



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



2. seminář

PIVOVARSTVÍ A KVASNÉ TECHNOLOGIE 2005

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

31. března a 1. dubna 2005

Pořádající instituce:

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

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

Sponzoři:



IMMUNOTECH a.s.
DRINKS UNION a.s.
Budějovický Budvar n.p.
Pivovar Nymburk s.r.o.
Pivovary Staropramen a.s.
Plzeňský Prazdroj a.s.
JohnsonDiversey Česká republika, s.r.o.
Vulcascot, s.r.o.
REGOM INSTRUMENTS, s.r.o.

Přípravný a organizační výbor:

Předseda: Ing. Jaromír Fiala, Ph.D., e-mail: jaromir.fiala@vscht.cz
Členové: Ivana Dušková, e-mail: ivana.duskova@vscht.cz
Ing. Dagmar Feifířová, e-mail: dagmar.feifiricova@vscht.cz
Rudolf Jung, e-mail: rudolf.jung@vscht.cz
doc. Ing. Karel Melzoch, CSc., e-mail: karel.melzoch@vscht.cz
Ing. Jan Novák, e-mail: novkin@seznam.cz
Dr. Ing. Petra Patáková, e-mail: petra.patakova@vscht.cz
Dr. Ing. Leona Paulová, e-mail: leona.paulova@vscht.cz

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2005

ISBN 80-7080-583-8

Program:

Čtvrtek 31. března 2005 - Konferenční centrum VŠCHT Praha, kolej Sázava, areál vysokoškolských kolejí Praha 4 – Kunratice

8:00 – 9:00 Registrace účastníků

Přednášková sekce

9:00 – 9:10 Fiala J.: **Zahájení semináře**

9:10 – 9:30 Basařová G.: **Vzpomínka na prof. K. N. Ballinga - velkou osobnost pražské techniky**

Studijní zaměření: Sladařství a pivovarství

9:30 – 9:40 Koucký O., Dostálek P., Hrabák M.: **Vliv sladu na čírost sladin a filtrovatelnost piva**

9:40 – 9:50 Dvořáková M., Dostálek P.: **Stanovení polyfenolů pocházejících ze sladu a chmele v pivu**

9:50 – 10:00 Hofta P., Åkesson B., Önning G., Dostálek P., Dvořáková M.: **Chmel - zdroj přírodních antioxidantů**

10:00 – 10:10 Hulín P., Dostálek P.: **Stanovení rostlinných fenolů v pivu**

10:10 – 10:20 Denisovová H., Brányik T.: **Studium fyziologických změn pivovarských kvasinek**

10:20 – 10:30 Lehnert R., Brányik T.: **Aplikace imobilizovaných kvasinkových buněk pro pivovarské kvašení**

10:30 – 10:50 *Přestávka*

10:50 – 11:00 Fuchsová J., Kolouchová I.: **Vliv resveratrolu a jeho analogů na populaci kvasinek pod vlivem oxidativního stresu**

11:00 – 11:10 Vavrušková O., Dostálek P.: **Využití kvasničného glykanu v potravinářském průmyslu**

11:10 – 11:20 Štěrbá K., Dostálek P.: **Zpracování pivovarských odpadů**

11:20 – 11:30 Moravec J., Kropáček J., Baumruk M., Jungmann F., Fiala J.: **Optimalizace ošetření piva před stočením do transportních obalů KEG**

Studijní zaměření: Kvasná chemie a technologie

- 11:30 – 11:40 Klišová T., Patáková P., Heřman J.: **Analýza obrazu kvasinek**
- 11:40 – 11:50 Ferzik S., Melzoch K., Rychtera M.: **Degradační potenciál termofilních mikroorganismů při zpracování lihovarských výpalků**
- 11:50 – 12:00 Pondělíková H., Rychtera M.: **Kultivace aerobních termofilních mikroorganismů v prostředí s vyšší koncentrací buněk**
- 12:00 – 12:10 Zlámalová M., Širíšťová L., Paulová L.: **Vliv kultivační teploty na složení mastných kyselin termofilních bakterií**
- 12:10 – 12:20 Piterková L., Skarkeová M., Patáková P., Melzoch K. : **Identifikace termofilních bakterií metodami molekulární genetiky**
- 12:20 – 12:30 Skarkeová M., Patáková P.: **Studium termofilních mikroorganismů metodami molekulární biologie**
- 12:30 – 14:00 *Přestávka na oběd*
- 14:00 – 14:20 Rychtera M.: **Historie Ústavu kvasné chemie a bioinženýrství**
- 14:20 – 14:30 Sekavová B., Melzoch K., Postlerová L.: **Analýza mikrobiálních populací fluorescenčními technikami: stanovení viability termofilních bakterií**
- 14:30 – 14:40 Postlerová L., Sekavová B., Melzoch K.: **Studium fyziologických změn bakterií rodu *Thermus* v průběhu stárnutí populace**
- 14:40 – 14:50 Beránek J., Páca J., Bárta J.: **Mikrobní degradace nitroaromatických sloučenin v náplňových reaktorech**
- 14:50 – 15:00 Kučerová K., Kozáková D., Šviráková E., Plocková M.: **Rozlišení poddruhů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* pomocí fenotypových metod**

Studijní zaměření: Aplikovaná biologie a bioinženýrství

- 15:00 – 15:10 Janová A., Páca J.: **Mikrobní degradace fenolových sloučenin v batch a kontinuálním procesu**
- 15:10 – 15:20 Kostečková A., Pronayová Z., Bárta J., Páca J., Páca J.: **Aerobní degradace nitrofenolových látek v kontinuálním reaktoru směsnou populací**
- 15:20 – 15:30 Pronayová Z., Páca J., Kostečková A.: **Simultaneous biodegradation of phenol and 3-nitrophenol in a packed-bed bioreactor with an immobilized mixed population**

15:30 – 15:50 *Přestávka*

15:50 – 16:00 Bárta J., Páca J., Kostečková A., Pronayová Z., Bajpai R.: **Biodegradace nitroaromatických sloučenin ve vodném prostředí**

16:00 – 16:10 Klapková E., Páca J.: **Degradace směsi rozpuštědel užívaných v lakařském průmyslu v biotrickling filtru**

16:10 – 16:20 Novák V., Páca J.: **Hydrodynamické chování biotrickling filtru**

16:20 – 16:30 Čermáková A., Páca J., Halecký M., Jones K.: **Biodegradace benzínových par v biofiltru s šamotovou náplní**

16:30 – 16:40 Misiaczek O., Klapková E., Čermáková A., Páca J.: **Vliv teploty a vstupní koncentrace na degradační schopnosti dlouhodobě provozovaného biofiltru**

16:40 – 16:50 Daňha D., Siglová M.: **Význam aplikace aditiv při bioremediaci půdní matrice**

16:50 – 17:00 Gešev K., Čejková A.: **Interakce obalových vrstev mikroorganismů a huminových kyselin**

17:00 – 17:10 Javorková I., Mikeš J., Masák J.: **Produkce extracelulárních biopolymerů vláknitými houbami a jejich interakce s těžkými kovy**

17:10 – 17:20 Kubáč D., Masák J.: **Biotransformace nitrilů imobilizovanými bakteriálními biokatalyzátory**

Prezentace firem

17:20 – 18:00 Presentace firem

18:00 – 18:30 Diskuse

18:30 Závěr 1. dne

Pátek 1.dubna 2005 - 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

Vzpomínka na prof. K. N. Ballinga - velkou osobnost pražské techniky

Basařová Gabriela

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Prof. C.J.N.Balling (1805-1868) přednášel na pražské technice širokou škálu chemických teoretických a technologických předmětů. Výrazně ovlivnil vysokoškolskou výuku v oboru chemie rozšířením přednášek o analytickou chemii a prosazováním praktické výuky s dokonalou znalostí teoretických základů. Vychoval řadu odborníků kteří se stali jeho nástupci a zajistili výuku chemie, ale především kvasných výrob, hlavně pivovarství, po rozdělení pražské techniky na německou a českou vysokou školu právě na české technice.

Velký přínos světového významu měla vědecká práce prof. Ballinga. Nejdříve se věnoval výzkumu a praxi hutnického průmyslu, mnoho jeho bádání bylo z oblasti cukrovarnictví ale největší uznání vědecké erudice mu přinesly teoretické práce z oblasti fermentačních technik a jejich využití v praxi, především v pivovarství. Prof. Balling úzce spolupracoval s českými pivovarníky, uskutečňoval v pivovarech praktické zkoušky svých technologických námětů, jako zpracování náhražek sladu, úpravy chmelení, kvasného procesu, kontrolních metod apod.

