, DrSc. (1970-1981), prof. Ing. G. Basařová, DrSc. (1981-1997), doc. Ing. J. Čepička, CSc. (1997-2002), doc. Ing. K. Melzoch, CSc. (2002 doposud). Výuka pivovarství na VŠCHT Praha se neustále modernizuje a doplňuje o nové teoretické a praktické poznatky. Pivovarství na pražské technice absolvovali nejen domácí, ale i velké množství zahraničních studentů nejen v řádném studiu, ale i v postgraduální výuce.

Současnost výuky na Ústavu kvasné chemie a bioinženýrství

Fiala Jaromír – Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství (ÚKCHB) se v současné době podílí na výuce ve studijním plánu Vysoké školy chemicko-technologické v Praze (VŠCHT Praha) z magisterských studijních programů (MSP) na studijním programu – *Biochemie a biotechnologie*. V tomto programu nabízí studijní obor – *Kvasná chemie a bioinženýrství*, ve kterém je dále možno studovat tři zaměření: *Sladařství a pivovarství*, *Aplikovaná biologie a bioinženýrství* a *Kvasná chemie a technologie*. Z doktorských studijních programů (DSP) ÚKCHB zajišťuje výuku studijního programu – *Biochemie a biotechnologie*, studijní obor *Biotechnologie*.

V bakalářském studijním programu (BSP) *Chemie a technologie potravin*, pedagogičtí pracovníci ÚKCHB zajišťují výuku předmětu Fermentační technologie I a II.

Studijní obor *Kvasná chemie a bioinženýrství*, který má více než stoletou tradici, studenty seznamuje s tradičními fermentačními technologiemi (sladařství, pivovarství, lihovarství, vinařství a droždářství). Studenti dále získávají znalosti v dalších inženýrských a biologických předmětech (molekulární genetika mikroorganismů, základy genového inženýrství, bioinženýrství, aplikovaná biologie a bioekologie, bioinformatika, fyziologie průmyslových organismů, biochemie sekundárních metabolitů, moderní purifikační a separační techniky, sanitace a hygiena fermentačních procesů, kontrolní metody fermentačního průmyslu, výpočetní metody, modelování a optimalizace fermentačních procesů).

Absolventi získávají předpoklady pro uplatnění v široké oblasti profesí, kde je vyžadováno odborné vzdělání na vysokoškolské úrovni orientované na fermentační procesy. Uplatňují se, jak přímo v oborech kvasného a biotechnologického průmyslu, tak v navazujících oborech potravinářského, farmaceutického a chemického průmyslu. Jsou připraveni uplatnit se ve výzkumu, vývoji, výrobě, kontrole, projekci a v komerčních institucích. Vzhledem k širokému pojetí odbornosti jsou připraveni nejen na profesionální působení ve své specializaci, ale také na snadnou adaptaci k případnému působení v jiném oboru.

Studenty, zaměření *Sladařství a pivovarství* a *Kvasná chemie a technologie*, kteří se aktivně podílejí na většině odborné části tohoto semináře, pedagogicky vedou: prof. Ing. Gabriela Basařová, DrSc.; prof. Ing. Jan Páca, DrSc.; prof. Ing. Mojmír Rychtera, CSc.; doc. Ing. Karel Melzoch, CSc.; Ing. Pavel Dostálek, CSc.; Ing. Jaromír Fiala, Ph.D.; Dr. Ing. Leona Paulová; Ing. Martina Siglová, Ph.D.; Ing. Hana Čížková a Ing. Věra Hábová.

Velký podíl na zdárném řešení diplomových prací studentů MSP má spolupráce se studenty DSP, pomoc laborantů a technických pracovníků ÚKCHB (Ivana Dušková, Rudolf Jung, Silvia Odcházlová) a spolupráce s pracovníky ostatních ústavů VŠCHT Praha, AV ČR, 1.LF ÚK, VÚPS a průmyslových partnerů.

Rozdíly sladů z geneticky odlišných odrůd ječmene z hlediska obsahu a spektra aminokyselin

Kodysová Hana, Basařová Gabriela, Čížková Hana, Novák Jan

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo orientační ověření vlivu genetických vlastností vybraných českých a zahraničních odrůd ječmene formou rozboru kongresních sladin a čtvrtprovozních várek vedených do fáze hlavního kvašení. U pokusných vzorků se porovnávaly především obsah celkových a jednotlivých aminokyselin a aminodusíku. Sledování bylo doplněno o další kriteria jako obsah polyfenolů, oxido-redukční kapacitu aj.

U sladů z odrůd ječmenů Malz, Jersey, Sabel, Prestige, Kompakt, Tolar, Amulet se obsah celkových a jednotlivých aminokyselin výrazně nelišil, větší rozdíly byly zjištěny v obsahu aminodusíku. Tendenci k vyšším hodnotám aminokyselin a polyfenolů měly slady z českých odrůd Kompakt a Amulet.

V pokusných várkách se potvrdila korelace nižší tvorby vicinálních diketonů s vyšším využitím větvených aminokyselin mladiny pivovarskými kvasinkami, která se u várek z různých sladů lišila. Obdobně se zjistily rozdílné vztahy mezi metabolismem sirných aminokyselin a tvorbou oxidu siřičitého při hlavním kvašení.

Genetické vlastnosti ječmene mohou být více či méně pozměněny klimatickými podmínkami daného roku, agrotechnikou i pěstebním místem. Promítnutí kvalitativních znaků sladu do vlastností piva je pak ovlivněno podmínkami a případnými výkyvy v technologii. Proto by bylo potřebné zjištěné poznatky ověřit v několikaletém cyklu.

Studium změn hořkých látek při skladování chmele a ve stočeném pivu

Straková Lenka¹, Basařová Gabriela¹, Průcha Pavel², Hlaváček Ivo², Dostálek Pavel¹

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Plzeňský Prazdroj, a.s., Pivovar Plzeň

Cílem předložené práce na téma „Sledování změn hořkých látek při skladování chmele a ve stočeném pivu“ bylo zjištění vlivu doby a teploty skladování především na obsah α - a iso- α -hořkých kyselin ve chmelu a v hotovém pivu.

