



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



4. seminář

PIVOVARSTVÍ A KVASNÉ TECHNOLOGIE 2007

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

29. a 30. března 2007

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 Pernštejn a.s.
STAROBRNO, a.s.
Plzeňský Prazdroj a.s.

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

Rudolf Jung, e-mail: rudolf.jung@vscht.cz

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

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

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

Editor: Fiala J.

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

Rok vydání: 2007

ISBN 978-80-7080-015-7

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

Program:

Čtvrtek 29. března 2007 - 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.: **Historie názorů na zdravotní vlastnosti piva**

9:30 – 9:40 Dvořáková M., Dostálek P.: **Stanovení polyfenolů v ječmeni a sladu**

9:40 – 9:50 Brož A., Košin P., Šavel J.: **Důležité ukazatele kvality sladu pomocí FT-NIR spektrometrie**

9:50 – 10:00 Hulín P., Dostálek P.: **Bílkoviny ječmene a jejich změny v průběhu pivovarského procesu**

10:00 – 10:10 Lehnert R., Brányik T.: **Měření replikativního stáří kvasinek na principu selektivního barvení jizev po pučení**

10:10 – 10:20 Kuřec M., Brányik T.: **Stanovení vitality kvasinek na základě měření NADH v průběhu aerobně-anaerobního přechodu**

10:20 – 10:30 Valenta B., Brányik T.: **Vliv povrchových vlastností různých kmenů pivovarských kvasinek na jejich imobilizaci adhezí v průtočném reaktoru**

10:30 – 10:40 Slabý M., Fiala J.: **Monitorování fyziologické aktivity pivovarských kvasinek v provozních podmínkách**

10:40 – 11:00 *Přestávka*

11:00 – 11:10 Kruliš R., Karabín M., Dostálek P., Brányik T.: **Vývoj metody pro stanovení iso- α -kyselin a redukovaných iso- α -kyselin v pivu**

11:10 – 11:20 Dvořák J., Dostálek P.: **Stanovení karbonylových látek v pivu**

11:20 – 11:30 Janková L., Dostálek P.: **Srovnání metod pro odhad koloidní stability piva**

11:30 – 11:40 Kabelová I., Dostálek P.: **Stanovení volných aminokyselin v pivech a ve zrajících sýrech**

11:40 – 11:50 Zavadilová M., Fiala J.: **Využití ATP bioluminiscenčních metod pro sledování mikrobiální kontaminace piva**

- 11:50 – 12:00 Koucký O., Fiala J.: **Využití bioluminiscenční detekce ATP v pivovarech**
- 12:00 – 12:10 Novotná M., Patáková P.: **Srovnání metod průtokové cytometrie pro hodnocení fyziologického stavu mikrobiálních populací**
- 12:10 – 12:20 Lukčo M., Patáková P.: **Význam optických metod při sledování růstu kvasinek *Rhodotorula***
- 12:20 – 12:30 Krulíková T., Patáková P.: **Mnohobuněčný mikroorganismus**
- 12:30 – 14:00 *Přestávka na oběd*
- 14:00 – 14:10 Kroblová L., Melzoch K.: **Využití genetických metod k identifikaci bakterií rodu *Bacillus***
- 14:10 – 14:20 Norek M., Paulová L.: **Optimalizace kultivačních podmínek pro produkci proteinů pomocí geneticky upravené kvasinky *Pichia pastoris***
- 14:20 – 14:30 Baňarová M., Paulová L.: **Sledování vlivu kultivačních podmínek na fyziologický stav geneticky upravené kvasinky *Pichia pastoris***
- 14:30 – 14:40 Lipovský J., Rychtera M.: **Kultivace čistých a smíšených kultur termofilních bakterií na modelových a odpadních médiích**
- 14:40 – 14:50 Veselá K., Rychtera M.: **Produkce bioplynu imobilizovanou bakteriální populací**
- 14:50 – 15:00 Kočan J., Melzoch K.: **Bioetanol**
- 15:00 – 15:10 Abřlová M., Šviráková E., Plocková M.: **Lyze u laktokoků**
- 15:10 – 15:20 Miller P., Kučerová K., Chumchalová J., Míková K.: **Identifikace a antimikrobiální vlastnosti kmene *Enterococcus mundtii* EN3**
- 15:20 – 15:30 Hudáček J., Zalán Z., Chumchalová J., Halász A.: **Růst plesní v přítomnosti kmeňů rodu *Lactobacillus***
- 15:30 – 15:40 Dvořáková E., Dvořák M., Pavlasová M., Chumchalová J.: **Mikrobiologické vlastnosti vybraných fermentovaných sójových výrobků**
- 15:40 – 16:00 *Přestávka*

Prezentace firem

- 16:00 – 17:00 Presentace firem
- 17:00 – 17:30 Diskuse

Pátek 30. března 2007 - 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 názorů na zdravotní vlastnosti piva

Basařová Gabriela

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Zájem o poznání vlivu konzumace piva na lidský organismus se začal zvyšovat s rostoucí spotřebou tohoto nápoje a vývoj poznatků rostl v souvislosti s celkovým vývojem poznání a možnosti experimentální dokumentace.

O příznivých zdravotních účincích piva se psalo již v knihách ze středověku (na př., Lékářská kniha z roku 1580, technologie piva napsaná Tadeášem Hájkem z Hájku z roku 1585, publikace Knihy Hospodářské od K. Fišera z roku 1706 aj.) Hodnotily se především pozitivní a negativní vlivy dobrého a naopak špatného piva na zažívání. Aseptické vlastnosti chmele označované jako účinek proti kažení („hnutí“) piva se prezentovaly již od 12 století, stejně jako osvěžující význam piva vzhledem k vysokému obsahu vody. Od 15 století se akcentoval příznivý vliv kvasnic, od 19 století především pro obsah vitaminů a ve 20 století se z nich připravovaly doplňkové preparáty s příznivým vlivem na trávení a celkový stav organismu.

Velký rozvoj poznatků na vědeckém základě o zdravotních vlastnostech piva nastal od 18 století. Nejdříve byly zdůrazňovány vlivy na zažívání, od 30 let 20. století se zaměřil výzkum na příznivý vliv v oblasti kardiovaskulárních chorob a v současnosti jsou k dispozici práce o příznivých účincích antioxidačních vlastností piva na lidský organismus. Byly specifikovány látky z chmele a piva, které pozitivně působí na průběh klimakteria u žen, osteoporesu, aterosklerosu, nádorová onemocnění i vliv na pohodu a svěžest a pod. V každém případě je pivo alkoholický nápoj a jeho konzumace je vhodná v umírněném množství a pouze lidmi, kterým ze zdravotního hlediska tento spíše nízkoalkoholický nápoj nevadí.

Stanovení volných, vázaných a esterifikovaných polyfenolů ječmene a sladu

Dvořáková Markéta¹, Guido Luis F.², Barros Aguires A.², Dostálek Pavel¹

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²REQUIMTE – Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal.