Vliv sladu na čírost sladin a filtrovatelnost piva

Koucký Ondřej¹, Dostálek Pavel¹, Hrabák Miloš²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Výzkumný ústav pivovarský a sladařský

Tato práce je zaměřena na studium vlivu sladu na čírost sladiny a filtrovatelnost piva. Zvýšená pozornost je věnována vlivu rozluštění sladu na sledovanou problematiku a možnosti předpovědi zhoršené čírosti sladiny během scezování a filtrovatelnosti hotového piva pomocí analytických parametrů sladu, zejména pak využití výsledků Sarxova scezovacího testu.

Bylo uskutečněno 22 várek na třech rozdílných zařízeních: 12 várek čtvrtprovozních (30 l), 5 poloprovozních (200 l) a 5 várek v průmyslovém pivovaru (200 hl).

Během těchto várek byly sledovány zejména kvalitativní parametry sladiny, mladiny a piva. Byla kontrolována čírost, obsah potenciálně problematických složek - β -glukanů a pentosanů (arabinoxylanů) a u piva byla stanovována navíc filtrovatelnost.

Výsledky ukazují, že nižší stupeň rozluštění zrna zvyšuje obsah rozpustných β -glukanů ve sladině a tím negativně ovlivňuje viskozitu sladiny, to se projevuje i prodlouženou dobou scezování a zhoršením filtrovatelnosti piva. Důležitým parametrem pro sledovanou problematiku je obsah bílkovin, jejich vysoký obsah ve sladu zhoršuje čírost sladiny a zhoršuje filtrovatelnost piva. Použitelnost Sarxova testu pro reálnou předpověď filtrovatelnosti piva nebyla jednoznačně potvrzena.

Stanovení polyfenolů pocházejících ze sladu a chmele v pivu

Dvořáková Markéta, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Polyfenoly jako přirozené antioxidanty mají příznivý vliv na lidské zdraví svými protizánětlivými, antikarcinogenními a antimikrobiálními účinky. V práci byla použita optimalizovaná metoda stanovení polyfenolů pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí diodového pole. Jelikož tato detekce není příliš citlivá vzhledem ke koncentracím polyfenolů vyskytujících se v pivu, bylo nezbytné zakoncentrování vzorků. K zakoncentrování a izolaci polyfenolů z piva byla použita technika SPE (Solid Phase Extraction). V naší práci jsme testovali různé náplně SPE kolonek pro nejlepší izolaci a zakoncentrování polyfenolů a různé způsoby jejich eluce. Dále byly testovány různé druhy pív a porovnáván obsah jak celkových, tak vybraných jednoduchých polyfenolů. Nejvíce je v pivu obsažena, z námi testovaných jednoduchých fenolových kyselin, kyselina ferulová jejíž obsah se pohyboval v rozmezí 2-5 mg/l.

Chmel - zdroj přírodních antioxidantů

Hořta Pavel^{1,2}, Åkesson Björn², Önning Gunilla², Dostálek Pavel¹, Dvořáková Markéta¹

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Biomedical Nutrition, Lund University, Sweden

Byla zkoumána celková antioxidační kapacita (TAC) šesti českých odrůd chmele. Ke stanovení byly použity dvě metody, metoda s [2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid)] radikálem (ABTS⁺) a metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power). Obě metody dávaly velmi podobné výsledky ($r = 0.97$). Dále byla měřena TAC ve 27 čistých polyfenolových látkách pomocí dvou výše zmíněných metod. Obě metody dávaly obdobné výsledky ($r = 0.79$), avšak některé látky vykazovaly rozdílné hodnoty TAC. Z výsledků měření vyplývá, že obě metody lze používat na měření antioxidační kapacity chmelových výluhů. Dále byl stanoven obsah celkových polyfenolů chmele metodou podle EBC a metodou s Folin-Ciocalteu činidlem a obsah vybraných polyfenolových látek chmele metodou HPLC. Množství celkových polyfenolů v jednotlivých odrůdách silně korelovalo s hodnotami TAC stanovenými metou FRAP ($r = 0.99$) a metodou s ABTS činilem ($r = 0.99$).

Dalším cílem této studie bylo zjistit, jestli se po konzumaci piva, zvyšuje hladina antioxidantů v krvi. Studie probíhala na 12 dobrovolnících z řad studentů (6 mužů a 6 žen), kteří pili pivo typu „světlý ležák“, nealkoholické pivo a srovnávací nápoj. Odběry vzorků krve byly před napitím, 30 minut, 1 h, 2 h, 3h a 4 h po napití. Poté byla krev odstředěna a krevní plasma byla použita na stanovení parametrů oxidačního stresu a celkové antioxidační kapacity (TAC). Ke stanovení TAC byly použity opět dvě metody. Metoda s [2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzotiazoline-6-sulphonic acid)] radikálem (ABTS⁺) a metoda FRAP (ferric reducing antioxidant power). Pomocí těchto metod bylo prokázáno, že pivo zvyšuje celkovou antioxidační kapacitu plasmy, tudíž má prospěšné účinky na lidské zdraví.

Stanovení rostlinných fenolů v pivu

Hulín Petr, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Rostlinné látky fenolové povahy se vyskytují v pivu ve velmi nízkých koncentracích. Z tohoto důvodu je potřeba před vlastním stanovením tyto analyzované látky zakoncentrovat. Vhodnou metodou pro izolaci, purifikaci a zakoncentrování fenolových látek ze složité matrice je extrakce na pevné fázi. Byla testována vhodnost různých komerčních a nekomerčních sorbentů pro použití v této části analýzy.

Použité komerční sorbenty využívaly oktylových, oktadecylových, fenylových nebo kyanopropylových funkčních skupin, případně polyamidu jako reverzní fáze. Nekomerční sorpční materiály se sestávaly z křemeliny modifikované vrstvou polyamidu. Jejich schopnost zachytu byla kvantifikována pomocí měření úbytku celkových polyfenolů v pivu po kontaktu s 500 mg sorbentu. Sorpce se uskutečnila buď ve vsádce nebo na kolonce. Analýzou roztoku standardů byly získány hodnoty zachycení jednotlivých látek pro různé sorbenty. Všechny komerční a některé nekomerční sorbenty byly také použity pro analýzu jednoho druhu českého piva. Koncentrace detekovaných fenolových sloučenin se pohybovaly v jednotkách miligramů na litr. Jako nejúčinnější byly komerční sorbenty DSC-C8 a AccuBond C18, následované polyamidovým sorbentem DPA-6S. Nekomerční materiály dosáhly podobné míry účinnosti. Aceton se ukázal být vhodným činidlem pro eluci fenolových látek adsorbovaných na polyamidové reverzní fázi.

Dále byly stanoveny koncentrace vybraných fenolických sloučenin v několika vzorcích různých druhů běžně dostupných českých piv. Obsah vybraných fenolových látek korespondoval s obsahem celkových polyfenolů dle EBC.

Studium fyziologických změn pivovarských kvasinek

Denisovová Helena, Brányik Tomáš

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem práce bylo zjistit fyziologické změny pivovarských kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae* imobilizovaných v kontinuálním reaktoru.

Kontinuální kultivace byla prováděna při třech různých teplotách a to 15°C, 20°C a 25°C. Použitý kmen pivovarských kvasinek byl poskytnut pivovarem UNICER (Bebidas de Portugal, S.A., S. Mamede de Infesta, Portugalsko). V průběhu kultivace byla pomocí průtokové cytometrie a metody barvení methylenovou modří sledována změna viability volných i imobilizovaných buněk. Pomocí výsledků viability poskytnutých průtokovou cytometrií byla vypočítána specifická rychlost odumírání buněk. Dále byla pomocí průtokové cytometrie sledována změna relativního množství glykogenu a bílkovin.

Experiment ukázal, že viabilita volných buněk se drží po celou dobu pokusu na konstantní hodnotě. Drobný pokles viability a následný návrat k hodnotám blízkým počáteční nastává při náhlé změně kultivační teploty (teplotní šok). Naopak viabilita imobilizovaných buněk klesala s délkou kultivace a s hloubkou biofilmu. Při náhlé změně kultivační teploty došlo rovněž u imobilizovaných buněk k dočasnému poklesu jejich viability. Při studiu rychlosti odumírání imobilizovaných kvasinek se ukázalo, že na tuto rychlost má vliv teplota. Zvyšující se teplota kultivace způsobuje rychlejší odumírání imobilizovaných buněk, což potvrzují hodnoty specifické rychlosti odumírání imobilizovaných buněk (K_d). Vyšší obsah glykogenu a nižší počet pučících buněk byl nalezen v hlubších vrstvách imobilizovaného biofilmu. Výsledky sledování obsahu bílkovin ve volné a imobilizované biomase neumožňují vyvozovat obecné závěry.

