



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2010

7. seminář

Pivovarství a kvasné technologie 2010

1. seminář

Environmentální biotechnologie 2010

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

8. a 9. dubna 2010



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Sborník souhrnů a plných textů příspěvků

Konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2010

7. seminář

Pivovarství a kvasné technologie 2010

1. seminář

Environmentální biotechnologie 2010

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

8. a 9. dubna 2010

Pořádající instituce:

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

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

Sponzoři:



Dekonta, a.s.
ROCHE, s.r.o.

Budějovický Budvar, n.p.
Heineken Česká republika, a.s.
K Brewery Trade, a.s.
Měšťanský pivovar v Poličce, a.s.
Pivovar Nymburk, s.r.o.
Primátor, a.s.
Pivovary Staropramen, 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

Ing. Tereza Krulíková, Ph.D., e-mail: tereza.klisova@vscht.cz

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

Editor: Fiala J.

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

Rok vydání: 2010

ISBN 978-80-7080-755-2

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



DEKONTA, a.s.

Remediační technologie pro sanace kontaminovaných lokalit

SPOLEČNOST DEKONTA POSKYTUJE SLUŽBY V NÁSLEDUJÍCÍCH OBLASTECH:

- průzkum a sanace kontaminovaných lokalit
- odstraňování / využití nebezpečných odpadů
- ekologická havarijní služba
- konzultační služby
- laboratorní služby
- dodávky technologií a zařízení pro eliminaci průmyslových emisí
- výzkum v oblasti environmentálních technologií
- certifikovaný systém managementu jakosti a environmentu (ISO 9001, ISO 14001 a OHSAS 18001), Responsible Care: Odpovědné podnikání v chemii

LABORATOŘE SPOLEČNOSTI DEKONTA POSKYTUJÍ ŠIROKÉ PORTFOLIO SLUŽEB PRO VŠECHNY TYPY VZORKŮ VOD, VÝLUHŮ, KALŮ, SEDIMENTŮ A ODPADŮ:

- fyzikálně chemické rozborů
- mikrobiologické analýzy
- stanovení ekotoxicity
- vzorkování a svoz vzorků
- vývoj a výzkum v oblasti sanačních technologií
- laboratorní zkoušky biodegradace kontaminovaných materiálů, separace ropných kalů, stabilizace / solidifikace odpadů, chemické oxidace znečištěných zemín, vod a jiných odpadů

VÝZKUMNÉ PROJEKTY SPOLEČNOSTI DEKONTA JSOU ZAMĚŘENY NA NÁSLEDUJÍCÍ ENVIRONMENTÁLNÍ TECHNOLOGIE:

- biotechnologie
- propustné reaktivní bariery
- chemická oxidace
- reduktivní dechlorace
- biofiltry
- nanočástice v bioremediacích
- kompostování
- technologie pro zpracování průmyslových odpadů

dekonta

Ing. Ljuba Zídková, vedoucí biotechnologické laboratoře
DEKONTA, a.s.
Dřetovice 109
273 42 Stehelčevy

www.dekonta.cz

tel.: +420 312 292 969

email: zidkova@dekonta.cz



Program konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2010

Čtvrtek 8. dubna 2010

Konferenční centrum VŠCHT Praha, kolej Sázava,
areál vysokoškolských kolejí Praha 4 – Kunratice



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

8:00 – 9:00 Registrace účastníků

Přednášková sekce – plenární zasedání sál B+C

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

9:10 – 9:30 Basařová G.: **Pivovarství – Teorie a praxe výroby piva**

9:30 – 9:50 Melzoch K., Patáková P., Paulová L., Rychtera M.:
Biopaliva jako alternativní zdroj energie

9:50 – 10:10 Masák J.: **Život na skládce, aneb bakterie si nevybírá**

10:10 – 10:30 Brányik T.: **VitalFluor – přístroj na stanovení vitality
mikrobiálních buněk**

10:30 – 10:40 Zídková L.: **DEKONTA – remediační technologie pro sanace
kontaminovaných lokalit**

10:40 – 11:10 **Přestávka**



Autogramiáda nové publikace

Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T.:

Pivovarství – Teorie a praxe výroby piva

7. seminář – Pivovarství a kvasné technologie 2010 sál B+C

11:10 – 11:20	Jelínek L., Dolečková M., Karabín M.: Metody autentifikace chmelových odrůd
11:20 – 11:30	Dolečková M., Jelínek L., Karabín M.: Vliv vybraných faktorů na odrůdově charakteristické zastoupení chmelových látek
11:30 – 11:40	Olšan V., Rychtera M.: Chemická a biochemická předúprava lignocelulosových materiálů pro jejich biotechnologické využití. Hodnocení účinnosti předúpravy
11:40 – 11:50	Pavlová E., Lipovský J., Melzoch K.: Zpracování lignocelulosových materiálů na bioethanol
11:50 – 12:00	Grecman V., Brányik T., Kuřec M.: Stanovení vitality kvasinek pomocí měření NAD(P)H
12:00 – 12:10	Linhová M., Fribert P., Lipovský J., Patáková P., Melzoch K.: Průtoková cytometrie a její možnosti aplikace na rod <i>Clostridium</i>
12:10 – 12:20	Keprová A., Linhová M., Patáková P.: Hodnocení fyziologického stavu rozpouštědlových klostridií pomocí průtokové cytometrie
12:20 – 12:30	Knytl M., Fiala J.: Vliv koncentrace původní mladiny na obsah mykotoxinů
12:30 – 12:40	Štěrbá K., Dostálek P.: Význam a stanovení alkoholů, esterů a mastných kyselin v pivu
12:40 – 14:00	Přestávka na oběd

1. seminář - Environmentální biotechnologie 2010 sál A

11:10 – 11:20	Polová M., Pospíšilová D., Masák J., Čejková A.: Metabolická aktivita mikroorganismů degradujících fenol
11:20 – 11:30	Pospíšilová D., Polová M., Čejková A., Masák J.: Fyzikálně-chemická charakteristika buněčných obalů a její význam pro adhezi bakterie <i>Rhodococcus erythropolis</i>
11:30 – 11:40	Březinová T., Pospíšilová D., Masák J.: Vliv kultivačních podmínek na biodegradační aktivitu a adhezi bakterií
11:40 – 11:50	Korbel M., Halecký M., Hudcová T., Páca J.: Biofiltrace směsí hydrofobních a hydrofilních sloučenin
11:50 – 12:00	Procházková G., Hrdinová J., Jirků V.: Celulolytická aktivita: vliv podmínek a substrátu
12:00 – 12:10	Mannlová Z., Hrdinová J., Jirků V.: Charakteristika fenotypu celulolytických mikroorganismů
12:10 – 12:20	Marešová E., Schreiberová O., Čejková A.: Izolace a analýza buněčných obalů <i>Rhodococcus erythropolis</i>
12:20 – 12:30	Schejbalová P., Polová M., Krulikovská T.: Vliv teploty na obsah a složení lipidové frakce obalových vrstev <i>Rhodococcus erythropolis</i>
12:30 – 12:40	Hudeček O., Halecký M., Páca J.: Mikrobiální degradace benzínových par
12:40 – 14:00	Přestávka na oběd

7. seminář – Pivovarství a kvasné technologie 2010 sál B+C

14:00 – 14:10	Baszczyński M., Brányik T.: Struktura pивní pěny
14:10 – 14:20	Novák P., Baszczyński M., Brányik T., Růžička M. C.: Vliv vybraných fyzikálně-chemických vlastností piva na stabilitu pěny
14:20 – 14:30	Lipovský J., Linhová M., Fribert P., Toure M., Patáková P., Rychtera M., Melzoch K.: Produkce biobutanolu na modelovém glukosovém médiu
14:30 – 14:40	Fribert P., Jahodová L., Lipovský J., Linhová M., Patáková P., Rychtera M., Melzoch K.: Využití stripování plynem jako separačního mezikroku při produkci biobutanolu.
14:40 – 14:50	Jahodová L., Fribert P., Melzoch K.: Izolace butan-1-olu z fermentačních médií
14:50 – 15:00	Toure M., Melzoch K.: Využití řepy cukrovky pro výrobu rozpouštědel
15:00 – 15:10	Kovačková M., Veselý P., Fiala J.: Vliv kvality sladu na filtrovatelnost piva
15:10 – 16:00	Přestávka