Fenolové kyseliny, vázané na buněčné stěny klíčícího ječmene jsou velmi zajímavými potencionálními antioxidanty piv. Ve skutečnosti je antioxidační kapacita díky těmto vázaným sloučeninám přibližně dvakrát vyšší než aktivita volných fenolových sloučenin. Bylo analyzováno 10 fenolových sloučenin pomocí HPLC-DAD ve vzorcích ječmene a sladu před (volné fenolové sloučeniny) a po alkalické hydrolýze metanolového extraktu (vázané polyfenoly) a již extrahovaného sladového a ječného šrotu (esterifikované polyfenoly). Nejvyšší obsahy vykazovaly vázané kyseliny a to ferulová (113 – 243 mg/kg_{dw} ve sladu a 158 – 216 mg/kg_{dw} v ječmeni) a *p*-kumarová (11 – 74 mg/kg_{dw} sladu, 18-52 mg/kg_{dw} ječmene). Celkové polyphenoly stanovené metodou Folin-Ciocalteu se pohybovaly v rozmezí 358 – 668 mg kys. galové/kg_{dw} sladu a 211 – 573 mg kys. galové/kg_{dw} ječmene. Antioxidační kapacita (ARP- antiradical power) byla stanovena reakcí s 2,2 – diphenyl-1-picrylhydrazylem. Volné polyfenoly vykazovaly podobnou ARP u sladu i ječmene. Vázané polyfenoly mají hodnoty ARP mnohem vyšší u ječmene, kdežto esterifikované polyfenoly mají vyšší hodnoty ARP u sladu.

Důležité ukazatele kvality sladu pomocí FT-NIR spektrometrie

Brož Adam^{1,2}, Košin Petr^{1,2}, Šavel Jan²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Budějovický Budvar, n.p., České Budějovice

Infračervená spektrometrie v blízké oblasti spektra patří mezi moderní nedestruktivní metody, rozšířené v potravinářství. V pivovarském oboru byly v literatuře popsány s různou úspěšností mnohé aplikace umožňující předpověď důležitých analytických znaků sladu, chmele, sladiny, mladiny i hotového piva. Moderní přístroje s Fourierovou transformací přináší technické výhody. Měří se tzv. interferogram, který se matematickou úpravou převádí na absorbní či transmisní spektrum. Při měření interferogramu dochází ke snímání všech vlnových délek nastaveného spektrálního rozsahu současně, přístrojem prochází více energie a snímáním polohy pohyblivého zrcadla laserem je zajištěna vlnočtová správnost.

Z pohledu absorbovaných kvant záření se jedná v oblasti NIR o svrchní tóny a kombinační přechody zejména OH, SH, NH, CH a CO skupin, jejichž odpovídající fundamentální přechody se nacházejí ve střední oblasti spektra.

Ve vzorcích sladu je tak možné pozorovat především absorpce látek sacharidické a bílkovinné povahy a jejich štěpy. Vzhledem k difúznímu charakteru spekter je však nutné k jejich zpracování použít speciální chemometrický software.

V práci byl použit přístroj FT-NIR MPA společnosti Bruker Optics, Německo. Spektra cca 150 vzorků sladu připravených na mikroskladovně VÚPS Brno monitorujících sklizeň v České republice byla změřena v módu reflexe s rotací vzorku. Vzorky nebyly před měřením nijak upravovány. Kalibrační modely byly sestaveny za pomoci softwaru OPUS 5.5 QUANT, který byl součástí příslušenství přístroje. Modely se ověřily křížovou validací. Velmi dobré výsledky přepovědi s vysokým determinačním koeficientem (ve všech případech $R^2 > 75$) a uspokojivé hodnoty odmocniny střední kvadratické chyby křížové validace (RMSECV) byly dosaženy u znaků extrakt v sušině, bílkoviny v sušině, rozpustný dusík ve sladince, Kolbachovo číslo a relativní extrakt při 45°C.

Při porovnání chyb modelů s intervaly reprezentujícími opakovatelnost a reprodukovatelnost použitých referenčních metod dle analytiky EBC lze říci, že FT-NIR modely je možné použít k rychlé předpovědi uvedených znaků, zvláště při monitoringu sklizně či dodávek sladu vyžadujícím vyšší četnost rozborů. Výhodou je rychlost, jednoduchost a absence nutnosti úpravy vzorku, nevýhodou pak potřeba aktualizování kalibračních modelů při změně matrice vzorků, menší přesnost a vysoká cena přístroje.

Bílkoviny ječmene a jejich změny v průběhu pivovarského procesu

Hulín Petr, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Prolaminy jsou zásobní bílkoviny ječmene, které jsou nerozpustné vodou nebo roztoky solí, ale zároveň jsou rozpustné ve zředěném etanolu. Z pivovarského hlediska se hordeiny a jejich štěpné produkty podílejí na tvorbě a stabilitě pěny a na vzniku polyfenol-bílkovinných zákalů. Tyto proteiny a peptidy jsou rovněž alergenní pro osoby s onemocněním zvaným celiakie.

Pro stanovení lepkových bílkovin v potravinách jsou určující limity zavedené v Codexu Alimentarius (revidovaný standard CX/NFSDU 00/1). Pro analytické účely se běžně předpokládá, že lepek je z poloviny tvořen prolaminami a z poloviny gluteniny.

Elektroforetické a chromatografické analytické metody jsou využívány pro podrobnější frakcionaci hordeinů na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti, elektrického náboje, případně hydrofobicity. Pro citlivé a specifické stanovení hordeinů a jejich derivátů z hlediska jejich alergenních účinků se používají imunochemické metody. Jejich principem bývá buď detekce prolaminových bílkovin, nebo detekce pšeničné DNA. Nejpoužívanější metodou ke stanovení prolaminů je ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), založená na interakci specifické protilátky s antigenem.

Pomocí SDS-PAGE byly rozděleny hmotnostní frakce bílkovin piva a prolaminů sladu, ječmene a dalších cereálií. Byly připraveny monoklonální protilátky proti etanolovému extraktu bílkovin ječmene a byly testovány křížové reakce mezi prolaminami různých cereálií. Byla provedena optimalizace podmínek ELISA metody za podmínek nepřímé kompetice a stanoveny detekční limity stanovení.

Měření replikativního stáří kvasinek na principu selektivního barvení jizev po pučení

Lehnert Radek, Brányik Tomáš

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

V posledních letech dochází k nárůstu poptávky po nealkoholických pivech. Bylo vyvinuto nepřeberné množství způsobů výroby nealkoholických piv. Jedním z možných způsobů je kontinuální fermentace s imobilizovanými buňkami. K největším výhodám této metody patří zejména vysoká produktivita systému. Oproti vsádkové fermentaci je zde však riziko replikativního stárnutí a následného umírání populace imobilizovaných kvasinek. V této práci jsme vyvíjeli metodu sledování stárnutí imobilizovaných buněk. Ke sledování stárnutí bylo zapotřebí nejprve zhotovit kalibrační přímku odezvy počtu buněčných jizev po pučení. K tomu jsme použili značení buněk biotinem a následnými opakovanými kultivacemi jsme nechali tyto značené buňky replikativně zestárnout. K izolaci buněk jsme použili známou vysoce selektivní reakci biotinu (navázaný na aminoskupiny postranních řetězců aminokyselin) se streptavidinem. Streptavidin navázaný na paramagnetických kuličkách specificky zreagoval s biotinem navázaným na povrchu buněčné stěny a takto připravené buňky byly odebrány pomocí magnetu ze směsi značených a neznačených buněk. Posledním krokem bylo barvení buněčných jizev po pučení fluorescenčním barvivem. Odezva byla sledována jak počítáním jizev pod fluorescenčním mikroskopem, tak i měřením intenzity fluorescence těchto buněk na průtokovém cytometru. Metoda měření fluorescence obarvených jizev na povrchu buněčných stěn byla aplikována na sledování replikativního stárnutí imobilizovaných kvasinek v průběhu 3 měsíce dlouhé kontinuální fermentace nealkoholického piva.