Aplikace imobilizovaných kvasinkových buněk pro pivovarské kvašení

Lehnert Radek, Brányik Tomáš

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Výroba nealkoholického piva je založena na dvou odlišných principech. Prvním je omezení tvorby ethanolu a druhým je odstranění vzniklého alkoholu z běžného piva. Využití imobilizovaných kvasinek na pevném nosiči spadá do první kategorie. Využitím imobilizovaných kvasinek dosáhneme podstatného zkrácení doby fermentace a také vedlejších operací nutných při klasické výrobě. Nosičem pro imobilizaci jsou pluchy ječmene připravené úpravou mláta. Pro fermentaci byl zvolen gas lift reaktor. Měněnými parametry jsou teplota a zředovací rychlost. Sledovanými parametry pak jsou koncentrace sacharidů, ethanolu, volné biomasy a množství imobilizovaných buněk. Dále fyziologický stav jednotlivých buněk, redukce aldehydů pocházejících z mladiny a hladina diacetylu v hotovém nealkoholickém pivu.

Vliv resveratrolu a jeho analogů na populaci kvasinek pod vlivem oxidativního stresu

Fuchsová Jana, Kolouchová Irena

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

V rámci této práce byl studován vliv stilbenových fytoalexinů (*trans*-resveratrolu, *trans*-pinosylvinu a *trans*-pterostilbenu) na kvasinkovou buňku *Saccharomyces cerevisiae* ssp. *Malaga* za oxidačního stresu. Oxidační stres kvasinkových buněk byl vyvolán působením různých koncentrací peroxidu vodíku. Změny v chování kvasinkových buněk za oxidačního stresu byly sledovány na základě růstových křivek, změny v metabolismu stanovením aktivity katalasy a superoxiddismutasy. V souvislosti se stanovením aktivity katalasy a superoxiddismutasy byly hledány vhodné dezintegrační metody. Jako nejvhodnější dezintegrační metody se jeví použití tekutého dusíku a systému BioNeb. Dále byly provedeny experimenty ověřující toxicitu testovaných látek pro *S. cerevisiae* ssp. *Malaga*. Bylo zjištěno, že testované látky nevykazují v koncentračním rozmezí od 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ do 10 mg.l^{-1} výrazné inhibiční účinky na kvasinkové buňky *S. cerevisiae* ssp. *Malaga*. Mírné inhibiční účinky byly zjištěny u *trans*-pterostilbenu při koncentraci 10 mg.l^{-1} . Vliv H_2O_2 se projevil inhibicí růstu kvasinkových buněk a nárůstem aktivity katalasy a superoxiddismutasy. Přítomnost testovaných fytoalexinů při kultivacích měla patrný ochranný účinek na kvasinkové buňky *S. cerevisiae* ssp. *Malaga*.

Využití kvasničného glykanu v potravinářském průmyslu

Vavrušková Olga, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývá zpracováním odpadních pivovarských kvasnic na glykan a jeho následnou aplikací formou přídatné látky do nízkotučných jogurtů.

V laboratorním a poloprovozním měřítku byl připraven bílý preparát glykanu obsahující vysoké množství β -glukanů buněčných stěn. Ze získaného glykanu byly extrakcí odstraněny nežádoucí sloučeniny (lipidy). Velké shluky glykanu byly následně sonikací rozbity na menší částice. U nich byly sledovány viskoelastické vlastnosti – schopnost tvorby gelu, zdánlivá viskozita, vaznost pro vodu, olej a mléko.

Druhá část práce byla zaměřena na sledování rheologických a senzorických vlastností nízkotučných jogurtů obsahujících glykan. Textura nízkotučného jogurtu obsahující glykan byla srovnatelná se smetanovým jogurtem.

Zpracování pivovarských odpadů

Štěrbá Karel, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato přednáška se zabývá využitím odpadních pivovarských kvasnic a dotýká se i možností využití dalších pivovarských odpadů, např. mláta. Jsou rozebrány jednotlivé možnosti zpracování odpadních kvasnic, přičemž hlavní pozornost je zaměřena na získání polysacharidů z buněčných stěn.

Optimalizace ošetření piva před stočením do transportních obalů KEG

Moravec Josef¹, Kropáček Jan², Baumruk Miloš², Jungmann František², Fiala Jaromír¹

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²DRINKS UNION a.s., Ústí nad Labem

Cílem práce je porovnat různé možnosti závěrečného ošetření piva před stočením do transportních obalů, zhodnotit vliv různých metod ošetření na konečnou kvalitu piva, koloidní stabilitu a senzorické hodnocení konzumenty a optimalizovat způsob závěrečného ošetření piva před stočením do transportních obalů. Práce byla měřena ve dvou různých středně velkých českých pivovarech. Porovnávány byly tunelový pastér, membránový filtr, hloubkový filtr a průtokový pastér.

Porovnávání jednotlivých zařízení bylo provedeno sledováním rozdílných hodnot vybraných analytických parametrů piva před a po ošetření piva jednotlivými zařízeními zahrnujících barvu piva, pH, obsah alkoholu, extrakt, zákal, obsah polyfenolů, pěnivost NIBEM. Byla provedena šoková zkouška podle Basařové a Kahlera a senzorická analýza. Na cestě piva z ležáckého sklepa až po stočení byla měřena změna obsahu kyslíku v pivě a změna redoxního potenciálu. Získaná data byla zpracována statistickými funkcemi programu Microsoft Excel.

Na základě naměřených dat na zařízeních bylo prokázáno, že tunelová a průtoková pasterace mají negativní vliv na koloidní stabilitu piva, dochází k nárůstu barvy piva a ke změně senzorického profilu. Hloubková filtrace a membránová filtrace nemají vliv na koloidní stabilitu piva, ani na senzorický profil piva. Při ošetření membránovou filtrací dochází k poklesu pěnivosti. Z hlediska spotřeby energie byl tunelový pastér vyhodnocen jako zařízení s největší spotřebou energie, hloubková filtrace a membránová filtrace vykazovaly nejnižší spotřebu energie.

Bylo doporučeno přednostně používat hloubkovou filtraci nebo membránovou filtraci. V případě použití pastéru bylo doporučeno modernizovat průtokový pastér, což by snížilo tepelnou zátěž piva při odstávce stáčecí linky a usnadnilo ovládání pasterace. V obou případech pasterace je nutné minimalizovat odstávky stáčecí linky.

Analýza obrazu kvasinek

Klišová Tereza, Patáková Petra, Heřman Jakub

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem naší práce je sledování růstu kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula glutinis* v závislosti na různých kultivačních podmínkách a na přítomnosti různých stresových faktorů (NaCl, EtOH). Zaměřili jsme se na sledování změn tvaru a velikosti kvasinkových buněk, na sledování obrovských kolonií a na stanovení množství vyprodukovaných karotenoidních pigmentů. Provedli jsem několik pokusů v třepaných baňkách a v bioreaktoru.

Obrazová analýza byla využita při sledování změn tvaru a velikosti kvasinkových buněk a při sledování změn velikosti a barvy u obrovských kolonií. Pro vyhodnocení byl použit program LUCIA.

Obsah β -karotenu byl, po dezintegraci buněk, stanoven pomocí HPLC.

Degradační potenciál termofilních mikroorganismů při zpracování lihovarských výpalků

Ferzik Stanislav, Melzoch Karel, Rychtera Mojmir

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem projektu je studie degradačních schopností směsné bakteriální termofilní populace při různých podmínkách a možnost využití této kultury k degradaci lihovarských výpalků. V této práci jsem se zaměřil na porovnání aerobní termofilní a anerobní mezofilní degradace lihovarských výpalků.

Pro aerobní termofilní degradace lihovarských výpalků byla použita směsná termofilní bakteriální kultura z čističky odpadních vod v Bystřici pod Hostýnem a degradace byly prováděny ve dvoulitrovém laboratorním bioreaktor Biostat B (BBraun).

Anaerobní degradace lihovarských výpalků byly prováděna za pomoci aktivovaného kalu z centrální čističky odpadních vod v Praze 6, Podbabě na jednoduché dvou nádobové aparatuře.

Hodnocení procesů bylo prováděno:

- měřením změn CHSK během procesu degradace (spektrofotometrická metoda)
- měřením sušiny biomasy (gravimetrická metoda)
- HPLC analýzou kultivačního média

Aerobní termofilní kontinuální degradace lihovarských výpalků (55°C, pH 6,5, D 0,06h-1) dosahovala v laboratorním uspořádání srovnatelné redukce CHSK (~90%) jako laboratorní mezofilní anaerobním dvojstupňová degradace.

Aerobní termofilní degradace umožňovala dosáhnout vysokého zatížení systému – až 20,9 kg org.hmoty/m³·d (50,4 kg CHSK/m³d) při 90% redukci tohoto odpadu což je několikanásobně více než bylo publikováno v literatuře.

Spojení obou degradačních procesů pro zpracování lihovarských výpalků poskytovalo lepší výsledky v aerobně-anaerobním uspořádání, kdy bylo dosaženo 94% redukce CHSK a menšího množství sušiny ve vzniklé kalové vodě. Za anaerobní stupeň je však nutno umístit následný hygienizační krok pro stabilizaci a hygienizaci anerobního kalu.