Prezentace sponzorujících společností – sál B+C

16:00 – 17:00	Prezentace sponzorujících společností
17:00 – 17:30	Diskuse
17:30	Zakončení 1. dne konference

1. seminář - Environmentální biotechnologie 2010 sál A

14:00 – 14:10	Pravdová I., Hulín P., Paulová L.: Expresie rekombinantního trypsinogenu a regulace syntézy alkoholoxidasy při kultivaci kvasinky <i>Pichia pastoris</i> fenotypu Mut+
14:10 – 14:20	Pikalová T., Linhová M., Knejzlík Z., Paulová L.: Transformace kvasinky <i>Pichia pastoris</i> plasmidem obsahujícím GFP a fúzní protein
14:20 – 14:30	Maršálková B., Širmerová M., Brányik T., Brányiková I., Melzoch K.: Mikroskopická řasa <i>Chlorella</i> jako alternativní zdroj zkvasitelných cukrů pro výrobu biopaliv
14:30 – 14:40	Čapek R., Maršálková B., Brányik T.: Enzymová hydrolýza řas polysacharidů
14:40 – 14:50	Širmerová M., Maršálková B., Kováčová R., Bittner M., Brányik T.: Adheze jednobuněčných řas <i>Chlorella vulgaris</i> na pevné povrchy
14:50 – 15:00	Bittner M., Brányik T., Širmerová M.: Vliv povrchových vlastností řas a pevných povrchů na jejich vzájemnou interakci
15:00 – 15:10	Vaněk T., Hudcová T., Páca J., Halecký M.: Mikrobiální degradace nitrofenolových sloučenin
15:10 – 16:00	Přestávka

Pátek 9. dubna 2010 - Ústav kvasné chemie a bioinženýrství,
VŠCHT Praha - budova A, Technická 5, Praha 6, 1. patro - č.dv. 111

**Možnost návštěvy vybraných laboratoří a technologické haly
ÚKCHB** - Sraz účastníků 10:00 hodin před knihovnou ÚKCHB

**Souhrny
a plné texty příspěvků**

Pivovarství – Teorie a praxe výroby piva

Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T.

VŠCHT Praha

Kniha pojednává v šestnácti kapitolách o celém procesu výroby piva. V začátku jsou probrány suroviny pro výrobu piva (slad, náhražky sladu, chmel, chmelové přípravky, voda a pomocné materiály), další kapitoly pojednávají o pivovarských kvasinkách, mikrobiální kontaminaci a nomenklatuře enzymů důležitých v pivovarské výrobě. Stěžejní jsou části věnované základním technologickým úsekům výroby: přípravě mladiny, kvašení a dokvašování, filtraci a membránovým technikám, pasteraci a stáčení piva. Dále je uveden přehled vlastností různých druhů piv a je probrána fyzikálně-chemická a senzorická stabilita piva, popsáno jeho stárnutí a hodnocení jakosti piv. Samostatná rozsáhlá kapitola pojednává o sanitaci výrobních zařízení, další se zabývá hospodařením s energií, vodou a odpady. V závěru jsou ve stručnosti probrány zdravotní aspekty piva.

V knize je použito platné chemické názvosloví a rozdělení chemických sloučenin důležitých v pivovarství, především polyfenolových látek. Jednotlivé kapitoly jsou vždy zahájeny krátkým přehledem historického vývoje, následují teoretické základy postupů popisovaných v kapitole, přehled a zhodnocení současných technologických variant i moderních vývojových technologií a technického zařízení, popis provozní a laboratorní kontroly a v některých kapitolách i speciálních metod a přístrojů. Každá kapitola je doplněna velmi bohatým seznamem literárních citací, především z posledních deseti let.

Kniha je svým rozsahem a pojetím určena studentům bakalářského, magisterského a doktorského studia v daném oboru a pracovníkům pivovarské praxe i spolupracujícím institucím, kteří si podle hloubky potřebných poznatků a informací mohou vybírat určité partie jednotlivých kapitol ke studiu.