Stanovení vitality kvasinek na základě měření NADH v průběhu aerobně-anaerobního přechodu

Kuřec Michal, Brányik Tomáš

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Znalost fyziologického stavu násadních kvasnic v pivovarském procesu je důležitým nástrojem k odhadu průběhu kvašení. Kromě standardní metody barvení methylenovou modří, která určuje procento mrtvých buněk, se dále pro stanovení aktivity kvasnic používají metody jako acidifikační test, měření obsahu glykogenu atd. Jednou z dalších metod by mohla být metoda měření obsahu NAD(P)H v buňkách při přechodech z aerobních do anaerobních podmínek. Cílem této práce bylo seznámit posluchače s principem této metody a srovnat tuto metodu s dalšími metodami používanými běžně v pivovaru.

Princip metody spočívá v měření obsahu redukované formy kofaktoru NAD(P)H pomocí fluorescence. Využívá se toho, že fluorescenční vlastnosti má pouze redukovaná forma kofaktoru. Měří se pak rozdíl obsahu redukované formy v aerobních a anaerobních podmínkách vyjádřen jako relativní fluorescence *rel. F*, případně rychlost přechodu fluorescence z aerobních do anaerobních podmínek (dF/dt).

Použitelnost metody byla sledována během vsádkového pokusu. Kvasnice byly ponechány při 20°C a docházelo u nich ke stárnutí vlivem nedostatku živin. V průběhu pokusu bylo sledováno % mrtvých buněk a byl měřen acidifikační test. Z výsledků je patrné, že relativní fluorescence *rel. F* korelovala lépe s procentem mrtvých buněk než celková acidifikační síla kvasnic a to s korelačním koeficientem 0,89.

Závěrem lze říci, že metoda sledování obsahu NAD(P)H je použitelná ke stanovení vitality kvasnic. Použitelnost metody je ovšem nutné potvrdit dalšími experimenty a sledovat například vliv inhibitorů kvašení nebo počet nasazení kvasnic a aplikovat tak tuto metodu v běžné pivovarské praxi.

Vliv povrchových vlastností různých kmenů pivovarských kvasinek na jejich imobilizaci adhezí v průtočném reaktoru

Valenta Bohumil, Brányik Tomáš

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Jedna z technologicky významných vlastností buněčné stěny pivovarských kvasinek, je její schopnost ulpívat k jiným buňkám resp. pevným povrchům. Tento, pro pivovarské kvasinky charakteristický jev, je na konci hlavního kvašení využíván při technologicky velice důležitém separačním procesu pomocí flokulace a při imobilizaci kvasinek na pevné nosiče (například mláto, celulózní materiály a další). Podstatný vliv na buněčnou adhezi a flokulaci mohou mít fyzikálně-chemické povrchové vlastnosti kvasinek (např. hydrofobicita a povrchový náboj).

Přilnavost kvasinek k částicím upraveného mláta byla zkoumána na třech různých kmenech pivovarských kvasinek (dva spodně kvasící a jeden svrchně kvasící). Na základě experimentálně určených parametrů byly pomocí DLVO teorie a mezifázových volných energií vypočteny výsledné interakční energie pro systém buňka-buňka a buňka-nosič, pomocí nichž byly pro tyto kmeny předpovězeny adhezní vlastnosti. Role fyzikálně-chemických povrchových vlastností pak byla zhodnocena na základě porovnání těchto předpovědí s výsledky skutečné imobilizace v kontinuálním gas-lift reaktoru.

Pro oba spodně kvasící kmeny (96 a 55) byly výsledky z kontinuálního experimentu v souladu s předpovězenými adhezními vlastnostmi. Kmen 96, u něhož se očekávala energeticky stabilnější adheze k částicím nosiče, skutečně prokázal rychlejší schopnost imobilizace než kmen 55. Navíc u něho bylo dosaženo vyšší maximální koncentrace imobilizované biomasy, což může mít spojitost s jeho silnou flokulační schopností.

V rozporu s teoretickými předpoklady, svrchně kvasící kmen číslo 75 na částice mláta vůbec neulpíval. Vysvětlení této neshody bude zřejmě nutné hledat v oblasti specifických biochemických interakcí, které musí být dále podrobně studovány.

Monitorování fyziologické aktivity pivovarských kvasinek v provozních podmínkách

Slabý Martin, Fiala Jaromír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Stav kvasnic nasazovaných do provozních podmínek má zásadní vliv na kvalitu výsledného produktu, proto je nedílnou pivovarskou rutinou kontrolovat a optimalizovat všechny procesy spojené s kvasnicemi. Pro tento účel je mnoho metod, některé klasické, osvědčené jsou ovšem časově a manuálně náročné. Naproti tomu jsou nové metody, jež jsou rychlé, ale často dražší.

Při této práci byl hlavní úkol zmapovat stávající stav v pivovarském provozu a navrhnout vylepšení případných nedostatků při propagaci a úchově kvasnic.

Práce byla rozdělena do tří částí podle mapovaného úseku provozu a to na propagaci, odstřel kvasnic a jejich úchovu. Nosnou metodou této práce byla průtoková cytometrie. U propagace se využívalo přímého počítání živých buněk a měření DOC. Při sledování odstřelů a úchovy kvasnic byl využíván acidifikační test, s nímž byla srovnávána stanovení hydrofobicity vytřepáváním do isooktanu. Při sledování úchovy kvasnic byla použita metoda stanovení glykogenu spektrofotometricky.

Růstové křivky v průběhu propagací vykazovaly zlom a to pravidelně po poklesu DOC pod $15\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Tyto změny nastaly vždy 1 až 2 hodiny po zmíněném poklesu DOC. Dále bylo při laboratorním skladování kvasnic zjištěno, že pro ověřované kvasnice je nejvhodnější úchova pod karbonizovanou vodou.

Vývoj metody pro stanovení iso- α -kyselin a redukovaných iso- α -kyselin v pivu

Kruliš Radim, Karabín Marcel, Dostálek Pavel, Brányik Tomáš

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo ověřit možnosti použití HPLC s UV detekcí ke spolehlivému stanovení iso- α -kyselin ve vzorcích piv včetně rozdělení a identifikace *cis*- a *trans*- isomerů jak neredukovaných, tak redukovaných forem. Optimalizace metody zahrnovala výběr vhodné alkalické mobilní fáze, vhodné kolony a dalších podmínek umožňujících účinnou separaci sledovaných látek.

Součástí této práce byly analýzy vzorků 49 tuzemských i zahraničních světlých piv. U každého vzorku byla provedena identifikace a kvantifikace jednotlivých isomerů. Výsledky měření poskytly údaje o přítomnosti redukovaných iso- α -kyselin, a jejich množství, dále o konstantním vzájemném podílu humulonů, kohumulonů a adhumulonů a umožnily stanovit poměr *cis*- a *trans*- isomerů v pivu.