Byly testovány vzorky dvou odrůd chmele, Premiant - CZPR a Žatecký poloraný červeňák - CZSSA, které byly uloženy jeden měsíc při teplotách -15 °C a 23 °C. Dále byly analyzovány vzorky hotového piva z jedné šarže, které byly skladovány při teplotách 8 °C, 20 °C a 30 °C po dobu pěti měsíců. V pravidelných intervalech byly tyto vzorky podrobeny analytickému a senzorickému hodnocení.

Naměřené výsledky potvrdily, že ideální podmínky pro skladování chmele a chmelových výrobků jsou v klimatizovaném skladu při nízké teplotě s vyloučeným přístupem vzduchu. Úbytek obsahu α -hořkých kyselin v průběhu skladování vzorků chmele byl nejnižší u vzorků uložených při -15 °C v inertní CO₂ atmosféře. Tato práce prokázala, že během zpracování chmele peletizací ani působením vyšší teploty skladování nevznikají ve vzorcích chmele iso- α -hořké kyseliny.

Dále se ukázalo, že teplota skladování piva ovlivňuje jeho fyzikálně-chemické i senzorické vlastnosti, jejichž změny jsou nejvýraznější při vyšších skladovacích teplotách.

V hotovém pivu byl v závislosti na teplotě skladování zjištěn pokles obsahu trans isomerů iso- α -hořkých kyselin, zatímco obsah jejich cis isomerů se neměnil. Výsledkem této práce jsou i uceleně naměřená UV-spektra všech šesti hlavních stereoisomerů isohumulonů, která ještě nebyla publikována. Naměřená spektra cis a trans isomerů těchto látek vykazují rozdíly mezi jejich absorpčními maximy.

Ztráty iso- α -hořkých kyselin při působení jednotlivých teplot v průběhu skladování byly výraznější než pokles celkové hořkosti piva, což dokazuje vliv dalších produktů přeměny hořkých látek chmele na celkovou hořkost piva. Během skladování piva došlo k nárůstu anilinového čísla, které je dobrým ukazatelem stárnutí hotového piva. Změny sledovaných analytických veličin byly nejvýraznější u vzorků uložených při 30 °C, zatímco u vzorků uložených při 8 °C se složení piva téměř nemění.

Stanovení prenylflavonoidů v českých odrůdách chmele

Hofta Pavel, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo stanovení hlavních prenylflavonoidů v českých odrůdách chmele pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detekcí, a dále zjištění jak se mění obsahy těchto látek během skladování chmele. Ke stanovení byla použita optimalizovaná metoda izolace a detekce prenylflavonoidů chmele (*Humulus lupulus* L.) podle Stevense. UV detekce prenylflavonoidů probíhala při 370 nm, nastříkovaný objem byl 10 µl, průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min a teplota v koloně 20 °C. Posklizňový obsah xanthohumolu v českých odrůdách chmele se pohyboval v intervalu 0,3 až 1,1 % hm. v suš. Největší množství xanthohumolu obsahovala odrůda Agnus od 0,71 do 1,12 % hm. v suš. Odrůda Sládek obsahovala 0,55 až 0,80 %, odrůda Bor 0,41 až 0,60 %, odrůda Premiant 0,30 až 0,45 % hm. v suš. Odrůda ŽPČ obsahovala jen 0,30 až 0,40 % hm. v suš. Z loňských a předloňských analýz vyplývá, že se meziroční obsahy xanthohumolu liší jen nepatrně, závisí však na pěstební lokalitě a klimatických podmínkách. Stárnutím chmele docházelo během 5 měsíčního skladování až k 30 %nímu úbytku obsahu xanthohumolu. Přednáška také zahrnuje i přehled všech dosud známých prenylflavonoidů chmele, jejich biosyntézu, stanovení, a jejich vliv na lidské zdraví.

Možnosti měření a ovlivnění hodnoty antioxidační kapacity v průběhu pivovarského procesu

Síkora Petr¹, Dostálek Pavel¹, Ligotský Petr²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Plzeňský Prazdroj, a.s., Pivovar Radegast

Tato práce se zabývá sledováním antioxidační kapacity v průběhu pivovarského procesu, soustřeďuje se především na hlavní kvašení v cylindrokónických tancích a dokvašování v ležáckých tancích. K měření byla použita metoda elektronové spinové rezonance a byly zjišťovány hodnoty lag-time a T150. Analyzována byla tři různá piva českého typu, dvě výčepní a jeden ležák.

Měřeny byly hodnoty T150 a lag-time, zjišťována byla rovněž závislost hodnoty antioxidační kapacity na koncentraci SO₂ v pivu. Antioxidační kapacita piva byla posuzována z hlediska použití dvou různých CKT při kvašení. Pozornost byla zaměřena i na změnu hodnot lag-time a T150 během sudování.

Příznivějších hodnot lag-time bylo dosaženo při kvašení ve starých CKT oproti kvašení v nových CT. Při sudování starých CKT docházelo k menšímu poškození piva.

Pomocí statistické analýzy byla prokázána závislost hodnoty lag-time na koncentraci SO₂ v pivu.

Zvýšení fyzikálně-chemické stability piva českého typu

Zedek Jakub, Dostálek Pavel, Hofta Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo nalezení nového stabilizačního prostředku na bázi polyamidu. Tento materiál by měl dosáhnout srovnatelných výsledků se stabilizátory na bázi polyvynilpolypyrrolidonu. Výhodou by byla jeho nižší cena a vyšší chemická odolnost.

V laboratorním měřítku se povedlo připravit materiál, který odpovídal zadaným požadavkům. Bohužel při převedení výroby do čtvrtprovozního měřítka se nepodařilo získat sorbent se stejnými vlastnostmi. Materiál vykazoval nižší sorpční účinnost vůči polyfenolům a měl i odlišné fyzikální vlastnosti.

Po celou dobu testování materiálů byla hlavním kritériem schopnost polyamidu adsorbovat polyfenoly. Celkové polyfenoly se stanovovaly metodou EBC (European Brewery Convention). Parametrem, který je pro pivovarství důležitý je průtočnost materiálu. Ta byla stanovena u vybraných materiálů přístrojem Dicalite.

V provozním měřítku byl otestován materiál pod pracovním názvem Silpan. Při stabilizaci nedošlo k žádným problémům, ale pivo takto vyrobené nezískalo vyšší trvanlivost. Proto byly navrženy kroky, které by měly výsledek stabilizace zlepšit.