Metody autentifikace chmelových odrůd

Jelínek L., Dolečková M., Karabín M.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Otázka identifikace chmelových odrůd je v dnešní době velmi aktuální zejména z pohledu pěstitelů a výrobců piva. K tomuto účelu byly vyvinuty dvě základní skupiny metod, které jsou schopny pokrýt nároky, jak chmelových dodavatelů, tak odběratelů.

První z nich je tzv. DNA fingerprinting. Tato skupina identifikačních metod je založena na výskytu charakteristických sekvencí v rostlinném genomu, kdy pravost odrůdy je potvrzena právě nalezením těchto markerů. Mezi nejčastěji používané metody DNA fingerprintingu se řadí RAPD, AFLP a SSR. Jejich hlavní nevýhodou jsou požadavky na speciální vybavení, školený personál a dále i fakt, že jsou použitelné pouze pro vzorky nativního chmele. Tyto nedostatky jsou ale vysokou měrou kompenzovány a to zejména rychlostí a přesností metody, nezřídka přesahující 95%.

Druhou skupinu tvoří metody tzv. fyzikálně chemické. Jsou založeny na předpokladu, že každá chmelová odrůda je jedinečná svým složením vybraných sekundárních metabolitů (hořké kyseliny, silice a polyfenoly). Na základě zjištění obsahů těchto látek je možné sestavit klíčové diagramy, s jejichž pomocí je možné odrůdy identifikovat. Hlavními výhodami jsou v tomto případě jednoduchost provedení a dále i skutečnost, že tyto metody mohou být bez větších obtíží aplikovány i na chmelové výrobky, jakými jsou pelety a extrakty.

Vliv vybraných faktorů na odrůdově charakteristické zastoupení chmelových látek

Dolečková M., Jelínek L., Karabín M.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem práce na téma „Vliv vybraných faktorů na odrůdově charakteristické zastoupení chmelových látek“ bylo sledování vlivu ročníku sklizně a dalších zvolených parametrů na vybrané analytické znaky jednotlivých odrůd.

Stanovením obsahů vybraných sekundárních metabolitů (silic, pryskyřic a polyfenolů) byl vytvořen soubor dat, na jehož základě byl optimalizován klíč pro identifikaci chmelových odrůd založený na typických obsazích nebo poměrech obsahů stanovovaných látek. Pomocí tohoto klíče je možno v rámci dvou po sobě jdoucích sklizní jednoznačně odlišit 18 z 22 analyzovaných chmelových odrůd.

Dále bylo zjištěno, že ostatní sledované parametry (místo pěstování, granulace, stáří chmelové rostliny, proces ozdravení) poměrně značně ovlivňovaly chemické složení chmele. Nicméně tyto rozdíly nebyly natolik významné, aby znemožnily identifikaci chmelových odrůd.

Chemická a biochemická předúprava lignocelulosoových materiálů pro jejich biotechnologické využití. Hodnocení účinnosti předúpravy

Olšan V., Rychtera M.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Lignocelulosoové materiály patří mezi nejrozšířenější zdroje sacharidů na světě, i když pro jejich biotechnologické využití je třeba je upravit. Je možno použít metody chemické, fyzikálně-chemické a biologické. V této práci byla jako modelová surovina použita pšeničná sláma, která byla podrobena kyselé (H_2SO_4) a alkalické předúpravě (NaOH , NH_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$) za mírných podmínek. Jako hodnotící kritéria účinnosti dané předúpravy byl použit úbytek hmotnosti a úbytek ligninu (delignifikace) po předúpravě. Pevný podíl, který zůstal po hydrolýze byl podroben enzymové hydrolýze. Nejvyšší výtěžky glukosy byly získány enzymovou hydrolýzou slámy upravené alkalickou předúpravou (NaOH) za mírných podmínek. Tento enzymový hydrolyzát byl po odfiltrování pevného podílu použit k přípravě media pro fermentaci kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* na ethanol. Vzhledem k vysokému hydromodulu při enzymové hydrolýze jsou koncentrace ethanolu dosti nízké.