Poděkování:

Panu Prof. Ing. M. Rychterovi a Doc. Ing. K. Melzochovi za vedení a rady při mé práci a všem spolupracovníkům za pomoc.

Kultivace aerobních termofilních mikroorganismů v prostředí s vyšší koncentrací buněk

Pondělíková Hana, Rychtera Mojmír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Práce byla zaměřena na zjištění možností zvýšení koncentrace buněk směsné aerobní termofilní bakteriální populace při kultivaci na modelovém médiu, které simuluje vlastnosti odpadní vody z potravinářského průmyslu. Termofilní aerobní mikroorganismy, i když se vyznačují vysokou degradační účinností, vykazují slabé nárůsty a zvýšení jejich koncentrace by mohlo přispět k dalšímu zvýšení degradačního účinku. Pro všechny experimenty byla použita směsná termofilní aerobní populace získaná z aerobní termofilní stabilizace kalu.

Semisyntetické médium obsahující glycerol (často se vyskytující složka v odpadech po zpracování tuků a při rafinaci glycerolu) sloužilo pro aerobní kultivaci termofilních mikroorganismů. Průběh kultivací byl monitorován kontinuálně (koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace CO₂ a O₂ v odcházejících plynech) a další důležité veličiny jako CHSK (mg/l O₂), koncentrace substrátu, koncentrace suché biomasy byly analyzovány z odebraných vzorků.

Vsádková kultivace vykazuje nárůst biomasy kolem 3 – 4 g/L, vstupní koncentrace substrátu o velikosti narostlé biomasy mnoho nerozhoduje. Při přítokované kultivaci, které se běžně používá ke zvýšení koncentrace biomasy se podařilo dosáhnout jen 6 g/L suché biomasy.

Kontinuální experimenty s úplným recyklem biomasy vykázaly po 100 hodinách koncentraci suché biomasy až 18 g/L. Pro separaci mikroorganismů byly použity keramické tubulární membrány s velikostí pórů 0,2 μm. Celý modul s 23 kanály byl dlouhý 17 cm a představoval filtrační plochu 0,05 m². Tato membránová jednotka byla součástí zařízení ARNO 600 – BIO (výrobce Mikropur s.r.o. Hradec Králové).

Práce ukázala, že vrácením mikroorganismů lze dosáhnout zvýšené degradace odpadních organických látek. Je však nutno zařízení pro tento účel upravit a zabývat se otázkou čištění membrán.

Vliv kultivační teploty na složení mastných kyselin termofilních bakterií

Zlámalová Marta, Siříšťová Lucie, Paulová Leona

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Předmětem této práce bylo sledování vlivu kultivační teploty na složení mastných kyselin u termofilních bakterií *Thermus species*, *Meiothermus ruber*, *Geobacillus thermoglucosidasius* a *Geobacillus stearothermophilus*. Teplotní rozmezí bylo zvoleno od 40°C do 80°C. Mikroorganismy byly kultivovány v komplexním mediu 48 hodin na třepačce při konstantní teplotě. Poté byla buněčná kultura lyofilizována a z této vysušené biomasy byla provedena nejprve izolace mastných kyselin varem v roztoku hydroxidu sodného a následně jejich derivatizace v kyselém roztoku methanolu. Připravené methylestery byly extrahovány do organického rozpouštědla, hexanu, a analyzovány na plynovém chromatografu. Získané chromatogramy neboli profily mastných kyselin byly identifikovány porovnáním retenčních časů se standardem BAME Supelco (bacterial acid methyl esters standard solution).

Získané profily mastných kyselin jednotlivých mikroorganismů se navzájem lišily. Byl potvrzen vliv kultivační teploty na spektrum mastných kyselin studovaných termofilních bakterií. Při nižších teplotách byly detekovány rozvětvené kyseliny s kratšími řetězci a hydroxylované kyseliny. S růstem kultivační teploty těchto látek ubývalo a naopak stoupal obsah většinových kyselin (iC15, iC17).

Metoda stanovení spekter mastných kyselin je rychlá a relativně nenáročná a díky její citlivosti ji lze použít jako metodu k identifikaci mikroorganismů.

Identifikace termofilních bakterií metodami molekulární genetiky

Piterková Lucie, Skarkeová Martina, Patáková Petra, Melzoch Karel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Metody molekulární biologie a klasické mikrobiologické metody byly použity pro identifikaci termofilních a mezofilních zástupců rodu *Bacillus*. Na celkem 8 kmenů, z toho 5 termofilních a 3 mezofilní, byly aplikovány následující metody: polymorfismus náhodně zmnožené DNA (RAPD), amplifikace intergenové oblasti 16S-23S rRNA (ITS-PCR) a polymorfie délky restrikčních fragmentů (RFLP) jak 16S rRNA tak produktů ITS-PCR reakce. Pro všechny výše uvedené metody byly optimalizovány jejich protokoly pro snadné laboratorní použití. Analýza RAPD byla provedena za použití dvou různých primerů. V obou případech se na agarózovém gelu po elektroforéze objevily specifické vzory, které umožnily rozlišení zkoumaných bakterií na druhové úrovni. Stejně tak i výsledkem amplifikace intergenové oblasti 16S-23S rRNA (ITS-PCR) byl profil skládající se z několik pruhů, což naznačuje variabilitu této oblasti pro jednotlivé bakterie a vhodnost jejího použití při identifikaci bakterií. Vzhledem k menšímu počtu pruhů na gelu bylo možné ITS-PCR profil lépe vyhodnotit a proto se také zdá být vhodnější pro běžné laboratorní použití. Pro restrikční analýzu (ITS-PCR RFLP, 16S rRNA RFLP) byly použity 4 restrikční endonukleázy, které po použití umožnily rozlišit bacily nejenom na druhové, ale i kmenové úrovni. Klasické mikrobiologické metody, optická mikroskopie a analýza digitálního obrazu kolonií narostlých na pevném médiu, byly též provedeny u všech 8 kmenů. Mikroskopické pozorování stejně jako fotografie narostlých kolonií nám umožnily pozorovat jen tvar, délku a šířku jednotlivých bakterií nebo kolonií. Tyto morfologické znaky však neposkytují dostatečné důkazy pro jejich správné rozlišení a následnou identifikaci.

Studium termofilních mikroorganismů metodami molekulární biologie

Skarkeová Martina, Patáková Petra

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo nalézt metody, které by umožňovaly rychlou a spolehlivou identifikaci termofilních mikroorganismů. Metody molekulární biologie a klasické mikrobiologické metody byly použity pro identifikaci termofilních i mezofilních zástupců rodu *Bacillus*.

Prvním krokem byla izolace DNA. Pro izolaci bylo použito pět metod a komerční kit ROCHE. Na základě výsledků byla vybrána metoda, která poskytovala nejlepší výtěžek a čistotu izolované DNA.

Na celkem 8 kmenů, z toho 5 termofilních a 3 mezofilní, byly aplikovány následující metody: polymorfismus náhodně zmnožené DNA (RAPD), amplifikace intergenové oblasti 16S-23S rRNA (ITS-PCR) a polymorfie délky restrikčních fragmentů (RFLP) jak 16S rRNA tak produktů ITS-PCR reakce. Pro všechny výše uvedené metody byly optimalizovány jejich protokoly pro snadné laboratorní použití.

Analýza RAPD byla provedena za použití dvou různých primerů. V obou případech se na agarózovém gelu po elektroforéze objevily specifické vzory, které umožnily rozlišení zkoumaných bakterií na druhové úrovni. Stejně tak i výsledkem amplifikace intergenové oblasti 16S-23S rRNA (ITS-PCR) byl profil skládající se z několika pruhů, což naznačuje variabilitu této oblasti pro jednotlivé bakterie a vhodnost jejího použití při identifikaci bakterií.

Pro restrikční analýzu (ITS-PCR RFLP, 16S rRNA RFLP) byly použity 4 restrikční endonukleázy, které zatím neposkytly uspokojující výsledky při identifikaci bakterií na druhové ani kmenové úrovni.