Jako vedlejší možnost uplatnění polyamidu byla řešena problematika stanovení anthokyanogenů metodou podle Harrise – Ricketse. U této metody je jako adsorbent anthokyanogenů používán Nylon 66. Nahrazení Nylonu 66 polyamidovým prachem se ukázalo jako ekonomicky výhodné. A to i přesto, že pro stanovení se muselo použít trojnásobné množství sorbentu. Výsledky získané při použití polyamidu Beerpan byly srovnatelné s výsledky získanými původní metodikou.

Stanovení toxických proteinů v pivu

Petříková Martina¹, Dostálek Pavel¹, Hochel Igor²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Nemoc celiakie má za následek poruchu vstřebávání a následně atrofii střevních klků. Podmínkou pro vznik choroby je podráždění v ethanolu rozpustnými zásobními proteiny nebo prolaminy z pšenice, žita, ječmene a pravděpodobně i z ovsa. Prolamin odvozený z pšeničné mouky se nazývá gliadin, prolamin odvozený z ječné mouky se nazývá hordein. Pivo českého typu se vyrábí z ječného sladu, jen vyjimečně ze sladu pšeničného. Zrno během sladování podstupuje proces kontrolovaného klíčení, přičemž dochází k částečné hydrolýze zásobních proteinů (hordeinu). Obsah prolaminů v ječmeni a pivu nebyl doposud zdokumentován.

Existují dva typy analýz systémem ELISA, určené ke kvantifikaci pšeničného gliadinu. První analýza gliadinu vykazuje jen slabou kříženou reakci a citlivost vůči ječnému hordeinu. Druhý typ je představován jednou z komerčních ELISA sad, jenž je určena pro stanovení gliadinu v pšenici a ječmeni.

Tato práce je zaměřena na zkoumání a přesné stanovení koncentrací gliadinu v pšeničném a ječném zrně, sladu a z něho vyrobeného piva. Spolu s tím byl zkoumán vliv použité pivovarské technologie na snížení obsahu gliadinu v jednotlivých pivech.

Použití metod FACS pro studium procesu stárnutí kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Kovářová Jitka^{1,2}, Basařová Gabriela¹, Fiala Jaromír¹, Pichová Alena²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Mikrobiologický ústav, AV ČR

Jako model pro studium procesu stárnutí byly použity kmeny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a mutantní kmeny RAS2^{Val19} a Ras2⁻.

Ke studiu fyzikálních a biochemických změn doprovázející stárnutí byly buňky separovány na průtokovém cytometru s přídatným zařízením zvaným buněčný třídič, který umožňuje oddělit buňky na základě různých specifických vlastností. Práce se nejdříve zabývá morfologickými a fyziologickými změnami během kultivace u divokého kmene kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Byly také porovnávány fyziologické rozdíly po kultivaci mezi divokým kmenem a mezi mutantními kmeny téže kvasinky, vše metodou průtokové cytometrie.

Dále byla provedena kvantifikace apoptických buněk v populaci. K tomu bylo použito dvojité barvení – barvení propidiem jodidem a annexinem V-FITCem. Toto dvojité barvení umožňuje sledovat buňky v rané fázi apoptózy, a také buňky mrtvé či poškozené. Ke kvantifikaci byla zatím použita jen fluorescenční mikroskopie a práce si klade za cíl tyto výsledky porovnat s kvantifikací provedenou průtokovou cytometií.

Kyslíkové radikály a jejich souvislost se stárnutím buněk *Saccharomyces cerevisiae*

Šťavíková Jana^{1,2}

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Mikrobiologický ústav, AV ČR

V aerobních podmínkách musí všechny organismy čelit vlivu kyslíkových radikálů. Ty vznikají nejen v prostředí, kde organismus žije, ale také přímo při metabolických procesech probíhajících v buňce.

Superoxid (O_2^-) vzniká v buňkách *Saccharomyces cerevisiae* zejména při dýchání, v III. komplexu dýchacího řetězce. Přímou v mitochondriích je tento radikál převáděn enzymem superoxid dismutázou na peroxid vodíku (H_2O_2). Z peroxidu vodíku vzniká následnými reakcemi hydroxylový radikál ($OH^\bullet$), vůči němuž již buňka nemá žádnou obranu.

Kyslíkové radikály způsobují peroxidativní poškození lipidů, DNA a dalších buněčných složek. Jedním ze způsobů poškození proteinů je vznik karbonylovaných skupin. Ve své laboratorní práci jsem porovnávala přítomnost karbonylovaných proteinů u dvou kmenů *Saccharomyces cerevisiae* (divoký kmen a RAS2^{Val19} mutant). Karbonylované skupiny jsem detekovala pomocí protilátek konjugovaných s fluorescenčním barvivem Texas Red po derivatizaci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem in situ. U obou kmenů byla přítomnost karbonylovaných skupin mnohem vyšší u starších buněk než u mladších. Kvantitativní analýza přítomnosti karbonylovaných skupin nebyla zatím provedena.

Studium procesu stárnutí kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Lehnert Radek¹, Fiala Jaromír¹, Pichová Alena², Kovářová Jitka^{1,2}

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Mikrobiologický ústav, AV ČR

Jednotlivé buňky *Saccharomyces cerevisiae* vykazují replikativní stáří, které je funkcí pučení, která daná buňka prodělala. Během stárnutí kvasinky se mění její morfologie, fyziologický stav a exprese genů. K rozdělení populace kvasinek podle stáří byla použita metoda elutriační centrifugace. U každé frakce buněk byla pozorována schopnost růstu za aerobních podmínek a byla sestrojena růstová křivka. Během kultivace byly vzorky průběžně analyzovány na průtokovém cytometru. Staré buňky byly schopny růst stejně rychle jako středně staré a dceřinné buňky, ale brzy ztratily svoji dynamiku růstu. Příčinou tohoto jevu byl pravděpodobně přechod těchto buněk do stavu senescence a neschopnosti jejich dcer vstoupit do nového buněčného cyklu. Stejně analýzy byly provedeny s nesynchronizovanými populacemi odebranými z pivovaru. První vzorek obsahoval buňky z prvního odstřelu společně s kaly. Druhý vzorek obsahoval středně staré buňky a mladé buňky, které se používají pro další kvašení. Třetí vzorek byly kvasinky odebrané před filtrací piva. Tyto vzorky byly analyzovány metodou průtokové cytometrie. V průběhu kultivace byl sledován obsah bílkovin, glykogenu a esterasová aktivita. Obsah bílkovin a glykogenu nejprve na počátku exponenciální fáze vzrostl, v exponenciální fázi bylo minimum a na konci exponenciální fáze opět rostl. Esterasová aktivita v průběhu kultivace klesala. Buňky, které byly stresovány v dekantéru ztratily svoji esterasovou aktivitu a zvýšily proteasovou aktivitu. Proteolytické enzymy mohou nepříznivě ovlivnit kvalitu piva v důsledku snížení hladiny bílkovin stabilizujících pивní pěnu. Na závěr této práce byly pozorovány buňky v časně fázi apoptosy.