Analýza piv vystavených slunečnímu světlu umožnila sledovat rozklad iso- α -kyselin a zároveň byla potvrzena fotostabilita jejich redukovaných forem.

Porovnáním metody stanovení iso- α -hořkých kyselin HPLC se starší spektrofotometrickou metodou ukázala rozdíl mezi jednotkami hořkosti a skutečnou koncentrací iso- α -kyselin v pivu. Výhodou HPLC metody je její selektivita, oproti spektrofotometrické metodě nejsou výsledky zatěžovány chybou, kterou způsobuje interference ostatních látek.

Stanovení karbonylových látek v pivu

Dvořák Josef^{1,2}, Dostálek Pavel¹, Kellner Vladimír^{1,2}

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Výzkumný ústav sladařský a pivovarský, a.s.

Důležitost stanovení karbonylových látek piva spočívá zejména v jejich vlivu na senzorickou kvalitu piva a dále ve spoluutváření senzorického profilu piva. Některé karbonylové sloučeniny obsažené v pivu jsou také považovány za indikátory jeho stárnutí.

Karbonylové látky piva vznikají zejména: Streckerovým odbouráváním aminokyselin, oxidační degradací iso-hořkých kyselin, autooxidací mastných kyselin, enzymatickou degradací lipidů, oxidací vyšších alkoholů, aldolovou kondenzací nižších karbonylů a sekundární oxidací vyšších nenasycených aldehydů.

K analytickým metodám stanovení karbonylových látek piva v minulosti patřila celá řada titračních a spektrofotometrických metod, které se již dnes většinou nepoužívají. V současnosti se pro stanovení těchto látek používá moderních metod GC/MS a HPLC, využívajících derivatizaci činidlem v roztoku nebo SPME, které tak umožňují získat nové poznatky o tvorbě a chování těchto sloučeninách v pivu.

Srovnání metod pro odhad koloidní stability piva

Janková Lucie, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem práce bylo porovnat vybrané rychlé a v pivovarské laboratoři relativně jednoduše realizovatelné metody pro předpověď koloidní stability piva a posoudit, zda lze některou z nich nebo jejich kombinaci použít pro předpověď přirozené trvanlivosti.

Práce byla provedena na českých pivech pocházejících z 11 různých pivovarů. Byla sledována přirozená trvanlivost vzorků měřením chladového a permanentního zákalu během jejich stárnutí v komerčním obalu. Na počátku trvanlivosti byly vzorky podrobeny predikčním testům: srážení síranem amonným, stanovení tanoidů dle Chapona, stanovení citlivých proteinů a alkoholový chladový test. Po vyhodnocení časového vývoje zákalů v průběhu stárnutí piv byl vybrán parametr charakterizující tento vývoj a výsledky jednotlivých predikčních testů s ním byly korelovány.

Na celém souboru vzorků nebyly nalezeny významné korelace mezi predikčními testy a přirozenou trvanlivostí. Proto byl původní soubor rozdělen na dílčí, které zahrnovaly vzorky pocházející z jednoho pivovaru. Na takto určených souborech byly nalezeny významné korelace mezi jednotlivými predikčními testy a přirozenou trvanlivostí. Tyto korelace byly následně ještě zpřesněny lineárními kombinacemi jednotlivých predikčních testů.

Získané výsledky potvrdily, že žádný z vybraných predikčních testů nelze použít pro předpověď koloidní trvanlivosti libovolného piva. Významné korelace však byly nalezeny mezi jednotlivými testy nebo jejich kombinací a koloidní trvanlivostí vzorků pocházejících z daného jednotlivého pivovaru. Ze získaných korelací plyne, že po provedení příslušných ověřovacích měření a na základě zkušenosti s vlastním pivem si jednotlivé pivovary mohou vytvořit svůj vlastní predikční vzorec, s jehož pomocí mohou rychle a úspěšně posoudit koloidní stabilitu právě vyrobeného piva.

Stanovení volných aminokyselin v pivech a ve zrajících sýrech

Kabelová Ivana, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

V práci je shrnut význam aminokyselin jako významných složek potravin. Cílem práce bylo srovnání obsahu aminokyselin v různých druzích piv českého a zahraničního původu a najít mezi nimi charakteristické rozdíly. U vzorků sýrů též českého a zahraničního původu bylo cílem najít charakteristické rozdíly v jednotlivých skupinách sýrů.

Celkový obsah volných aminokyselin se v pivech pohybuje v rozmezí 120 až 660 mg.l⁻¹. Obsah prolinu, který je nejvíce zastoupenou aminokyselinou z celého spektra, se pohybuje v rozmezí 30 až 250 mg.l⁻¹. Byly nalezeny rozdíly v obsahu jednotlivých a celkových volných aminokyselin mezi českými a zahraničními pivy, kdy česká piva se vyznačují vyššími hodnotami oproti zahraničním pivům. Tyto rozdíly byly ovlivněny použitými surovinami, kvasničným kmenem a technologickým postupem.

Celkový obsah volných aminokyselin ve vzorcích sýrů stanovených při zakoupení sýrů se pohyboval v rozmezí 30 až 160 g.kg⁻¹ vzorku. Celkový obsah volných aminokyselin stanovených v den expirace se pohyboval v rozmezí 40 až 180 g.kg⁻¹ vzorku. Rozdíly v obsahu celkových volných aminokyselin byly ovlivněny druhem sýra, délkou a hloubkou proteolýzy.

Pro stanovení aminokyselin v této práci byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s využitím předkolonové derivatizace pomocí AccQ•Tag činidla a následného stanovení těchto derivátů po jejich separaci na reverzní fázi pomocí fluorescenční detekce.

Využití ATP bioluminiscenčních metod pro sledování mikrobiální kontaminace piva

Zavadilová Michala, Fiala Jaromír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce byla zaměřena na využití metody ATP bioluminiscence pro stanovení nárůstu biofilmu a pro testování účinnosti sanitačních prostředků na jeho odstranění. Dále bylo použito mikrokultivační zařízení Bioscreen C pro určení růstových charakteristik mikroorganismů v různých médiích a po přidavku sanitačních prostředků.

Bylo vybráno pět druhů bakterií rodu *Lactobacillus*, jeden druh rodu *Pediococcus* a kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, které patří mezi nejběžnější kontaminanty při výrobě piva a ve výčepním zařízení. Dále byla použita čtyři kultivační média a pět sanitačních prostředků.

Z výsledků vyplývá, že metoda ATP bioluminiscence je vhodná rychlá metoda pro mikrobiologickou kontrolu v pivovarech a výčepních zařízeních. Nejlepší dezinfekční prostředek byl výrobek značky Desana při testování výrobcem doporučených koncentrací. Stanovení bylo prováděno bez mechanických účinků.

Využití bioluminiscenční detekce ATP v pivovarech

Koucký Ondřej^{1,2}, Fiala Jaromír¹

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²DRINKS UNION, a.s.