Historie Ústavu kvasné chemie a bioinženýrství

Rychtera Mojmír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství se řadí mezi jedny z nejstarších ústavů VŠCHT. Jeho počátky můžeme hledat již na Královském českém stavovském technickém učilišti v Praze (vznik v roce 1806). První zmínku o výuce kvasné a agrikulturní chemie lze spojovat se jmény profesorů Josefa Steinmanna (přednášky z pivovarství, vinopalství a octářství), jeho pokračovatel se stal Karel Napoleon Balling (1805 – 1868), který byl jmenován profesorem již ve svých třiceti letech. Prof. Balling byl významnou a mezinárodně uznávanou autoritou v chemii (hlavně kvasné chemii) tehdejší doby. V roce 1861 byl změněn název školy na Královský polytechnický zemský ústav v Praze. Mezi další významné osobnosti spojené s výukou fermentačních a potravinářských technologií konce 19. a začátku 20. století byli:

František Štolba (1839 – 1910), Antonín Bělohoubek (za jeho působení se v roce 1879 změnil název školy na c.k. českou vysokou školu technickou v Praze a tento název přetrval až do 1918, kdy byl změněn na Českou vysokou školu technickou a v roce 1920 již na České vysoké učení technické v Praze – ČVUT), Karel Kruis (1851-1917, orientace hlavně na lihovarství), Jan Šatava (1878-1938, pracoval hlavně v pivovarském oboru, zasloužil se o modernizaci ústavu kvasné chemie a mykologie v prostorách nynější VŠCHT jen s tím nezanedbatelným rozdílem, že prostory byly několikanásobně větší než v současné době, pracoviště bylo vybaveno pokusným pivovarem a lihovarem). Po smrti J. Šatavy v roce 1938 došlo ke změnám až po ukončení druhé světové války, kdy se poměrně v krátké době vystřídal několik vedoucích či jen osob pověřených vedením ústavu (prof. J. Bulíř, doc. Bohdan Jelínek). Souviselo to s dramatickými politickými změnami v poválečném Československu. Ve válečném období (1939 – 1945) byla budova VŠCHT zabrána pro potřeby německé armády. V prostorách ústavu bylo zřízeno výzkumné pracoviště wehrmachtu podřízené prof. Bernhauerovi (pracoviště se orientovalo na výzkum mikrobiální syntézy organických kyselin a antibiotik). Vedoucím nově zřízeného ústavu biochemicko-potravinářského (jeho součástí je i dřívější ústav kvasné chemie a mykologie) se stává po r. 1948 doc. MUDr. Arnošt Kleinzeller a v roce 1952 po jeho odchodu na Universitu Karlovu se v rámci nově zřízené Fakulty potravinářské technologie stává vedoucím doc. Ing. Dr. Josef Dyr, který byl jmenován i prvním děkanem vzniklé fakulty potravinářské technologie (v roce 1969 pak fakulta potravinářské a biochemické technologie) v rámci samostatné Vysoké školy chemicko-technologické a později i jejím rektorem. V této době působili jako učitelé na ústavu Vratislav Grégr, Věra Steinerová, externě Miloš

Herold, Iška Hauzar, Vladimír Krumphanzl, dále Mojmír Rychtera (od r. 1960), Josef Moštek (od r. 1963), Helena Honzová (provdaná Škodová, od r. 1963), Jaroslav Čepička (od r. 1964), Hana Čížková (od r. 1967), Vladimír Jirků (od r. 1972), Jan Páca (od r. 1973) a externě Jan Škoda. Po odchodu prof. Dyra do důchodu v roce 1970 převzal vedení katedry kvasné chemie a technologie prof. Grégr. V roce 1981 převzala vedení katedry kvasné chemie a bioinženýrství prof. Ing. Gabriela Basařová. V této době dále působili na katedře Jiří Uher, Stanislav Ondroušek, Bohumil Špaček, Jana Pelechová, Karel Melzoch, Jan Masák, Antonín Vávra, Aleš Vančura, Pavel Dostálek, Alena Čejková, Petra Patáková-Jůzlová, Jana Vernerová a řada externích učitelů. Na počátku akademického roku 1997/98 převzal vedení ústavu doc. Ing. Jaroslav Čepička, CSc. Do učitelského kolektivu přibyli ještě Jaromír Fiala, Martina Siglová, Věra Hábová. Od roku 2002 je vedoucím ústavu kvasné chemie a bioinženýrství doc. Ing. Karel Melzoch, CSc. Mezi nové učitele přišel Tomáš Brányik, Martin Halecký, Irena Kolouchová a Leona Paulová. V období 1952 - 1982 obhájilo diplomové práce 619 studentů řádného a dálkového studia, v letech 1983-91 pak 402 a v poslední době od r. 1992 kolem 400 studentů, tj. celkem 1061 studentů. Vysoký je i počet obhájených doktorských či dříve kandidátských disertačních prací. Ústav řeší celou řadu výzkumných projektů pro národní či evropské grantové agentury a podílí se na řešení několika průmyslových projektů. Aktuální informace lze získat na domovské stránce ústavu <http://www.vscht/kch/>

Analýza mikrobiálních populací fluorescenčními technikami: stanovení viability termofilních bakterií

Sekavová Barbora, Melzoch Karel, Postlerová Lenka

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Většina studií týkající se problematiky fluorescenčního barvení bakterií je zaměřena na mikroorganismy mezofilní, příp. na hypertermofilní archaea, termofilní bakterie s optimální teplotou růstu 55 – 85°C jsou opomíjeny, i přes stoupající možnosti jejich využití převážně při degradaci a dekontaminaci průmyslových odpadů.

Předmětem této studie bylo nalezení vhodných parametrů a optimalizace metodik stanovení buněčné viability termofilů pomocí různých fluorescenčních barviv, jak pro čisté kultury na komplexních médiích, tak pro nedefinovanou směsnou populaci termofilních mikroorganismů z aerobní degradace lihovarských výpalků. Testována byla barviva propidium iodid (PI), calcein acetoxymethyl ester (Calcein-AM), fluorescein diacetát (FDA) a BCECF-AM (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)- carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester), pro bakterie *Bacillus acidocaldarius*, *B. stearothermophilus*, *Thermus species*, *T. aquaticus* a *T. ruber*. K vyhodnocení experimentů byl využit průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie s následnou analýzou obrazu.

Studium fyziologických změn bakterií rodu *Thermus* v průběhu stárnutí populace

Postlerová Lenka, Sekavová Barbora, Melzoch Karel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce byla zaměřena na sledování morfologických a fyziologických změn bakterií *Thermus aquaticus*, *Thermus sp.* a *Thermus ruber* v závislosti na stárnutí populace a kultivační teplotě. Ke studiu jednotlivých parametrů byly využity přímé optické metody, konkrétně průtoková cytometrie a světelná a fluorescenční mikroskopie v kombinaci s následným zpracováním dat pomocí počítačové analýzy obrazu systémem LUCIA Imagine.

Za účelem sledování fyziologických charakteristik byly buňky barveny těmito fluorescenčními barvivy: propidium jodidem (PI) pro sledování membránové integrity a obsahu nukleových kyselin, fluorescein isothiokyanátem (FITC) k určení obsahu bílkovin, 5(6)-karboxyfluorescein diacetátem (CFDA) ke studiu aktivity esteráz, 3,3'-diethyloxakarbokyanin jodidem (DiOC₂(3)), rhodaminem 123 a bis-oxonolem za účelem sledování membránového potenciálu a 5-kyano-2,3-di-(p-tolyl)tetrazolium chloridem (CTC) ke studiu aktivity dehydrogenáz. Pro jednotlivá barviva a příslušné kmeny byly nejprve optimalizovány podmínky barvení. Bylo provedeno porovnání stanovení obsahu bílkovin spektrofotometricky a průtokovou cytometrií (v kombinaci s barvením fluorescein isothiokyanátem).

Sbírkové kmeny bakterií byly kultivovány za aerobních podmínek v Luria-Bertani médiu při teplotách 60°C, 70°C a 80°C. V průběhu kultivací byly pozorovány tyto morfologické parametry: plošný obsah, délka, šířka a cirkularita buňky. Studium fyziologie bakterií se opíralo o sledování integrity cytoplazmatické membrány, membránového potenciálu, esterázové aktivity, obsahu bílkovin a obsahu nukleových kyselin. Růst bakterií, jejich morfologie a fyziologie závisely na teplotě kultivace a růstové fázi. Maximální viabilita byla zaznamenána u buněk v exponenciální fázi růstu a přechodem do stacionární fáze prudce klesala.

Mikrobní degradace nitroaromatických sloučenin v náplňových reaktorech

Beránek Josef, Páca Jan, Bárta Jiří

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Práce se zabývá aerobní biodegradací nitrotoluenů z vodného prostředí v kontinuálních náplňových reaktorech pomocí imobilizované směsné mikrobiální populace.

Prvním cílem bylo porovnat zátěžové charakteristiky degradace směsi mononitrotoluenů na třech různých náplňových materiálech (Poraver, expandovaná břídlíce, šamot). Pokusy byly provedeny ve třech reaktorech označených A (Poraver), B (břídlíce) a C (šamot). Jako nejvhodnější náplňový materiál byla vyhodnocena expandovaná břídlíce.

Poté byly reaktory přestaveny, všechny byly naplněny expandovanou břídlicí. Testovala se schopnost mikrobiální populace odbourávat směsi nitrotoluenů při zkracování střední doby zdržení částic v reaktoru.