Zpracování lignocelulosoových materiálů na bioethanol

Pavlová E., Lipovský J., Melzoch K.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Předmětem mé práce bylo vyhodnocení vlivů pH a přídavku surfaktantu na průběh a výtěžek hydrolýzy při teplotě optimální pro produkční mikroorganismus (30°C) a při teplotě optimální pro činnost enzymových preparátů (50°C). Bylo provedeno porovnání kultivačních schopností tří mikroorganismů, a to *Saccharomyces cerevisiae* kmenu 03/26 a *Zymomonas mobilis* kmenů 2770 a 3883, při kultivaci na modelovém mediu obsahující glukosu jako zdroj uhlíku a na mediu obsahujícím hydrolyzát mikrokrytalické celulosy – Avicelu. Po vyhodnocení optimálních a kompromisních podmínek, pH v rozmezí 4,5 – 5, hydrolýza v prostředí kultivačního media, 30°C, byla provedena SSF na modelovém substrátu (mikrokrytalické celulóse - Avicelu) a následně provedena i na reálném substrátu (recyklovaný papír a předupravená pšeničná sláma).

Stanovení vitality kvasinek pomocí měření NAD(P)H

Grecman V., Brányik T., Kuřec M.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Fyziologický stav várečných kvasnic je jedním z důležitých faktorů a má zásadní vliv na konečnou kvalitu piva. Z tohoto důvodu je důležitá každodenní kontrola kvasnic. Byla stanovena řada metod pro popsání stavu kvasnic. Nejpoužívanější metodou je stanovení počtu mrtvých buněk (barvení methylenovou modří) pro rychlost a snadnost provedení a malé finanční náklady. Avšak její nevýhodou je subjektivnost.

Úkolem této práce bylo optimalizovat stanovení vitality kvasinek pomocí přístroje na měření intracelulární fluorescence NAD(P)H v provozních podmínkách. Dále se porovnávaly výsledky stanovení vitality s počtem mrtvých buněk, s průběhem kvašení v laboratorních a provozních podmínkách. Prakticky uplatnitelná závislost mezi měřením změn fluorescence NAD(P)H a rychlostí prokvašení se nenašla. Nakonec se sledoval vliv různých stresových faktorů na vitalitu kvasinek. U všech měření vlivu stresů se fluorescence NAD(P)H ukázala jako schopný indikátor pro detekci možných provozních problémů.

Průtoková cytometrie a její možnosti aplikace na rod *Clostridium*

Linhová M., Fribert P., Lipovský J., Patáková P., Rychtera M., Melzoch K.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Biobutanol je produktem aceton-butanol-ethanolové (ABE) fermentace, která je realizována různými solventogenními kmeny rodu *Clostridium*. Tento proces je typický počáteční produkcí organických kyselin s následující tvorbou rozpouštědel za částečné reutilizace kyselin. Butanol je rozpouštědlem, které je produkováno v největší míře 1-2 hm % (podle produkčního kmene, některé kmeny jsou s tímto ohledem geneticky modifikovány). Dnes se tato látka dostává do centra zájmu zejména z hlediska možné náhrady fosilních paliv.

Cílem této práce bylo vypracovat metodu, která na základě monitorování fyziologického stavu populace produkčního mikroorganismu umožní snáze optimalizovat proces produkce butanolu. Změna metabolismu klostridií je spojena se sporulací kultury, dochází k množství různých fyziologických a morfologických změn (mezi nimi také k přestavbě buněčné stěny, hromadění granulosy atd.), které byli předmětem pozorování v této práci. Během produkce rozpouštědel se buňka snaží adaptovat na vnější prostředí modifikací buněčné stěny na chemicky odolnější, při čemž dochází ke ztrátě schopnosti zadržovat Gramovo barvivo a tím ke změně v označení z G^+ na G^- bakterie. Rod *Clostridium* patří mezi bakterie, které jsou obtížně klasifikovatelné klasickým Gramovým barvením. Proto byla v této práci použita fluorescenční alternativa tohoto barvení v podobě značení hexidium jodidem, který selektivně značí nukleové kyseliny G^+ bakterií, zatímco přes chemicky odolnější stěnu G^- bakterií neprochází.