Vliv způsobu praní a skladování kvasnic na fyziologické vlastnosti geneticky odlišných kmenů pivovarských kvasnic

Hronová Martina, Basařová Gabriela, Novák Jan

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo zjistit vliv způsobu praní a skladování kvasnic na fyziologické vlastnosti geneticky odlišných kmenů pivovarských kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae*.

Prověřován byl vliv praní kyselinou fosforečnou a aktivovaným chloritanem sodným u pivovarských kvasnic kmene č. 95 (izolátu W 34 Weiherstephan). Byl sledován vliv praní na flokulační schopnost kvasnic, na jejich viabilitu a na bakteriální kontaminaci.

Pomocí optické fluorescenční metody, průtokové cytometrie, byla sledována vitalita a viabilita skladovaných populací pivovarských kvasnic kmene č.2, č.7 a č.95, označené podle sbírky Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského. Kvasinky byly skladovány po dobu 10-ti dnů v demineralizované vodě, 2%ním roztoku hydrogenfosforečnanu draselného a v 2%ním roztoku chloridu sodného. Dále byl zjišťován vliv opakovaného nasazování pivovarských kvasnic kmene č. 95 (izolátu W 34 Weiherstephan) na jejich flokulační schopnosti.

Byly zjištěny výhody a nevýhody jednotlivých způsobů praní. Experiment potvrdil předpoklad, že vitalita i viabilita skladovaných kvasinek v průběhu skladování klesá, přičemž závisí, při zachování shodných skladovacích podmínek, na druhu skladovacího roztoku. Získané výsledky prokázaly vliv opakovaného nasazení na vitalitu kvasnic projevující se např. zhoršením flokulačních vlastností.

Studium změn kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v pivovarském procesu průtokovou cytometrií

Novák Jan, Basařová Gabriela, Fiala Jaromír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývala studiem změn kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v biotechnologických procesech se zvláštním přihlédnutím k pivovarskému. Pro většinu změn jimiž kvasinky procházejí existují charakteristiky, které je možno sledovat fluorescenčním barvením. K experimentům byly použity tři hlavní kmeny kulturních kvasinek používaných v našich pivovarech. Byly to kmeny označené jako č. 2, 7 a 95 podle sbírky (RIBM 655) Výzkumného Ústavu Pivovarsko Sladařského. Jako živný substrát byla obvykle používána standardní mladina (12^0P) a fermentace proběhla v chlazených nádobách o užitém objemu 30 l. Pro vyhodnocování životních projevů kvasinek bylo použito fluorescenčního mikroskopu spojeného s analýzou obrazu a průtokového cytometru. Před, v průběhu a po fermentaci byly sledovány morfologické znaky jednotlivých kmenů, jejich buněčný cyklus, metabolická aktivita a viabilita. Obecné morfologické charakteristiky kvasničných populací, jako je distribuce velikosti buněk a granularita byly sledovány jak analýzou obrazu získaného z fluorescenčního mikroskopu tak na průtokovém cytometru. Ke studiu buněčného cyklu bylo využito analýzy obsahu buněčné DNA na základě specifického barvení fluorescenčním barvivem propidium jodidem. Bylo zjištěno, že sledované kmeny vykazují specifické odlišnosti z hlediska vývoje procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Nejrychlejší vzestup počtu buněk v G2 fázi byl pozorován u kmene č. 7 nejpomalejší u kmene č. 95, tato zjištění korelovala s aktivitou sledovanou rychlostí utilizace sacharidů a koncentrací buněk ve vznosu. Dále byl v kvasničné biomase před fermentací a po fermentaci porovnáván obsah glykogenu v závislosti na genetických vlastnostech jednotlivých kmenů a podmínkách použitých experimentů. U jednotlivých kmenů byla také sledována esterásová aktivita a to na základě jejich schopnosti štěpit nefluorescenční barvivo Fluorescein diacetát na fluorescenční Fluorescein a molekulový zbytek, k identifikaci fluorescence byl použit detektor FL1. Jednotlivé kmeny se lišily jak z hlediska akumulace či odbourávání zásobních sacharidů tak z hlediska diferencí vitality v průběhu skladování. Z výsledků vyplývá, že techniky fluorescenčního barvení ve spojení s průtokovou cytometrií je možno dobře využít ke sledování změn kvasinek.

Isolace stěnových polysacharidů z odpadních pivovarských kvasnic

Štěrbá Karel, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

V poslední době se zvyšuje snaha o využití odpadních pivovarských kvasnic, zejména pak v doposud méně využívaných technologiích. V neposlední řadě se jedná i o izolaci β -glukanů díky jejich vysokému obsahu v buněčných stěnách. Tato technologie je žádoucí i z hlediska pozitivního významu β -glukanů pro lidské zdraví. V této přednášce jsou rozebírány různé metody přípravy preparátu s vysokým obsahem β -glukanů i jejich následné úpravy (sušení).

Nový způsob využití odpadních pivovarských kvasnic

Klír Ondřej, Dostálek Pavel, Štěrbá Karel, Karabín Marcel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývá zpracováním odpadních pivovarských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* na preparát se zvýšeným množstvím β -glukanů buněčných stěn. Pro izolaci byly použity odpadní kvasnice z různých českých pivovarů.

V laboratorním měřítku bylo izolováno 17 preparátů stěnových β -glukanů z buněčných stěn a bylo charakterizováno jejich složení z hlediska zastoupení celkových polysacharidů, β -glukanů, mannanů, bílkovin a lipidů a porovnáno se složením výchozích kvasnic. U získaných produktů byly zjištěny jejich fyzikální a viskoelastické vlastnosti (schopnost gelovatění, viskozita, vaznost pro vodu). Bylo provedeno pokusné bělení preparátu. Dva preparáty (po 1 kg) byly připraveny v poloprovozním měřítku.