Buňky využívaly mononitrotolueny jako zdroj uhlíku a dusíku při době zdržení 10, 8, 4 a 2 hodiny. 2,4-dinitrotoluen nebyl degradován.

Vedle experimentů v kontinuálním uspořádání byly provedeny degradační testy v třepaných baňkách. Jako biokatalyzátor byla použita směsná populace izolovaná při přestavbě náplňového reaktoru s expandovanou břídlicí. Mononitrotolueny byly rozkládány, 2,4-dinitrotoluen nebyl buňkami odbouráván.

Rozlišení poddruhů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* pomocí fenotypových metod

Kučerová Kateřina, Kozáková Drahomíra, Šviráková Eva, Plocková Milada

Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha

Pro zajištění konstantní kvality vyráběných fermentovaných mléčných výrobků (sýrů, jogurtů, másla atd.) je nutné přesně charakterizovat složení a vlastnosti použité zákysové kultury, jejíž velmi významnou součástí tvoří laktokoky. Za tímto účelem se provádí fenotypická charakterizace dané kultury. Vzhledem k tomu, že u laktokoků může docházet ke ztrátě či naopak získání některých nových fenotypických vlastností, které mohou sloužit k rozlišení poddruhů *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris*, je fenotypizace ne zcela dostačujícím faktorem k rozdělení těchto dvou poddruhů. Z tohoto důvodu byly vyvinuty genotypické metody, které umožňují přesnější rozlišení těchto mlékařsky významných poddruhů laktokoků.

Ze sbírky 20 laktokokových kmenů byl pouze kmen NIZO B33 charakterizován jako poddruh *L. lactis* subsp. *cremoris*, zbylých 19 kmenů bylo určeno jako poddruh *L. lactis* subsp. *lactis*.

Fenotypické rozlišení poddruhů *L. lactis* subsp. *lactis* a *L. lactis* subsp. *cremoris* na základě hydrolýzy argininu, fermentace citrátů, tolerance k NaCl, pH a methylenové modři bylo průkazné. Fenotypické rozlišení poddruhů *lactis* a *cremoris* na základě jejich tolerance k teplotě a fermentace sacharidů bylo méně průkazné.

Mikrobní degradace fenolových sloučenin v batch a kontinuálním procesu

Janová Alena, Páca Jan

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývá aerobní biodegradací 2-nitrofenolu, 3- nitrofenolu a 4-nitrofenolu z vodného prostředí za použití směsné mikrobiální populace. Degradace byla sledována jednak v batch uspořádání, jednak v kontinuálních souprroudých náplňových reaktorech K2 a K3.

Během batch experimentů byly mononitrofenoly používány jako jediný zdroj uhlíku, dusíku a energie. Průběh degradace jednotlivých mononitrofenolů byl sledován při různých počátečních koncentracích. Při pokusech byly měřeny a vyhodnocovány následující parametry: Úbytek koncentrace mononitrofenolů, produkce metabolitu a hodnoty pH na začátku a na konci kultivace. Z naměřených hodnot byla následně vypočítána kinetika degradace jednotlivých mononitrofenolů.

V náplňovém bioreaktoru K2 byla sledována degradace směsi 3-nitrofenolu a fenolu. Vstupní koncentrace 3-nitrofenolu byla udržována na konstantní hodnotě (40 mg.L^{-1}), zatímco koncentrace fenolu byla postupně zvyšována (z 20 až na 90 mg.L^{-1}). V náplňovém bioreaktoru byla sledována degradace směsi všech tří mononitrofenolů. Vstupní koncentrace 2- and 3-nitrofenolu (15 mg.L^{-1}) byla udržována na konstantní hodnotě, koncentrace 4-nitrofenolu byla postupně zvyšována (z 15 až na 90 mg.L^{-1}). Pokusy byly zaměřeny na sledování organické zátěže, degradační rychlosti a degradační účinnosti.

Aerobní degradace nitrofenolových látek v kontinuálním reaktoru směsnou populací

Kostečková Alena¹, Pronayová Zuzana¹, Bárta Jiří¹, Páca Jan¹, Páca Jan Jr.²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Nitrofenolické sloučeniny tvoří významnou skupinu látek, které se jako průmyslové odpady dostávají do půdy, podzemní i říční vody a narušují tak přirozený ekosystém. Převážně se jedná o látky toxické pro většinu živých organismů, 4-nitrofenol (4-NF) je dále karcinogenní, mutagenní, cyto- a embryotoxický pro savce. Mononitrofenoly spolu s 2,4-dinitrofenolem jsou zařazeny na listině prioritních polutantů evidované US Environmental Protection Agency. Tyto látky nacházejí své uplatnění především v rámci syntézy mnohých pesticidů, plastů, azobarviv, výbušnin a farmaceutik. 4-nitrofenol je používán například při výrobě acetaminophenonu (paracetamolu), jednoho z nejpoužívanějších analgetik.

Pro první fázi experimentů, jenž byla zaměřena na adaptaci biodegraderů, byla použita směsná mikrobiální populace získaná ze zeminy dlouhodobě kontaminované nitroaromatickými látkami z podniku Synthesia Pardubice. Adaptace probíhala na třepáčkách za aerobních podmínek v Erlenmayerových baňkách obsahujících 100 ml BSM media při teplotě 28 °C. Jako jediný zdroj uhlíku byly použity roztoky mononitrofenolů (2-NF, 3-NF, 4-NF) s počáteční koncentrací jednotlivých látek 5 mg.L⁻¹.

Ve druhé fázi byla získaná směsná populace použita k inokulaci průtočného náplňového reaktoru (PBR) s anorganickými částicemi (velikost částic 4-8 mm) jako imobilizačním materiálem. Vnitřní průměr reaktoru byl 55 mm a výška lože 300 mm. Reaktor byl v průběhu degradačních experimentů provzdušňován. Zatěžování reaktoru bylo prováděno směsí všech mononitrofenolů změnami jejich vstupní koncentrace a dobou zdržení molekul v reaktoru.

Výsledky prokázaly, že biodegradabilita jednotlivých NF je tato:

$$4\text{-NF} > 3\text{-NF} > 2\text{-NF}.$$

Maximální dosažené rychlosti degradací pro jednotlivé MNF jsou:

$$1340 \text{ mg.L}^{-1}.\text{den}^{-1} \text{ pro 4-NF}$$

$$790 \text{ mg.L}^{-1}.\text{den}^{-1} \text{ pro 3-NF}$$

$$245 \text{ mg.L}^{-1}.\text{den}^{-1} \text{ pro 2-NF}.$$

Poděkování:

Práce byla finančně podporována Grantovou Agenturou ČR – projekt 104/03/0407.

Simultaneous biodegradation of phenol and 3-nitrophenol in a packed-bed bioreactor with an immobilized mixed population

Prónayová Zuzana, Páca Jan, Kostečková Alena

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

This study deals with the aerobic biodegradation of 3-nitrophenol (3-NP) and phenol from water using a mixed microbial population attached in a continuously operated concurrent packed-bed reactor (PBR). The wastewater was simulated by dissolving MNPs in distilled water amended with trace elements and 0.3 g.L^{-1} of phosphates (pH 7.5).

At a constant hydraulic retention time of 130 minutes, the microbial degradation of various concentrations of 3-NP in the presence of 40 mg.L^{-1} of phenol was studied. The maximum 3-NP concentration tested, namely 250 mg.L^{-1} , which corresponded to a total organic load of $3277 \text{ mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$, did not significantly disturb the degradation of phenol. Under these conditions, the 3-NP and phenol transformation rates were 2766 and $450 \text{ mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$, respectively. However, the removal efficiency of 3-NP became unstable and the effluent turn dark brown.

Thereafter, the loading by different concentrations on phenol in the presence of 40 mg.L^{-1} of 3-NP at a constant hydraulic retention time of 130 minutes was studied. Already at a phenol concentration of 45 mg.L^{-1} , the degradation of 3-NP become unstable was disturbed.

The concurrent aerobic packed-bed bioreactor configuration proved suitable for the remediation of wastewater contaminated with mononitrophenols. Since the catabolism of nitrophenols is oxygen-dependent, a sufficient aeration level proved crucial for optimal performance. If the oxygen transfer becomes rate limiting, the removal efficiencies drop rapidly. For that reason, continuous aeration has to be secured also in large-scale applications.