Mikrobiologická čistota v pivovaru a následně i při čepování piva je jedním z nejdůležitějších parametrů určujících výslednou kvalitu piva podávaného spotřebiteli. V průběhu roku 2006 bylo ve společnosti Drinks Union a.s. (pivovary Zlatopramen, Březňák, Louny, Kutná Hora) zavedeno využívání nepřímé rychlé kontrolní metody pro stanovení úrovně mikrobiologického zatížení piva a technologického zařízení založené na bioluminiscenčním stanovení přítomnosti ATP (adenosintrifosfátu).

Autoři shrnují praktické zkušenosti s ročním využíváním této metody při kontrole úrovně sanitace výrobních celků, účinnosti pasterace piva a ukázky modelového chování mikrobiologického zatížení výčepních aparatur v gastronomii při různých režimech sanitací a místních podmínkách.

V rámci testovacího provozu byly provedeny srovnávací pokusy s klasickými kultivačními technikami. Na jejich základě došlo k optimalizaci využití této metody. Dále byla vyvinuta metodika pro rychlou kontrolu úrovně pasterace či mikrofiltrace při finalizaci produktu, která umožňuje s přijatelnou spolehlivostí výrazně zkrátit výstupní kontrolu a tím urychlit expedici piva. V restauracích byla touto metodou kontrolována kvalita a účinnost sanitace výčepních zařízení a rychlost nárůstu mikrobiální kontaminace v závislosti na místních podmínkách provozovny a zacházení s pivem.

Srovnání metod průtokové cytometrie pro hodnocení fyziologického stavu mikrobiálních populací

Novotná Martina, Patáková Petra

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Práce byla zaměřena na nalezení vhodných podmínek pro měření populací kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Rhodotorula glutinis* na průtokovém cytometru CellLabQuanta™. Pro tyto kvasinky byly dále vypracovány metodiky sledování fyziologického stavu pomocí různých fluorescenčních sond stanovujících viabilitu buněk, stanovení DNA, buněčného cyklu, intracelulárních proteinů a pro kvasinku *Rhodotorula glutinis* byla vypracována metodika stanovení lipidů.

Při cytometrickém sledování fyziologického stavu byly využity fluorescenční sondy: propidium jodid (PI) a ethidium bromid (EB), které značí buňky s porušenou membránovou integritou, bis – oxonol (BOX), který značí buňky s porušeným transmembránovým potenciálem a fluorescein diacetát (FDA), který značí vitální buňky s esterasovou aktivitou.

K cytometrickému stanovení intracelulárních proteinů bylo využito fluorescenční sondy FITC a lipidy byly stanoveny pomocí Nilské červeně. PI byl využit pro stanovení množství DNA a sledování buněčného cyklu.

Metodiky fluorescenčního barvení byly prověřeny pomocí fluorescenční mikroskopie a metodika stanovení proteinů pomocí FITC byla porovnána s analytickou spektrofotometrickou biuretovou metodou stanovení proteinů.

Při sledování množství DNA a intracelulárních proteinů v závislosti na době kultivace byly kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kultivovány v kapalném YEPD médiu při teplotě 27°C a kvasinky *Rhodotorula glutinis* byly kvůli produkci a sledování množství lipidů kultivovány v kapalném médiu s nízkým poměrem dusík:uhlík. Množství DNA a intracelulárních proteinů bylo sledováno v průběhu celé růstové křivky.

Význam optických metod při sledování růstu kvasinek *Rhodotorula*

Lukčo Miroslav, Patáková Petra

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem práce bylo ověření možnosti doplnění nebo nahrazení klasických chemických metod stanovení obrazovou analýzou, zaměřenou na hodnocení barvy. Jako modelové organismy byly vybrány dva druhy kvasinek rodu *Rhodotorula*: *R. glutinis* a *R. mucilaginosa*, tvořící karotenoidní pigmenty.

Prvním řešeným úkolem byla optimalizace metody izolace a stanovení karotenoidních pigmentů. Výsledná izolační metoda zahrnuje ošetření buněk DMSO, extrakci do acetonu, odpaření a reextrakci do petroléteru. Stanovení karotenoidních pigmentů bylo prováděno pomocí HPLC. Zároveň byly suspenze buněk fotografovány a u fotografií byla hodnocena barva pomocí výpočtu barevné odchylky na základě parametrů L^* , a^* , b^* , používaných v barevném modelu CIE L^* , a^* , b^* .

Výše uvedené metody (HPLC analýza karotenoidních pigmentů a hodnocení barvy) byly využity při sledování růstu obou kmenů rodu *Rhodotorula* na dvou různých zdrojích dusíku (NH_4^+ a NO_3^-) a dvou různých zdrojích uhlíku (glukosa a glycerol). Na základě získaných výsledků lze říci, že obě metody dávají porovnatelné výsledky.

Mnohobuněčný mikroorganismus

Kruliková Tereza, Patáková Petra

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Mikroorganismy žijící v přírodě se musí vyrovnat s nedostatkem živin, se skokovými změnami teplot, nedostatkem vlhkosti, musí překonat relativně dlouhá období bez možnosti se rozmnožovat. Proto se buňky v přírodě organizují do mnohobuněčných útvarů, které jim pomáhají přežít. Mezi tyto „mnohobuněčné organismy“ řadíme biofilm a obrovské kolonie.

Biofilmy můžeme definovat jako kompaktní struktury, tvořené vrstvami buněk hustě obalenými a propojenými polysacharidovým extracelulárním materiálem. Buňky vázané v biofilmu se chovají odlišně než buňky volné, suspendované. Např. se vyznačují vysokou odolností proti působení různých stresových faktorů (např. antimikrobní látky).

Obrovské kolonie mají na rozdíl od biofilmu jednodušší uspořádání, proto jsou často považovány za jakýsi mezistupeň vysoce organizovaného biofilmu a volných buněk.

V průběhu naší práce byl sledován růst obrovských kolonií metodou analýzy obrazu. Obrovské kolonie kvasinky *Rhodotorula* byly kultivovány na Sabouradově agaru po dobu 14 dní při teplotách 10, 20 a 25°C. V průběhu kultivace byly sledovány tyto parametry: plocha, průměr, obvod, cirkularita, výška a barva kolonie. Změny v barevnosti kolonie byly porovnány s obsahem karotenoidních pigmentů, který byly stanoven metodami: HPLC a metodou spektrofotometrickou.

Využití genetických metod k identifikaci bakterií rodu *Bacillus*

Krobová Laurecie, Melzoch Karel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

K identifikaci bakterií byly zvoleny dvě metody – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) a amplifikace genů pro 16S rRNA a 23S rRNA pomocí PCR s následnou restrikcí PCR produktu pomocí vhodných restrikčních endonukleáz (PCR-RFLP metoda).

Jako modelové organismy byly vybrány dva mezofilní druhy bakterií (*Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*) a jeden zástupce termofilních bakterií (*Geobacillus stearothermophilus*).

Izolace DNA byla provedena pomocí komerčních kitů od firem Qiagen a Sigma-Aldrich. Oba kity byly srovnány z hlediska výtěžnosti, čistoty izolované DNA a ceny jednoho pokusu. Pro RAPD a PCR metody bylo nutné provést optimalizaci koncentrací jednotlivých složek v reakčním mixu.