Aplikace PCR pro detekci pivovarské kontaminace

Vohánka Jaroslav¹, Fiala Jaromír¹, Kostrouchová Marta²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Ústav dědičných a metabolických poruch, 1.LF UK Praha

Tato práce byla zaměřena na možnosti využití metody polymerázové řetězové reakce (PCR - polymerase chain reaction) při detekci rodu *Lactobacillus*. Také bylo provedeno porovnání metody PCR s dalšími molekulárně biologickými metodami, především metodou FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace).

Bylo vybráno 13 sbírkových druhů z rodu *Lactobacillus*, které byly identifikovány pomocí API CH50 testů. U všech těchto druhů jsou známy jejich biochemické vlastnosti a u některých z nich je známa i celá sekvence genomické DNA. Některé komerční kity založené na polymerázové řetězové reakci PCR byly využity pro identifikaci některých druhů. Znalost sekvence konzervativního úseku na gDNA jsme využili k přípravě vlastních primerů a následné PCR.

U druhů, u kterých genom ještě není znám, bylo využito nespecifity primerů pro pomnožení konzervovaného úseku DNA. Tato DNA byla klonována pomocí kitu TOPO[®] TA do vektoru pCR[®]4-TOPO[®] (Invitrogen) která byla dále sekvenována. Zjištění přesné sekvence umožnilo navrhnout primery specifické se kterými proběhla specifická PCR.

Podobné reakce provedené se specifickými primery využívá i Real-time PCR, neboli PCR v reálném čase. Jelikož se jedná o moderní a vysoce specifickou techniku stanovení, bylo očekáváno velké množství dat využitelných při rozdělení jednotlivých druhů rodu *Lactobacillus*. Měření bylo provedeno na LightCycleru[™] firmy Roche[®].

Další metodou využitou při identifikaci rodu *Lactobacillus* byla metoda FISH, využívající DNA sondy značené fluorescenčním barvivem. Tyto sondy jsou součástí kitu Vermicon, který byl v této práci využit.

V závěru jsou diskutovány výhody a nevýhody jednotlivých technik, časová náročnost, schopnost detekce rodu *Lactobacillus* a jeho jednotlivých druhů, především z hlediska pivovarské kontaminace.

Interakce těžkých kovů s obalovými vrstvami a exopolymerními látkami vytvářenými populacemi vybraných jednobuněčných eukaryot

Klas Jiří, Siglová Martina, Mikeš Jiří

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Mikroorganismy využívají různé druhy mechanismů ochrany vůči toxickým účinkům těžkých kovů. Jedním z nejběžnějších je jejich sorpce na polysacharidy produkované za tímto účelem do mimobuněčného prostoru.

Tato práce byla zaměřena na ovlivnění chování kvasinek v přítomnosti iontů těžkých kovů z hlediska tvorby exopolysacharidů a schopnosti kvasinek vyrovnat se s takto nepříznivými podmínkami. Ze skupiny šestnácti mikroorganismů a pěti kovů byly na základě rozsáhlého screeningu vybrány čtyři kvasinky, a to *Aureobasidium pullulans*, *Candida utilis*, *Geotrichum candidum* a *Rhodotorula mucilaginosa* a dva kovy: kadmium a nikl. U těchto kvasinek byla podrobně zkoumána schopnost produkce exopolysacharidů, jejich základní monosacharidové složení a množství kovu sorbovaného do polysacharidu.

V rámci této práce byla též optimalizována metoda izolace exopolysacharidů, sestavená z dílčích kroků publikovaných v odborné literatuře.

Mikrobní degradace aromatických nitrosloučenin

Dvořáková Markéta, Páca Jan, Bárta Jiří

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce byla degradace nitrotoluenů čistými kulturami ve vsádkovém uspořádání a směsnými populace v kontinuálních průtočných reaktorech. Během pokusů byla sledována rychlost a účinnost degradace nitrotoluenů, akumulace metabolitů a hodnoty pH před a na konci kultivace. při degradačních testech čistých kultur byly nitrotolueny testovány jednotlivě a ve směsi. Zároveň byl testován vliv přítomnosti externího zdroje dusíku na rychlost a účinnost degradace. V průtočných reaktorech byly nitrotolueny degradovány směsnými populacemi izolovanými jednak ze zeminy dlouhodobě znečištěné směsí nitrotoluenů a dále z půdy kontaminované směsí dusíkatých aromatických sloučenin (nitrofenoly, nitrobenzeny, anilin). Tyto populace byly v průtočných reaktorech imobilizovány na různé druhy náplní a testovány na schopnost degradace vybraných nitrotoluenů.

Stanovení kysací schopnosti u kmenů rodu *Lactococcus*

Kozáková Drahomíra, Žáčková Petra, Šviráková Eva, Plocková Milada

Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha

Kmeny rodu *Lactococcus* se řadí mezi G^+ koky, mají kulovitý nebo vejčitý tvar a tvoří páry nebo řetízky. Řadí se mezi homofermentativní mikroorganismy a jejich optimální teplota růstu je 30 °C. Jednou z nejvýznamnějších vlastností těchto kmenů je jejich schopnost fermentovat sacharidy, především laktosu, což má velký význam především při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou. Laktokokové kmeny metabolizují laktosu na kyselinu mléčnou a díky produkci kyseliny mléčné dochází k poklesu pH uvnitř sýřeniny, snížení obsahu vlhkosti v sýřenině a snížení obsahu zbytkové laktosy v sýřenině (minimalizace metabolické činnosti nežádoucích mikroorganismů). Pro stanovení schopnosti fermentace laktosy (kysací schopnosti) u zkoumaných mikroorganismů byly vybrány následující metody: metoda stanovení kysací schopnosti za podmínek kultivace 21 °C/ 18 h, metoda stanovení kysací schopnosti za podmínek kultivace 30 °C/ 6 h, metoda stanovení míry produkce kyseliny mléčné na půdě GMA a metoda měření kysací schopnosti na přístroji Bac Trac 4100.