Biodegradace nitroaromatických sloučenin ve vodném prostředí

Bárta Jiří¹, Páca Jan¹, Kostečková Alena¹, Pronayová Zuzana¹, Bajpai Rakeshi²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²University of Missouri, Columbia, MO

Byla testována schopnost vybraných bakteriálních kmenů účinně degradovat vybrané mononitrotolueny (2-nitrotoluen, 3-nitrotoluen, 4-nitrotoluen) a dinitrotolueny (2,4-dinitrotoluen a 2,6-dinitrotoluen). Testy probíhaly s bakteriálními kmeny *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp.*, *Sphingobacterium multivorum*, *Sphingomonas sp.*, *Kluyvera cryocrescens*, *Comamonas testosteroni*, *Rhodococcus sp.* a *Stenotrophomonas maltophilia*. Výsledné hodnoty byly porovnány s degradační schopností směsné populace *Pardubice* izolované z kontaminované půdy v podniku Synthesia a.s., Pardubice. Byl také sledován nárůst buněk měřením optické density, dále byla sledována hodnota konečného pH. Byl také testován vliv přítomnosti NO₃⁻ iontů, které bývají přítomny v různých množstvích v odpadních vodách z muničních továren.

Výsledky ukázaly, že nejlepším degradérem mononitrotoluenů byl rod *Pseudomonas*, dalšími degradéry byly druhy *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhodococcus sp.* a *Comamonas testosteroni*. Jednoznačně nejlepších degradačních výsledků bylo dosahováno se směsnou populací *Pardubice*.

U dvou zmiňovaných dinitrotoluenů byly navíc otestovány dvě uměle konstruované směsné populace (3 kmenné a 5 kmenné konsorcia). Bylo prokázáno, že degradační účinnost stoupá v této řadě: 3 kmenné konsorcium > 5 kmenné konsorcium > směsná populace *Pardubice*.

Degradace směsi rozpouštědel užívaných v lakařském průmyslu v biotrickling filtru

Klapková Eva, Páca Jan

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Práce se zabývala degradací směsi hydrofilních a hydrofobních rozpouštědel (toluen, xylen, methylethylketon, methyl-isobutylketon, butyl acetát) z odpadního vzduchu v biotrickling filtru.

Reaktor se skládal z náplňové kolony a ze zásobní nádrže. Výška lože byla 1 m, vnitřní průměr 150 mm. Jako nosič byly použity Pallovy kroužky (polypropylen, 15 mm). Jako biokatalyzátor byla použita směsná mikrobiální populace obsahující 5 bakteriálních kmenů. Tato populace byla laboratorně připravena z primárních degradérů toluenu. Experimenty probíhaly při laboratorní teplotě 22 °C a konstantním pH 7.

Byl zkoumán vliv zvyšujícího se obsahu aromatických rozpouštědel ve směsi na degradační účinnost a dále vliv zvyšujícího se obsahu hydrofilních rozpouštědel ve směsi. Zvýšení obsahu aromatických rozpouštědel ve směsi vede k poklesu RE aromátů, ale nemá vliv na RE hydrofilních rozpouštědel. Zvýšení hydrofilních rozpouštědel ve směsi vede k prudkému poklesu RE aromatických uhlovodíků a nemá žádný vliv na RE hydrofilních rozpouštědel.

Poděkování

Tato práce byla finančně podporována Grantovou Agenturou ČR, projekt 104/02/0665

Hydrodynamické chování biotrickling filtru

Novák Vratislav, Páca Jan

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Charakteristickým znakem biotrickling filtru je intenzivní mezifázový styk. Znalostí hydrodynamiky bioreaktoru a následnou optimalizací provozních parametrů lze docílit vyššího degradačního výkonu. Na laboratorním reaktoru bylo provedeno měření doby homogenizace, doby prodlení částic v potrubí, střední doby zdržení částic v náplni a také dynamická zádrž kapaliny v náplni.

Biotrickling filtr byl sestaven ze skleněné kolony o rozměrech 1,50 x 0,15 m. Jako náplň byly použity Pallovy kroužky o průměru 25 mm. Výška lože byla 1 m. Pohyb částic v reaktoru byl sledován pomocí vodivostní elektrody. Při měření střední doby prodlení byla elektroda umístěna ve výtokovém potrubí v nejnižší části zařízení. Při měření doby homogenizace bylo čidlo umístěno zespodu ve sběrné nádobě.

Zádrž kapaliny v náplni byla nejdříve sledována při nulovém průtoku vzduchu a potom i při průtocích 20; 40 a 80 [l/min]. Při každém průtoku vzduchu bylo celkem proměřeno pět průtoků kapaliny čerpadlem {0,66; 1,98; 3,26; 4,05; 4,87 [l/min]}. Stejný postup měření byl použit i v případě doby homogenizace, střední doby zdržení částic a doby prodlení částic.

Závislost všech měřených veličin na průtoku vzduchu při konstantním průtoku kapaliny vykazovala stejný trend, a to téměř konstantní funkci. Pouze u závislosti zádrže kapaliny lze hovořit o křivce rostoucí, avšak s velkou mírou nejistoty, přihlédneme-li k nepřesnosti odečítání na stavoznaku. Zcela opačně se systém choval při měření závislosti na průtoku kapaliny při konstantním průtoku vzduchu. Střední doba prodlení klesala téměř exponenciálně, zatímco křivka zádrže rostla lineárně. Klesající průběh vykazovala i doba prodlení, ovšem nelineární.

Výsledky prokázaly minimální závislost hydrodynamických veličin na průtoku vzduchu při konstantním průtoku kapaliny. Logickým výsledkem je fakt, že střední doba zdržení částic klesala s rostoucím průtokem kapaliny a velikost zádrže kapaliny naopak vzrůstala. Toto ovšem platí pouze pro stávající podmínky měření, tzn. uspořádání reaktoru a druh náplně.

Biodegradace benzínových par v biofiltru s šamotovou náplní

Čermáková Adéla¹, Páca Jan¹, Halecký Martin¹, Jones Kim²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²South Texas Environmental Institute, USA

Dosud bylo publikováno jen velmi málo výsledků referujících o biodegradaci benzínu a benzínových par v odpadních plynech. Odbourávání benzínových par bylo testováno v laboratorním biofiltru o rozměrech ID 50 mm, výška lože 850 mm. Jako náplňový materiál bylo použito šamotové ostřívo. Biofiltr byl inokulován směsnou mikrobiální populací. Aklimatizace trvala tři týdny. Poté byla měřena zátěžová charakteristika. Biofiltr byl zatěžován vzrůstající vstupní koncentrací benzínu za konstantní doby zdržení plynu v biofiltru (EBRT) 16 minut. Při postupném zvyšování organické zátěže až na $17 \text{ g.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ klesla degradační účinnost aromatických uhlovodíků z 90 na 70 %, přičemž degradační účinnost alifatických uhlovodíků se snížila mnohem více a to z 60 na 10 %. Pro celkové benzínové uhlovodíky (TPH) bylo dosaženo eliminační kapacity $13 \text{ g.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ při 45 % degradační účinnosti.

Biofiltr byl po dobu zatěžování proléván roztokem minerálního média. Zátěžové charakteristiky naměřené bez přidávání nutrietů, kdy byl biofiltr zvlhčován destilovanou vodou, prokazují výrazný pokles v účinnosti degradace. Eliminační kapacita pro TPH dosáhla pouze hodnoty $3 \text{ g.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$ při degradační účinnosti 35 %.

Poděkování:

Tato studie byla finančně podporována Grantovou agenturou České republiky, grant č.: 104/05/0194.

Vliv teploty a vstupní koncentrace na degradační schopnosti dlouhodobě provozovaného biofiltru

Misiaczek Ondřej, Klapková Eva, Čermáková Adéla, Páca Jan

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Studie popisuje dlouhodobý provoz (520 dnů) laboratorního biofiltru degradujícího aceton (vnitřní průměr: 50mm, výška lože: 500mm, náplňovým materiálem byl perlit o mezerovitosti 0,1027), který byl v průběhu experimentu chlazen vodou z vodovodní sítě. Byl sledován vliv různé teploty chladicí vody (od 14 do 22°C) a vstupní koncentrace acetonu (udržována nad 300 mg.m³) na provozní charakteristiky biofiltru.

Reaktor byl inokulován směsnou mikrobiální populací obsahující Gram negativní bakterie (*Chrisobacterium indologenes*, *Methylobacterium sp.*, *Achromobacter sp.*), Gram pozitivní bakterie (*Microbacterium sp.*) a plísňe (*Alternaria sp.*, *Cephalosporium sp.*). V průběhu experimentu byly sledovány základní provozní parametry včetně organické zátěže (OL), eliminační kapacity (EC) a pH. Za pomoci SEM byla také provedena mikroskopická analýza struktury biofilmu.

Z výsledků pokusu vyplývá, že teplota chladicí vody měla výrazný vliv na výkon biofiltru. Při teplotě chladicí vody 14°C nedosáhl systém ustáleného stavu ani po 160 dnech provozu. Naproti tomu při vyšších teplotách dosahovaly hodnoty EC až 14 g.m³.h⁻¹.