Nejprve byla použita RAPD metoda, která však nebyla funkční. Proto bylo přistoupeno k PCR-RFLP analýze, díky které byly zjištěny nesrovnalosti ve sbírce mikroorganismů. Na základě tohoto zjištění byla opět zkoušena RAPD analýza, tentokrát se skutečnými zástupci rodu *Bacillus*. Metody byly použity k identifikaci vybraných zástupců bakterií v reálných i uměle vytvořených směsných kulturách.

V závěru jsou diskutovány výhody a nevýhody jednotlivých technik, časová náročnost a schopnost identifikace zástupců rodu *Bacillus*.

Optimalizace kultivačních podmínek pro produkci proteinů pomocí geneticky upravené kvasinky *Pichia pastoris*

Norek Michal, Paulová Leona

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem práce bylo optimalizovat proces produkce trypsinogenu pomocí kvasinky *Pichia pastoris*. Ke studiu sloužily jednak kontinuální kultivace v uspořádání chemostatu, kdy byly v ustáleném stavu kultivace zaručeny přesně definované podmínky nezávislé na čase, a jednak přítokované kultivace v prostředí s vysokou koncentrací buněk.

V první části experimentální práce byly proměřovány transientní a ustálené stavy kontinuální kultivace v uspořádání chemostatu, kdy byl jako zdroj uhlíku a energie v produkční fázi použit methanol nebo směsný substrát methanol/glukosa. Maximální koncentrace trypsinogenu 190 mg.l^{-1} a maximální specifické produktivity $3,60 \text{ mg.g}_{\text{suš}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ bylo dosaženo při zřed'ovací rychlosti $0,1 \text{ h}^{-1}$, za podmínek, kdy použitým zdrojem uhlíku a energie ve vsádkové fázi byl glycerol a v produkční fázi methanol.

Ve druhé části experimentální práce byly prováděny přítokované kultivace, při kterých byl sledován vliv složení substrátu a režimu přítokování na produkci trypsinogenu.. Maximální koncentrace trypsinogenu 527 mg.l^{-1} a maximální specifické produktivity $0,72 \text{ g.g}_{\text{suš}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ bylo dosaženo za podmínek, kdy použitým zdrojem uhlíku a energie v růstové fázi byl glycerol, v produkční fázi methanol a kdy pH produkční fáze bylo sníženo na hodnotu 5,2.

Sledování vlivu kultivačních podmínek na fyziologický stav geneticky upravené kvasinky *Pichia pastoris*

Baňarová Michaela, Paulová Leona

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Předmětem práce bylo sledování vlivu kultivačních podmínek na fyziologický stav methylotrofní kvasinky *Pichia pastoris*; při měření byly použity dva kmeny, a to kmen produkující trypsinogen a kmen produkující β -galaktosidázu. Fyziologický stav byl sledován pomocí moderních optických metod - fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie a vybrané fyziologické parametry byly detekovány pomocí značení selektivními fluorescenčními sondami.

V první sérii pokusů byl sledován vliv methanolu na viabilitu kmenů. Z měření bylo zjištěno, že ještě při koncentraci methanolu 150 g/l je u pozorovaných kmenů zachována vysoká viabilita buněk

V druhé části experimentální práce byl sledován fyziologický stav kvasinky *Pichia pastoris* produkující trypsinogen během přítokovaných a kontinuálních kultivací v laboratorním bioreaktoru o různém složení média. Vzorky pro sledování fyziologického stavu byly odebírány v produkční fázi kultivace. Výsledky ukázaly, že významný vliv na viabilitu buněčné populace má zejména zbytková koncentrace methanolu, koncentrace aktivní formy produktu a vysoká buněčná hustota.

Kultivace čistých a smíšených kultur termofilních bakterií na modelových a odpadních médiích

Lipovský Jakub, Rychtera Mojmír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývá kultivací sbírkových kultur aerobních termofilních bakterií a jejich porovnáním se směsnou termofilní bakteriální populací. Tyto kultivace využívají jako zdroj uhlíku a energie glycerol, nebo průmyslový odpadní produkt, který glycerol obsahuje.

Hlavním významem využití poznatků z experimentů prezentovaných v této práci je mikrobiální čištění odpadních produktů například z tukového průmyslu. Proces aerobní termofilní digesce má oproti klasickým metodám značné výhody a to například ve vyšší rychlosti odbourávání organických látek, vyšší výtěžnosti procesu a tím i v kratší době potřebné k dostatečnému odbourání odpadu.

Pro experimenty byla použita směsná termofilní aerobní bakteriální populace získaná z aktivovaného kalu z termofilní čistírny odpadních vod a bakteriální kultury z České sbírky mikroorganismů (CCM) druhů *Bacillus* a *Thermus*: *Alicyclobacillus acidoterrestris* 4659, *Alicyclobacillus acidocaldarius* 3497, *Geobacillus stearothermophilus* 5965, *Geobacillus thermoglucosidasius* 3731, *Geobacillus stearothermophilus* 2062, *Thermus* sp. 2842, *Thermus aquaticus* 3485, *Thermus aquaticus* 3488 a *Meiothermus ruber* 4212.

Před kultivací sbírkových kultur byly provedeny dva kontinuální pokusy s úplnou recirkulací směsné populace. K recirkulaci byl využit keramický membránový modul filtrační jednotky ARNO 600 BIO s velikostí pórů 0,2 μm , o celkové filtrační ploše 0,05 m^2 .

Kultivace vybraných mikroorganismů byla nejprve testována v třepaných baňkách a po výběru nejperspektivnějších kultur i v bioreaktorech. V průběhu kultivací bylo „on-line“ monitorována koncentrace rozpuštěného kyslíku v suspenzi, odchozích plynech a koncentrace oxidu uhlíkového v odchozích plynech. Dále byly prováděny „off-line“ analýzy CHSK, koncentrace substrátu a koncentrace sušiny biomasy. Z testovaných sbírkových kultur se nejlépe osvědčil *Thermus aquaticus* 3488.

Produkce bioplynu imobilizovanou bakteriální populací

Veselá Kristýna, Rychtera Mojmír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem práce bylo sledování tvorby bioplynu pomocí imobilizované směsné mikrobiální kultury firmy PAQUES, Holandsko.

V první části práce byla provedena základní optimalizace. Faktory optimalizace byly teplota kultivace, koncentrace imobilizované kultury a složení kultivačního média. Při těchto kultivacích bylo sledováno pH a CHSK (chemická spotřeba kyslíku). Teplota, při níž docházelo k největšímu poklesu CHSK a tudíž k nevyššímu stupni odstranění organických látek z kultivačního média byla 37°C. Proto bylo této teploty použito ve všech dalších procesech.