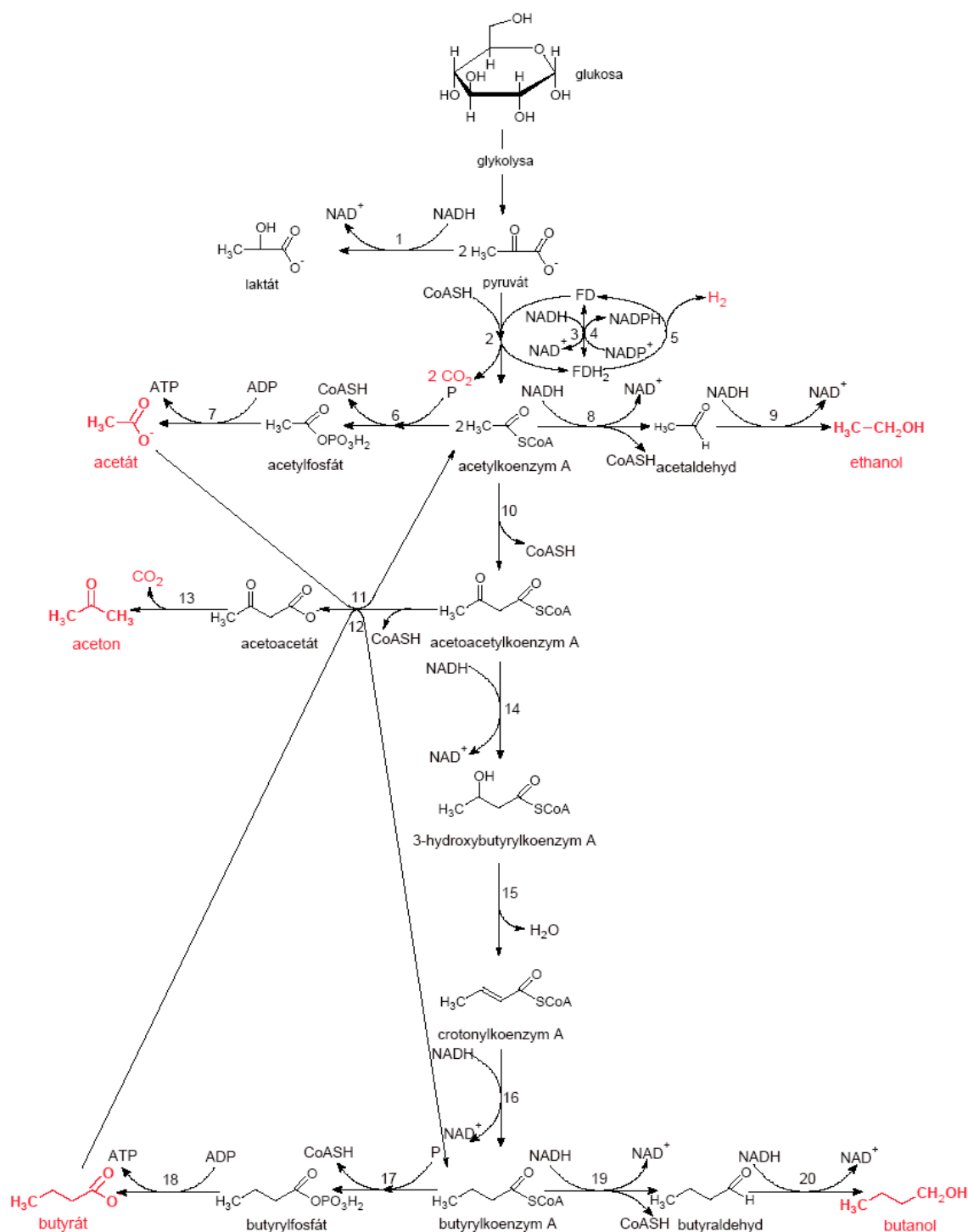
Byly provedeny kultivace *C. pasteurianum* v RCM médiu, kde kultura nesporeovala a neprodukovala rozpouštědla a v TYA médiu, kde docházelo k produkci rozpouštědel. Intenzita fluorescence buněk značených hexidium jodidem, stanovená pomocí průtokové cytometrie, odpovídala v případě, kdy kultura neprodukovala rozpouštědla, G^+ bakteriím (testováno pro *Bacillus megatherium*), naopak pokud produkovala rozpouštědla docházelo k poklesu intenzity fluorescence s produkcí butanolu na hodnoty G^- bakterií (testováno pro *Escherichia coli*). Současně byly stanoveny produkty metabolismu pomocí HPLC, byl monitorován růst biomasy sledováním změn optické density a spotřeba glukosy jako zdroje uhlíku a energie na HPLC. Během kultivací byly preparáty použité k cytometrickému stanovení sledovány také fluorescenční mikroskopií a barveny Lugolovým roztokem pro sledování obsahu granulosy. Bylo potvrzeno, že s počátkem sporulace dochází k tvorbě rozpouštědel a k hromadění granulosy, která byla dále spotřebována při maturaci spor. Všechny tyto faktory byly na závěr porovnány a vyvinutá metoda fluorescenčního