Význam aplikace aditiv při bioremediaci půdní matrice

Daňha Dušan, Siglová Martina

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem předložené práce bylo posouzení skutečného vlivu známých a běžně využívaných bioremediačních přístupů na dekontaminaci půdního prostředí znečištěného ropnými produkty a vyhodnocení míry jejich účinnosti. Z tohoto pohledu byly testovány - adice alochtonní a autochtonní mikroflóry, biostimulace, přidavek povrchově aktivních látek a huminových kyselin.

Míra účinnosti daného bioremediačního přístupu byla určována pomocí respiračních testů a reprodukční aktivity přítomné mikroflóry. Z těchto nepřímých parametrů bylo usuzováno na postup biodegradačního procesu v průběhu krátkodobých laboratorních experimentů.

V testech byly používány reálné vzorky zemin, pocházející přímo z lokalit kontaminovaných ropnými polutanty. Konkrétně se jednalo o lokalitu Chemopetrolu Litvínov (rafinérsko-petrochemického komplexu s přidruženou chemickou výrobou) a skládky odpadů s.p. Diamo (tzv. laguny Ostramo).

Získané výsledky naznačily možnosti a omezení jednotlivých bioremediačních přístupů a vedly k závěru, že nejvýhodnějším přístupem je využití obohacení místního prostředí o bakteriální kmeny schopné degradace ropných polutantů získané z konkrétní lokality, na které probíhá sanace (tzv. autochtonní mikroflóra) a dále kombinace tohoto přístupu s biostimulací, nebo-li dodávkou N, P nutrientů. Využití směsných kultur založených převážně na alochtonech (lokalita Litvínov) přineslo pouze průměrné výsledky. Nejednoznačné závěry byly získány při testování surfaktantů jako aditiva umožňujícího zvýšit biodostupnost ropných látek. Jako částečně uspokojivé byly vyhodnoceny experimenty při nichž byla do půdní matrice aplikována huminová kyselina, která byla schopna průběh bioremediačních procesů mírně ovlivnit, avšak tento efekt je silně závislý na použité koncentraci huminových kyselin.

Interakce obalových vrstev mikroorganismů a huminových kyselin

Gešev Kristián, Čejková Alena

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Huminové látky jsou nedílnou součástí přírodních prostředí. Vyskytují se v půdě, vodě a sedimentech. Vznikají rozkladem organických zbytků živých organismů. Huminové látky jsou různorodé makromolekulární látky a jejich struktura dosud často není popsána. Tyto sloučeniny můžeme rozdělit na humin, huminové kyseliny a fulvinové kyseliny.

Huminové kyseliny (HA) dokáží působit na živé organismy. Již v minulém století byly hojně využívány pro jejich pozitivní vliv na rostliny. V poslední době se však ubírá pozornost na působení huminové kyseliny na mikroorganismy. Zkoumá se pozitivní vliv na růst mikrobiálních populací, na degradaci a bioremediaci polutantů.

Předmětem této práce bylo popsání vlivu huminové kyseliny na modelový mikroorganismus *Rhodococcus erythropolis*. Byly potvrzeny pozitivní vlivy HA na mikroorganismus při stresových podmínkách. Dále byla potvrzena sorpce HA na buněčný povrch a zjištěno, že množství sorbované HA se zvyšuje během růstu populace. Množství sorbované HA bylo do jisté míry kvantifikováno pomocí Freundlichových izoterem. V neposlední řadě byl potvrzen pozitivní vliv HA na degradaci modelové aromatické sloučeniny (fenolu). Bylo také popsáno množství intracelulárního fenolu a složení buněčné stěny za přítomnosti a bez HA.

Produkce extracelulárních biopolymerů vláknitými houbami a jejich interakce s těžkými kovy

Javorková Iva, Mikeš Jiří, Masák Jan

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Mikroorganismy submersně kultivované v přítomnosti stresových faktorů mají několik způsobů, jak se s těmito nepříznivými vlivy vyrovnat. Jedním z možných obranných mechanismů je produkce extracelulárních polysacharidů, které mohou účinky stresoru zmírnit nebo mu zcela zabránit.

Studium této problematiky bylo provedeno na modelovém vláknitém mikroorganismu – plísni *Aspergillus terreus*, která prokázala tvorbu těchto polymerů i bez použití negativních faktorů při kultivaci.

Ve své práci jsem se zaměřila zejména na studium různých kultivačních podmínek, které mohou ovlivňovat tvorbu exopolysacharidů. Tyto faktory zahrnovaly především vliv odlišného zdroje uhlíku a dusíku a jejich koncentraci, vliv pH, iontové síly, vápenatých a hořečnatých iontů a iontů těžkých kovů. Dále byla studována distribuce iontu těžkého kovu v systému biomasa – kultivační medium – exopolysacharidy. Bylo stanoveno též hrubé složení exopolysacharidů, což zahrnovalo množství všech cukrů a proteinů obsažených v produktu. Tvorba exopolysacharidů byla zdokumentována také fluorescenční mikroskopií barvením Alcianovou modří.

Biotransformace nitrilů imobilizovanými bakteriálními biokatalyzátory

Kubáč David, Masák Jan

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

V této práci byly studovány biotransformační schopnosti bakteriálního kmene *Rhodococcus equi* A4 k několika skupinám nitrilů. Jako biokatalyzátory byly použity rozpustná a imobilizovaná nitrilhydratasa a volné a imobilizované buňky tohoto kmene.

Pro imobilizaci volných buněk byla vybrána patentovaná technologie LentiKat[®], která byla již dříve pro biokatalytické aplikace úspěšně použita. Pro imobilizaci enzymu byla použita adsorpce na chromatografických materiálech a to Q-Sepharose a Phenyl- Sepharose. S imobilizovanými biokatalyzátory byly provedeny vsádkové i kontinuální reakce, s volnými buňkami a enzymem pak vsádkové reakce.

Jako substráty pro přípravu příslušných amidů a/nebo kyselin byly použity 2-metylnitrily 1a - 6a. Jako modelový substrát pro porovnání aktivit jednotlivých biokatalyzátorů byl použit benzonitril.

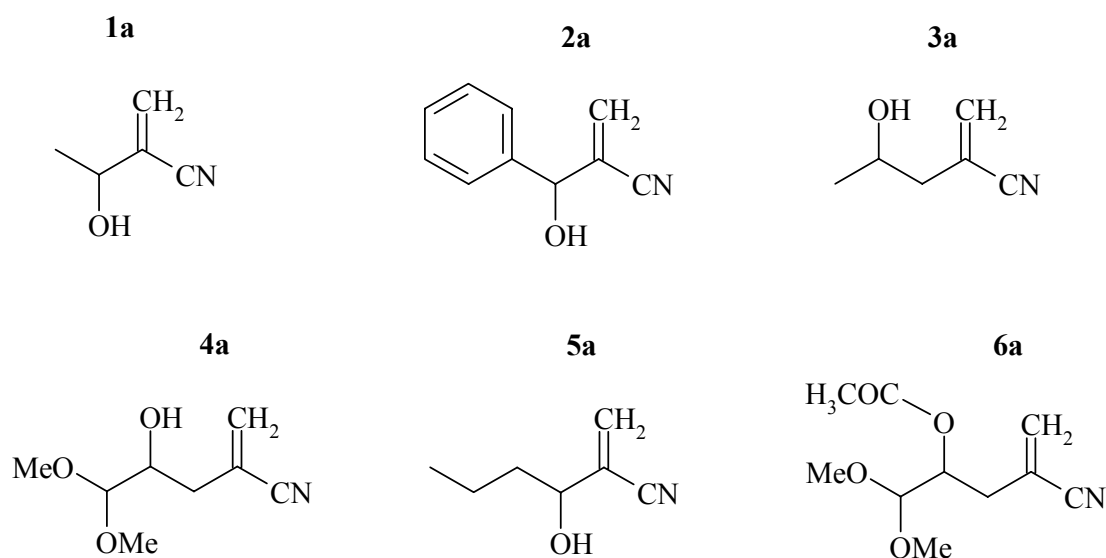


Schéma 1: Nitrily konvertované bakteriálním kmenem *Rhodococcus equi* A4.

Celé buňky transformovaly nitrily 1a - 5a na příslušné amidy 1b - 5b a po delší době reakce na příslušné karboxylové kyseliny 1c - 5c. K transformaci substrátů 1a, 2a a 5a byly použity též imobilizované buňky, které vykazovaly dobrou stabilitu při opakovaném použití (nejlepší v případě nitrilu 1a). Tento biokatalyzátor byl také vhodný pro opakovanou hydrataci benzonitrilu a 3-kyanopyridinu.

Standardy chirálních substrátů a produktů, připravených jako racemické směsi, byly analyzovány na chirálních kolonách Chiralcel OD-H, Chiralcel OJ. Byla nalezena možnost sledování enantioselektivity reakcí u některých substrátů. Pro některé substráty se stereogenním centrem v β -poloze (2a, 5a, 2b, 5b) byla zjištěna určitá enantioselektivita nitrilhydratasy a amidasy ($E = 3-4$).