Z výsledků optimalizačních kultivací vycházely následně provedené pokusy, které probíhaly v laboratorní aparatuře o objemu 300 ml s možností jímání a měření objemu vyprodukovaného bioplynu. Všechny procesy probíhaly anaerobně v semi-kontinuálním nebo kontinuálním uspořádání. Během této doby bylo vyzkoušeno mnoho médií s různými hodnotami objemu vyprodukovaného plynu. V průběhu procesů bylo sledováno pH, CHSK, objem plynu a koncentrace jednotlivých složek média. Na počátku a konci procesů bylo sledováno i obsažené množství celkového uhlíku, dusíku a fosforu. Výsledky pokusů prokázaly, že při dlouhodobém procesu kultura potřebuje přísun minerálů, fosforu a to zejména dusíku. Při nedostatku dusíku v médiu bylo sledováno výrazné zpomalení procesu tvorby bioplynu. Při experimentech na různých substrátech se prokázalo, že nejvhodněji lze kulturu použít v závěrečném stupni anaerobní degradace organických látek (metanogenezi) nebo při anaerobním rozkladu jednoduchých organických kyselin, hlavně kyseliny octové (acetátu). Při použití substrátů, které nebyly degradovány na kyseliny, jako je např. glycerol nebo glukóza, nejsou mikroorganismy schopny dlouhodobě a efektivně tyto látky rozkládat na bioplyn a oxid uhličitý. Po určité době tak dochází k zastavení produkce bioplynu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při degradaci peptonu, kyseliny octové nebo acetátu, kde bylo získáno až 0,48 dm³ plynu na 1 g odstraněného CHSK a redukce CHSK až o 94 %. Laboratorní proces byl veden na koloně o objemu 300 ml, která byla naplněna 80 g imobilizátu. Při době zdržení 4,8 dne a koncentraci acetátu 7 g/l dosáhla tvorba plynu 170 ml/24 h. Zkrácením doby zdržení média v reaktoru na polovinu se produkce bioplynu zvýšila na dvojnásobek.

Proces by bylo nutno dále optimalizovat. Při dlouhodobějším provozu se prokázalo, že vlivem vznikajících plynů a pohybu imobilizované kultury dochází ke změně konzistence a k otěru materiálu, který postupně vede až destrukci pelet. (reaktor pracoval ve fluidním režimu)

Bioetanol

Kočan Jakub, Melzoch Karel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Biomasu (rychle rostoucí dřeviny, konopí, obilí a další) lze využít jako palivo v energetických jednotkách (elektrárny, teplárny, podniky). Její využití v dopravě, jako v dalším významném spotřebiteli fosilních paliv, však zatím nepřipadá v úvahu. Pro tento sektor je nutné najít biopaliva, jejichž vlastnosti (skupenství, výhřevnost) budou obdobné jako v případě benzínu a nafty, aby mohl být zachován současný vozový park. Biopaliva by měla postupně nahradit fosilní paliva bez rozsáhlých změn na stávajících motorech.

Cukrová řepa, obilí a další rostliny mohou být prostřednictvím fermentace přeměněny na alkohol - bioetanol, který může být užit jako součást benzínu nebo přímo v čisté formě jako motorové palivo, nebo jako součást benzínu po konverzi na ethyl-terc-butyl-ether (ETBE) reakcí s isobutenem. Budoucí vývoj umožní ekonomicky vyrábět bioetanol ze dřeva nebo slámy. Technologický pokrok indikuje ve střednědobém horizontu další kapalná a plynná biopaliva získávaná termochemickými procesy z biomasy jako např. biodimetyler, biometanol, pyrolysní oleje a vodík. Současná spotřeba biopaliv je stále pod 0,5 % spotřeby benzínu a nafty. Pro výrobu bioetanolu je vhodná jakákoliv biomasa obsahující dostatečné množství cukrů, resp. látek, které lze na cukry převést (škrob a celulóza) fermentačními procesy (lihové kvašení). Nelze již očekávat zásadní inovaci tohoto procesu. Předmětem intenzivní výzkumné činnosti je ve světě studium možností využití lignocelulóзовé biomasy (sláma, dřevní odpad) jako suroviny pro výrobu bioetanolu. Hlavní její podíl je tvořen celulózou a hemicelulózou, které mohou být převedeny na jednoduché cukry, i když podstatně obtížněji než je tomu v případě škrobu.

Největším problémem palivářské aplikace bioetanolu je vedle technických problémů (distribuce paliva, vliv na provoz vozidel) jeho cena, která je určována trhem s motorovými palivy a rozpočtovými pravidly státu. Pro pěstování cukrovky k nenutriční produkci je u nás k dispozici minimálně 30 až 40 tisíc hektarů, u obilí jsou možnosti ještě širší. Technologie pěstování těchto plodin i jejich maximální zastoupení v osevním postupu jsou známy, stejně tak technologie jejich zpracování. Zkušenosti s využitím bioetanolu v zahraničí jsou bohaté, výhřevnost bioetanolu se vyrovná výhřevnosti černého uhlí, účinnost spalování je vyšší. Než bude Česká republika vybavena speciálními sklízecími a spalovacími kotli na fytomasu, může bioetanol znamenat první krok k širšímu využití sluneční energie, fixované fotosyntetickým aparátem rostlin. Hlavní důvod proč bioetanol, který sám o sobě není nějakým vynikajícím motorovým palivem, proniká úspěšně na trh motorových paliv, spočívá ve skutečnosti, že

v sobě spojuje vlastnosti, které nevytvářejí kriticky úzké místo v celém systému jeho implementace. Ražerierie rozhodně nepředstavují problém v použití jakékoliv komponenty motorových paliv, která je ekonomická a ekologická, standardně dostupná na trhu za transparentní ceny, umožňuje výrobu a distribuci kvalitních motorových paliv a dosažení míry zisku řádově srovnatelné s ostatními surovinami. Intenzivní diskuse, která nyní probíhá v USA na téma bioetanol, toto plně reflektuje. V tomto směru se přístup ražerierií neliší od ostatních subjektů zapojenými do výroby bioetanolu.

Lyze u laktokoků

Abrlová Magdaléna, Hlavsová Barbora, Šviráková Eva, Plocková Milada

Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha

Buněčná lyze představuje děj významný v různých fermentačních technologiích. Ovlivňuje například zrání sýrů, a to především rychlost a výslednou chuť sýra. K buněčné lyzi dochází působením enzymů, tzv. lysinů, které narušují peptidoglykanovou vrstvu buněčné stěny. Rozrušenou buněčnou stěnou se do okolí rozlévá buněčná šťáva a především intracelulární enzymy, urychlují zrání sýrů. Pro zrání sýrů mají velký význam intracelulární peptidasy, které hydrolyzují hořké peptidy vznikající při zrání, čímž dochází k odstranění hořké chuti sýra.

Nisin je bakteriocin produkovaný některými kmeny *Lactococcus lactis*. Jeho antibakteriálních vlastností se využívá v potravinářství při konzervaci sýrů. Přítomnost nisinu může zvyšovat buněčnou lyzi. Kombinace lyzujících kmenů laktokoků a nisinu se proto jeví jako výhodná pro zvyšování buněčné lyze při výrobě sýrů.

V této práci byla sledována buněčná lyze vybraných laktokokových kmenů v citrátovém pufru při teplotě 13 °C (která simuluje teplotu zrání sýrů) pomocí absorbance A_{650} po dobu 12 dnů. Během této doby docházelo u všech zkoumaných kmenů *L. lactis* (NIZO R5, HMM 81, NIZO B643, AM2) k buněčné lyzi. Za těchto podmínek nejvíce lyzoval kmen *L. lactis* HMM 81 (buněčná lyze 44 % po 12 dnech). Přídavek nisinu (0, 100, 500, 1000 a 5000 IU/ml) zvyšoval lyzi u všech laktokokových kmenů; zvýšení lyze bylo individováno pro každý jednotlivý kmen. Nejvíce byla přídavkem nisinu zvýšena lyze kmene *L. lactis* NIZO B643, přestože tento kmen lyzoval nejméně. Nejmenší vliv měl nisin na kmen *L. lactis* AM2.