značení hexidium jodidem byla shledána jako vhodná k monitorování produkce rozpouštědel během kultivace *C. pasteurianum*.

Úvod

Rozpouštědla jako jsou butanol, aceton, ethanol, isopropanol produkuje široké spektrum druhů rodu *Clostridium* (Lee *et al.*, 2008). Mezi běžně známé druhy využívané k realizaci aceton-butanol-ethanolové (ABE) fermentace patří *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. saccharobutylicum* a *C. pasteurianum* (Dürre, 2005). Metabolismus solventogenních klostridií (Obr. 1) je charakteristický počáteční fází produkce organických kyselin s následujícím posunem k produkci převážně rozpouštědel. Rozpouštědlem, které je produkováno v největší míře je butanol, který inhibuje od kmenově specifické koncentrace buněčný růst. Většina kmenů a mikroorganismů obecně není schopna růstu za vyšších koncentrací butanolu v médiu než jsou 2 hm. % (Fisher *et al.*, 2008; Jones a Woods, 1986). Během přechodu z acidogenní fáze metabolismu na solventogenní dochází k množství různých fyziologických a morfologických změn převážně způsobených nastupující sporulací. Jones *et al.* (2008) předpokládá, že metabolická změna je doprovázena změnami ve stavbě buněčné stěny. Zásadní rozdíl ve stavbě buněčné stěny je u Gram pozitivních a Gram negativních bakterií. U Gram pozitivních bakterií jako stavební složka dominuje peptidoglykan, který je protkaný teichoovými kyselinami, zatímco gram negativní bakterie mají tenkou vrstvu peptidoglykanu, která je chráněna vnější membránou. Gram negativní bakterie jsou díky své vnější membráně výrazně chemicky odolnější například k nejrůznějším rozpouštědlům a antibiotikům (Kaprálek, 1987). Barvení podle Grama lze zjišťovat i pomocí fluorescenčních sond. Mason *et al.* (1998) zjistil, že tímto způsobem lze značit i bakterie, které jsou obtížně hodnotitelné klasickým Gramovým stanovením. Například pro rod *Clostridium* je neschopnost zadržet krystalickou violet (jedno z běžně používaných Gramových barviv) vysvětlována ztenčováním vrstvy peptidoglykanu v buněčné stěně během pozdější fáze exponenciálního růstu, kdy se začínají produkovat rozpouštědla. Tuto skutečnost jsme se rozhodli využít k rozpoznání přechodu mezi acidogenní a solventogenní fází metabolismu klostridií. Pro tento účel jsme zvolili značení hexidium jodidem (HI) a fluorescenční detekci průtokovou cytometrií. HI selektivně značí nukleové kyseliny G^+ bakterií, přes chemicky odolnější stěnu G^- bakterií neprochází (Haughland, 1996; Foster *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 1998). Detekce fluorescence pomocí průtokové cytometrie v posledních letech zaznamenává značný rozvoj jak v oblasti výzkumu tak v běžné praxi. Je pouze málo technik, které dokáží analyzovat tak velké množství parametrů v tak malém objemu vzorku za tak krátký čas (Givan, 2001). Sporulace klostridií výrazně komplikuje cytometrické stanovení, tato aplikace je tedy z vědeckého hlediska „nepopsaným listem“.