Pro stanovení kysací schopnosti zkoumaných kmenů mikroorganismů byla jako nejvhodnější vybrána metoda stanovení kysací schopnosti za podmínek kultivace 30 °C / 6 h a to z důvodu rychlosti a technologické využitelnosti (simulace podmínek při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou). Metodou míry produkce kyseliny mléčné na půdě GMA by bylo možno díky její jednoduchosti a přesnosti použít k odhadu kysací schopnosti velkého souboru zkoumaných kmenů. Stanovením kysací schopnosti na přístroji Bac Trac 4100 bylo dosaženo srovnatelných výsledků jako kultivační metodou, a z tohoto důvodu byl přístroj Bac Trac 4100 shledán vhodným pro stanovení kysací schopnosti velkého souboru zkoumaných kmenů.

Studium termofilních mikroorganismů z hlediska molekulární genetiky

Piterková Lucie, Skarkeová Martina, Melzoch Karel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

DNA termofilních mikroorganismů, které jsou zajímavé z obecně biologického hlediska, jelikož většina z nich žije a aktivně se rozmnožuje při teplotách, které jinak již působí letálně na řadu ostatních mikroorganismů, byla izolována z definovaného množství čisté kultury několika termofilních bakterií.

Pro izolaci a purifikaci bylo použito celkem šest rozdílných metod. Každá metoda byla specifická v každém izolačním kroku, ať už se jednalo o lýzi buněk, extrakci, precipitaci nebo purifikaci získané DNA.

Ve třech případech se jednalo o enzymatickou lýzi buněk, za použití různých koncentrací enzymů (lysozym, proteináza K), doby a teploty inkubace. Ve dvou případech o čistě chemickou extrakci pomocí různých detergentů jako je dodecyl sulfát sodný (SDS) nebo sarkosyl. V posledním případě byl použit komerční kit HIGHT PURE PCR Templetate preparation Kit (Roche) pro izolaci nukleových kyselin z bakterií a kvasinek.

Pro extrakci byla využívána zejména směs fenol:chloroform (1:1). Pro dokonalé odstranění veškerého zbytkového fenolu, který by později mohl rušit některá enzymová stanovení, bylo nutné provádět ještě opětovnou extrakci a to směsí chloroform:isoamylalkohol (1:24). Směs chloroform:isoamylalkohol (1:24) byla použita i jako hlavní extrakční činidlo hned v prvním kroku. Extrakce byla provedena i speciálním pufrem z HIGHT PURE PCR Templetate preparation Kit.

K vysrážení DNA z vodného roztoku pak byl použit 95% chlazený ethanol v kombinaci s acetátem amonným a sodným a isopropanol.

Získaná DNA ze všech použitých metod byla vizualizována pomocí elektroforézy na 1 % agarosovém gelu a kvantifikována pomocí spektrofotometrického stanovení při vlnových délkách 260 a 280 nm. Naměřené hodnoty pak umožnily vypočítat výtěžek DNA a koeficient čistoty na jejichž základě pak bylo možné stanovit optimální metodu pro izolaci genomické DNA z daných bakterií, která poskytuje největší čistotu a výtěžek DNA.

Prověření různých metod kultivace termofilních bakterií v bioreaktoru

Klišová Tereza, Rychtera Mojmír, Ferzik Stanislav, Petříková Kristýna

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo nalezení nejvhodnějšího způsobu kultivace termofilních aerobních bakterií na kapalně frakci obilných lihovarských výpalkách, nalezení nejvhodnější metody stabilizace materiálu, který již prošel anaerobním stupněm a zjistit, zda je možno vést aerobní termofilní proces jako autotermní, tj. bez zahřívání organického materiálu.

V průběhu všech kultivací byly udržovány tyto podmínky: teplota 55 °C a pH 6,57. Jako hlavní parametry posouzení průběhu kultivace byly zvoleny: CHSK (chemická spotřeba kyslíku), narůst biomasy, koncentrace organických kyselin v průběhu procesu a celkové množství dusíku a fosforu na začátku a konci kultivace.

Testování bylo provedeno přítokovým a kontinuálním způsobem. Přitom byla vyzkoušena regulace pO_2 (40 – 60 %) pomocí přídavků glycerolu, byl sledován vliv čistého kyslíku a různých zředěvacích rychlostí dávkování výpalků na průběh procesu. Použitý glycerol byl tvořen dehtovitým materiálem, který odpadá při rafinaci glycerolu a obsahuje asi 50 % glycerolu.

Ověření regulátoru teploty, který pomocí přítoků cukerného roztoku udržuje teplotu na konstantní hodnotě bylo provedeno mimo rozsah této práce pomocí kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, neboť autotermní proces při teplotě 55 °C nebylo možno udržet. Produkce tepla je jednak příliš pomalá a jednak tepelná izolace reaktoru a ztráty tepla do okolí (hlavně odváděným fermentačním plynem) byly příliš velké. S kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* se podařilo též úspěšně provést regulaci pO_2 .

Kontinuální kultivace se ukázala jako nejvhodnější, protože při ní dochází k nejvýraznějšímu poklesu CHSK. Přídavek čistého kyslíku do aeračního plynu má vliv na stabilitu procesu a na pokles celkové hodnoty CHSK (až o 71 %). Po anaerobním mesofilním procesu je vhodné zařadit aerobní termofilní stupeň, vsádkový nebo kontinuální, který přispěje ke stabilizaci kalu.

Úprava fermentačního média a kultivace termofilních mikroorganismů v podmínkách oxistatu

Maráková Michaela, Rychtera Mojmír, Ferzik Stanislav, Petříková Kristýna

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo studium termofilních procesů aerobní směsné kultury v podmínkách oxistatu při konstantní teplotě a pH a mesofilního dvoustupňového semikontinuálního procesu s anaerobní směsnou kulturou (byl použit čistírenský kal). Při kultivacích byla použita jako hlavní substrát kapalná frakce obilných lihovarských výpalků a při aerobních regulovaných kultivacích byl použit jako druhý uhlíkatý substrát - glycerolový odpad (z rafinace glycerolu).

Hlavním posuzovaným kritériem pro zhodnocení výsledků všech kultivací bylo sledování změny CHSK (chemická spotřeba kyslíku). U aerobních kultivací se ještě v průběhu vyhodnocovala koncentrace biomasy, organických kyselin, glycerolu a celkového dusíku a fosforu v médiu. U anaerobních kultivací se kromě CHSK a výše uvedených parametrů sledovalo množství produkovaného bioplynu a celkový pokles sušiny média.