V této práci byl potvrzen vliv nisinu na buněčnou lyzi laktokoků. Přídavek nisinu zvyšoval buněčnou lyzi laktokoků. Nisin by mohl být použit ke zvýšení buněčné lyze zákysových kultur používaných při výrobě sýrů za účelem urychlení zrání a zlepšení chuti.

Identifikace a antimikrobiální vlastnosti kmene *Enterococcus mundtii* EN3

Miller Petr¹, Kučerová Kateřina¹, Chumchalová Jana¹, Míková Kamila²

¹Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha

²Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT Praha

V současné době je na výrobce potravin vyvíjen tlak ze strany obchodních řetězců na prodloužení trvanlivosti potravin. Na druhou stranu je ze strany spotřebitelů požadováno co nejmenší chemické ošetření potravin. Bakteriociny, přirozeně produkované obranné peptidy některých bakterií (nejčastěji bakterií mléčného kvašení), se již delší dobu používají ke konzervaci některých potravin. Kmen *Enterococcus mundtii* EN3 produkuje bakteriocin s širokou antibakteriální aktivitou (19 z 20 testovaných kmenů laktobacilů, 3 z 5 laktokoků, *Bacillus cereus* DMF2001 a *Listeria monocytogenes* CCM5576). U tohoto kmenu byla dále provedena potvrzení identifikace pomocí polymerasové řetězové reakce. Byla potvrzena rodová příslušnost k rodu *Enterococcus* dle Cupákové (2005) a druhová příslušnost k druhu *E. mundtii* dle Jacksona (2004).

Rast plesní v přítomnosti kmeňov rodu *Lactobacillus*

Hudáček Jaroslav¹, Zalán Zsolt², Chumchalová Jana¹, Halász Anna²

¹Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha

²Central Food Research Institute, Hungary

V tejto práci sa sledovala antifungálna aktivita 10-tich kmeňov rodu *Lactobacillus* proti plesniam rodu *Fusarium* a *Aspergillus*. Antifungálna aktivita sa stanovovala metódou dvojitých agarových platní a to použitím živých bakteriálnych buniek alebo supernatantu po kultivácii laktobacilových kmeňov v MRS bujóne. Najvyššia aktivita buniek bola zistená u kmeňov *Lbc. curvatus* 2775 a *Lbc. curvatus* 2768, ktoré inhibovali rast všetkých plesní. V prípade aktivity supernatantu boli najúčinnnejšie kmene *Lbc. paracasei* 05 a *Lbc. curvatus* 2768. Antifungálna aktivita jednotlivých kmeňov rodu *Lactobacillus* sa prisudzuje tvorbe organických kyselín, peroxidu vodíka, tvorbe bakteriocínu a ďalších metabolitov. Inhibičný efekt sa na miskách prejavoval tvorbou inhibičnej zóny okolo kolónie živých buniek alebo okolo korkovrtu s difundovaným supernatantom, a to úplným potlačením rastu plesne alebo degradáciou mycélia a zamedzením sporulácie. V ďalšej časti práce sme sledovali vplyv laktobacilov na rast plesní a tvorbu aflatoxínu B1 v tekutom médiu pri spoločnej kultivácii po dobu 20-tich dní pri 30°C. Boli použité dva kmene plesní, *Asp. flavus* DMF 0802 a *Asp. parasiticus* DMF 0805. Rast plesní bol sledovaný metódou váženia mycélia. Sledovaním rastu *Asp. flavus* DMF 0802 sa najvýraznejšia zmena hmotnosti mycélia vzhľadom ku kontrole zaznamenala v počiatočnej fáze rastu plesne. Sledovaním rastu *Asp. parasiticus* DMF 0805 sa najvýraznejšia zmena sa zaznamenala v 14. dni kultivácie, kde došlo k tomu, že v prítomnosti takmer všetkých kmeňov laktobacilov sa prudko zvýšil hmotnostný prírastok mycélia oproti kontrole. Z filtrátu získaného po kultivácii sa následne izoloval, pomocou imunoafinitnej kolóny, aflatoxín B1 a jeho koncentrácia sa stanovila metódou HPLC. Pri spoločnej kultivácii kmeňa *Asp. flavus* DMF 0802 s laktobacilmi nedochádzalo k tvorbe aflatoxínu na rozdiel od prípadu kultivácie *Asp. parasiticus* DMF 0805. Zo zistených hodnôt koncentrácie AFB1 vzhľadom ku kontrole, kde nedochádzalo k produkcii AFB1, sa domnievame, že rast prítomných laktobacilov spôsobil tvorbu AFB1 vyvolaním stresových rastových podmienok využívaním nutričných zložiek média a produkciou určitých metabolitov. Avšak v ďalších dňoch sledovania sme detekovali nižšie koncentrácie AFB1. Tento pokles koncentrácie AFB1 by mohol byť spôsobený práve prítomnosťou laktobacilov, kedy mohlo dochádzať k degradácii AFB1 na netoxické látky, poprípade naviazanie AFB1 na bunkovú stenu baktérií, alebo absorpcia AFB1 bakteriálnymi bunkami.

Táto práca bola podporená: CEZ: MSM 6046137305, CZ – HU 5/2004, CZ – HU 4 – 2007 – 5

Mikrobiologické vlastnosti vybraných fermentovaných sójových výrobků

Dvořáková Eva, Dvořák Milan, Pavlasová Marcela, Chumchalová Jana

Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha

Cílem práce bylo porovnat kvalitu zahraničních sójových výrobků fermentovaných různými mlékárenskými kulturami zakoupených ve Francii. Bylo získáno 15 různých vzorků od sedmi zahraničních firem. Kvalita výrobků byla hodnocena ze zjištěných hodnot aktivní a titrační kyselosti a stanovením počtů jednotlivých bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp.). Dále byl sledován vliv přítomných hydokoloidních látek na viskozitní vlastnosti zkoumaných sójových produktů bez přidaného ovocného komponentu.

Aktivní kyselost výrobků se pohybovala v intervalu od pH 4,0 (PROVAMEL natural) do pH 4,5 (SOJASUN natural a BONNETERRE natural). Nejvyšší titrační kyselost mezi produkty bez ovocného komponentu byla naměřena u PROVAMEL natural (72,6 mmol/kg) a mezi produkty s ovocným komponentem u CHAMPION červené ovoce (79,4 mmol/kg).

Počty bakterií *Lactobacillus acidophilus* se pohybovaly v rozmezí $1,5 \times 10^4$ do $1,7 \times 10^5$ JTK/g, u většiny výrobků s ovocným komponentem již nebyly na konci doby spotřeby detekovány ($\ll 10^3$ JTK/g). Nejvyšší počty probiotických bakterií byly identifikovány u výrobků firem SOJADE a BONNETERRE.

Nejvyšší hodnoty viskozity a míry tixotrofie dosahovaly produkty bez příchutě PROVAMEL a CHAMPION.