Výsledky pokusů prokázaly, že lihovarské výpalky jsou i bez přídavku živin dobře rozložitelné v anaerobním i v aerobním prostředí a jako výhodné se ukázalo i spojení těchto dvou procesů. Aerobní kultivace probíhaly v podmínkách oxistatu a regulace koncentrace rozpuštěného kyslíku byla realizována pomocí přítoku druhého uhlíkatého zdroje - glycerolového odpadu. Přívod glycerolového odpadu pozitivně ovlivnil u aerobních kultivací snížení CHSK. Při aerobní kontinuální kultivaci se dosáhlo snížení až o 58 %.

U anaerobních mesofilních procesů jsme potvrdili jejich vysokou účinnost při odstraňování organických látek, neboť CHSK se snížilo o více než 90% a podařila se nám ve dvou pokusech dosáhnout produkce plynu kolem 0,2 m³/kg využití organické hmoty.

Vhodným spojením obou procesů se podařilo snížit organického znečištění o 94,1 %.

PID regulace DOC a teploty a její využití při degradaci lihovarských výpalků

Ferzik Stanislav, Melzoch Karel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem našeho projektu bylo prověřit možnosti dávkovacího peristaltického čerpadla ve spojení s regulátorem BIO-2 k regulaci dvou důležitých parametrů kultivací – koncentrace rozpuštěného kyslíku (DOC) a teploty. Obě veličiny byly řízeny pouze přítokem média při fed-batch kultivacích. Regulátor byl testován na dvou biologických systémech:

modelový systém s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* (použito pekařské droždí – průměrná sušina 27 hm.%).

Aerobní termofilní degradace lihovarských výpalků pomocí termofilních bakterií (použita směsná bakteriální populace z ČOV Bystřice pod Hostýnem)

K regulacím v modelovém systému bylo použito dávkování 20% roztoku glukosy a při regulacích termofilní degradace výpalků byl použit glycerolový odpad z rafinace glycerolu (SETUZA a.s., Ústí nad Labem) se zhruba 50% obsahem glycerolu. Kultivace byly prováděny ve 2-litrovém fermentoru Biostat (B.Braun International, Německo). Přítoky substrátu byl prováděn pomocí peristaltického čerpadla Verder Pericor (Verder, Rakousko) řízeného pomocí testovaného PID regulatoru Bio2 (BTC, Lotyšsko). Kultivace byly hodnoceny z hlediska měření DOC, změn CHSK, rozborů složení media pomocí HPLC a stanovení nárůstu biomasy.

V jednodušším modelovém systému se podařila optimalizovat regulace obou veličin poměrně úspěšně. U složitějšího termofilního systému se podařila regulace DOC, avšak regulace teploty pouze dávkováním glycerolového substrátu nebyla úspěšná z důvodů malé produkce biologického tepla nutného k ohřevu systému a také jeho velkým ztrátám kvůli nedostatečné izolaci systému (způsobené konstrukcí bioreaktoru). Celkově se jeví testované PID-regulační zařízení BIO-2, jako vhodný řídicí prvek při fermentacích jak laboratorních, tak i po jisté optimalizaci k praktickému využití v průmyslovém uspořádání.

Identifikace kmenů termofilních bakterií na základě profilu mastných kyselin

Churavá Alena, Paulová Leona, Šiříšřová Lucie

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo stanovení profilů mastných kyselin třech kmenů termofilních bakterií *Thermus ruber*, *Thermus sp.* a *Bacillus stearothermophilus* při teplotách 40, 50, 60, 65, 70 a 75°C a optimalizace metody.

Bylo testováno šest různých médií: LB médium, glukózové syntetické médium a čtyři citrátová média s různým obsahem vitamínů a různým zdrojem uhlíku (kyselina glutamová a trypton). S výjimkou LB média nerostly na žádném z médií všechny 3 testované kmeny. Všechny kmeny rostly pouze v teplotním rozsahu 40-70°C. Získané buněčné kultury byly lyofilizovány a ve dvou krocích byly připraveny methylestery mastných kyselin. Po saponifikaci 30% hydroxidem sodným následovala extrakce mastných kyselin dichlormethanem a po odpaření rozpouštědla esterifikace směsí fluoridu boritého v methanolu. Získané methylestery mastných kyselin byly analyzovány plynovou chromatografií; jednotlivé mastné kyseliny byly identifikovány porovnáním retenčních časů se standardy a jejich procentuální zastoupení bylo vypočteno z ploch píků.

Takto získané profily mastných kyselin bylo možné stanovit opakovatelně, zároveň se ale významně lišily mezi jednotlivými kmeny a byly významně odlišné i od profilu LB média. Profily závisely na kultivační teplotě, se vzrůstající teplotou klesal podíl mastných kyselin s rozvětveným řetězcem a podíl nenasycených mastných kyselin, který však nikdy nepřesáhl 3%.

Použitá metoda se jeví být dobře použitelná pro identifikaci bakteriálních kmenů vzájemným porovnáním profilu vzorku a profilu standardu, je však poměrně pracná a je třeba přesně dodržet kultivační teplotu.

Identifikace mikrobiálních kmenů ve směsných populacích optickými metodami

Maternová Jana, Melzoch Karel, Sekavová Barbora

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce byla zaměřena na sledování změn fyziologického stavu populací vinných kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces intermedius*, *Kloeckera apiculata* a *Candida stellata* s využitím průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie.

K charakterizaci kmenů kvasinek bylo použito 5 typů fluorescenčních barviv (rhodamin 123 pro sledování respirační aktivity, fluorescein diacetát ke studiu esterázové aktivity, propidium jodid k určení viability buněk a ke studiu buněčného cyklu, fluorescein isothiokyanát pro určení obsahu bílkovin a akriflavin pro měření obsahu glykogenu). Pro jednotlivá barviva byly nejprve nalezeny následující optimální koncentrace a doby inkubace s kvasinkami: rhodamin123 - 0,4 µg/ml, t_{inkubace} 10min; propidium jodid - 5µg/ml, t_{inkubace} 10min; fluorescein diacetát - 100µg/ml, t_{inkubace} 20min; fluorescein isothiokyanát - 0,5µg/ml, t_{inkubace} 30 min; akriflavin - 10 µg/ml, t_{inkubace} 30min.

Byla studována optická denzita, viabilita, esterázová aktivita, obsah bílkovin, DNA a glykogenu během kultivace kvasinek na YPD médiu. Také byl studován vliv různých teplot (4, 19, 28 a 37°C) a vliv odlišného složení média (médium obsahující pouze C-zdroj a Davis Broth médium bez C-zdroje) na jejich fyziologický stav.

Buňky narostlé na YPD médiu byly proměřeny na průtokovém cytometru, který měřil změny intenzity fluorescence, jež odpovídají změnám obsahu sledovaných látek v buňce. Tím lze rychle a snadno určit v jakém stádiu růstového cyklu se daná populace nachází.

Závěrem lze říci, že průtoková cytometrie a fluorescenční mikroskopie jsou vhodnými nástroji ke stanovení fyziologického stavu kvasinek a studiu vlivu vnějších stresových faktorů na fyziologii populací kvasinek.

Využití membránových technik při zpracování fermentačních médií

Klozová Jana, Melzoch Karel, Hábová Věra, Lapišová Kateřina

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Předložená práce se zabývá aplikací membránových separačních technik pro zpracování lihovarských výpalků, které jsou v řadě lihovarů problematickým odpadem doprovázejícím výrobu ethanolu. Separace výpalků byla prováděna pomocí keramických tubulárních membrán, jejichž separační rozsah pokrýval oblast od mikrofiltrace, přes ultrafiltraci až po nanofiltraci. Membrány byly zabudovány do modulu, který byl napojen na poloprovozní filtrační stanici *ARNO 600-BIO*.

Byly použity dva typy výpalků – obilné a bramborové lihovarské výpalky, které se významně lišily v některých svých vlastnostech.

Obilné výpalky byly separovány celkem ve dvou separačních sériích. V I. sérii byly použity membrány s velikostí pórů 0,2 μm a 300 kDa, v II. sérii 0,2 μm a 150 kDa.

Bramborové lihovarské výpalky byly separovány ve 4 sériích. V III. sérii byly použity membrány s velikostí pórů 0,2 μm a 150 kDa, ve IV. sérii 0,2 μm a 300 kDa, v V. sérii 300 kDa a 15 kDa a v VI. sérii separace probíhala přes membrány 150 kDa a 5 kDa.

Největším problémem membránových technik je zanášení pórů membrán částicemi filtrovaného média, tzv. membránový „fouling“, jehož důsledkem je pokles toku přes membránu. Za účelem obnovy toku přes membránu byla aplikována různá chemická činidla. Pro regeneraci membrán se nejvíce osvědčila lázeň s roztokem NaOH o počáteční teplotě 80 °C.

V průběhu jednotlivých experimentů byl pozorován vliv uspořádání membrán na účinnost a dynamiku separačního procesu. Lepší přečištění obou médií bylo dosaženo pomocí membrán s menší velikostí pórů. Na složení permeátu měla nejvýraznější vliv první membrána v sérii, docházelo zde k největšímu snížení obsahu stanovovaných látek. Pokles sledovaných analytů během separace byl nižší u bramborových výpalků, které na vstupu obsahovaly méně látek než obilné výpalky.

Uplatnění membrán při zpracování odpadů z potravinářského průmyslu

Lapišová Kateřina, Klozová Jana, Rychtera Mojmír, Melzoch Karel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

V souvislosti s výrazným zpřísněním legislativy v oblasti odpadů a odpadového hospodářství se hledají nové způsoby a možnosti jejich zpracování. Tento trend velmi přispívá k rozvoji membránových separačních technik a k jejich rychlému zavedení v širokém spektru oborů. V současné době se mění přístup k odpadním materiálům a začíná se prosazovat jejich komplexní využití jako vstupních surovin do dalších technologických procesů. Stále větší důraz je kladen na maximální využití a recyklaci cenných chemických látek.

Cílem je, aby všechny odpadní proudy byly určitým způsobem recyklovány, což by vedlo k vytvoření tzv. bezodpadové technologie. Výstupem z takového procesu by byl pouze požadovaný produkt. V zájmu průmyslových společenství je minimalizace nákladů na likvidaci těchto odpadů, což otevírá široké pole pro vývoj a aplikaci nových technologií, mezi něž bezesporu patří také membránové separační technologie. Současný dynamický rozvoj membránových separačních technologií přináší zlepšení v ekonomické dostupnosti membránového zařízení a přináší další možnosti jejich uplatnění.

Jednou z efektivních možností použití membránových separačních technologií je jejich využití při zpracovávání lihovarských výpalků. Svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (vysoká hodnota CHSK a BSK₅, nízké pH, riziko mikrobiální kontaminace, obtížná manipulovatelnost) představují lihovarské výpalky potenciální nebezpečí pro životní prostředí, ale zároveň mohou znamenat značné zvýšení rentability výroby zemědělského lihu.

V souvislosti s hledáním nových zdrojů energie byl v posledních letech znovu objeven ethanol, který lze využívat jako obnovitelný zdroj energie. Výroba (bio)ethanolu je výhodná zejména z ekologického a sociálně-ekonomického hlediska. Se zvyšující se výrobou (bio)ethanolu je však spojena i produkce lihovarských výpalků jako vedlejšího produktu. V závislosti na použité surovině a technologickém vybavení lihovaru připadá na výrobu 1 m³ lihu 11 – 14 m³ výpalků s obsahem sušiny průměrně 5 – 8 %. Z těchto důvodů byla řešena otázka jejich dalšího využití a konečného zpracování.

Jednou z možností jak řešit tento problém je recyklace lihovarských výpalků, kde by se získaná kapalná frakce vracela zpět do lihovarského procesu a nahrazovala tak určitý podíl vstupní technologické vody. Zkoncentrovaná část výpalků by dále byla využita pro přímé zkrmování nebo pro přípravu sušených krmných směsí. Ve srovnání s klasickými způsoby zpracování lihovarských výpalků (odstřeďování, zahušťování) jsou membránové separační techniky jednoznačně výhodnější, zejména z hlediska provozních nákladů.

Kultivace kvasinek v bioreaktoru

Horová Petra, Vlček Roman, Paulová Leona

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

souhrn neposkytnut