Podarilo se nám vyvinout novou metodu značení *C. pasteurianum* hexidium jodidem ke sledování produkce rozpouštědel s využitím moderního nástroje detekce fluorescence-průtokové cytometrie. Pro komplexnější monitorování kultivací *C. pasteurianum* byly preparáty použité k cytometrickému stanovení sledovány také fluorescenční mikroskopií a barveny Lugolovým roztokem pro snadnější detekci granulosity. Tento zásobní polyglukan, který je podobný glykogenu a skládá se z lineárních řetězců $\alpha(1\rightarrow4)$ D-glukopyranosových jednotek s občasnou vazbou $(1\rightarrow6)$ se vytváří nejčastěji na konci exponenciální fáze růstu před nástupem sporulace a převážná část je degradována během sporulace. Granulosa je využívána jako zdroj uhlíku a energie pro formaci a maturaci spor (Dürre, 2005; Reisenbach, 1986). Bylo potvrzeno, že s počátkem sporulace dochází k tvorbě rozpouštědel a k hromadění granulosity, která byla dále spotřebována při zrání spor.



Obr.1: Schéma rozkladu glukosy bakteriemi rodu *Clostridium* upraveno podle (Dürre, 2005) enzymi katalyzující tyto reakce: (1) laktát dehydrogenasa, (2) pyruvát-ferredoxin oxireduktasa, (3) NADH-ferredoxin oxidoreduktasa, (4) NADPH-ferredoxin oxidoreduktasa, (5) hydrogenasa, (6) fosfát acetyltransferasa, (7) acetát kinasa, (8) acetaldehyd dehydrogenasa, (9) ethanol dehydrogenasa, (10) thiolasa, (11,12) acetoacetyl-CoA:acetát/butyrát-CoA transferasa, (13) acetoactát dekarboxylasa, (14) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenasa, (15) crotonasa, (16) butyryl-CoA dehydrogenasa, (17) fosfát butyltransferasa, (18) butyrát kinasa, (19) butyraldehyd dehydrogenasa, (20) butanol dehydrogenasa

Materiály a metody

Mikroorganismus a kultivační podmínky: V této práci byl použit solventogenní kmen *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598, uchovávaný ve formě spor resuspendovaných ve sterilní destilované vodě při 4°C. Kmen byl kultivován v modifikovaném glukosovém médiu (TYA), které obsahovalo na 1 litr destilované vody: 2 g kvasničného autolýzátu, 20 g glukosy, 6 g trytonu, 0,5 g KH_2PO_4 , 3 g acetátu amonného, 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH bylo upraveno na 6,8 nebo v Reinforced clostridial medium (RCM) (Merck, Germany). Kultivační médium bylo sterilizováno v autoklávu při 121°C, po dobu 20 min. Kultivace byly prováděny při 37 °C, v 5 litrovém laboratorním bioreaktoru (B. Braun Biotech Int., Německo), za anaerobních podmínek, ve 3 litrech TYA nebo RCM média, bez úpravy pH během kultivace. Fermentor byl inokulován 300 ml TYA nebo RCM média s kulturou starou 24 hodin, která vyklíčila ze sporových konzerv. Sporové konzervy byly vystaveny tepelnému šoku (1 min při 80°C) s následným ochlazením v ledové tříšti (2 min).

Jako modelové mikroorganismy pro G^+ bakterie byl použit *Bacillus megatherium* CCDBM 3045 a pro G^- bakterie *E. coli* CCDBM 3125 kultivované v Lauria-Bertaniho médiu, které obsahovalo na 1 litr destilované vody: 10 g peptonu, 5 g kvasničného autolýzátu a 5 g NaCl, pH bylo upraveno na 7,0. Kultivační médium bylo sterilizováno v autoklávu při 121°C, po dobu 20 min. *B. megatherium* byl kultivován při 28 °C za aerobních podmínek a *E. coli* při 37°C za anaerobních podmínek v 500 ml Erlenmeyerových baňkách.

Analytické metody: Růst *C.pasteurianum* byl sledován každé 2 hodiny měřením optické density na spektrofotometru Cary 50 Bio (Varian, Španělsko) při 600 nm proti demineralizované vodě. Úbytek substrátu (glukosy) a změna koncentrace produktů byla měřena každé 2 hodiny na HPLC (Agilent Series 1200 HPLC Agilent, Španělsko) s Polymer IEX H^+ kolonou (Watrex, Česká republika), při 60 °C, s refraktometrickou detekcí. Mobilní fáze byla 5 mM H_2SO_4 , průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml.min⁻¹ a nástřik vzorku na 20 µl.

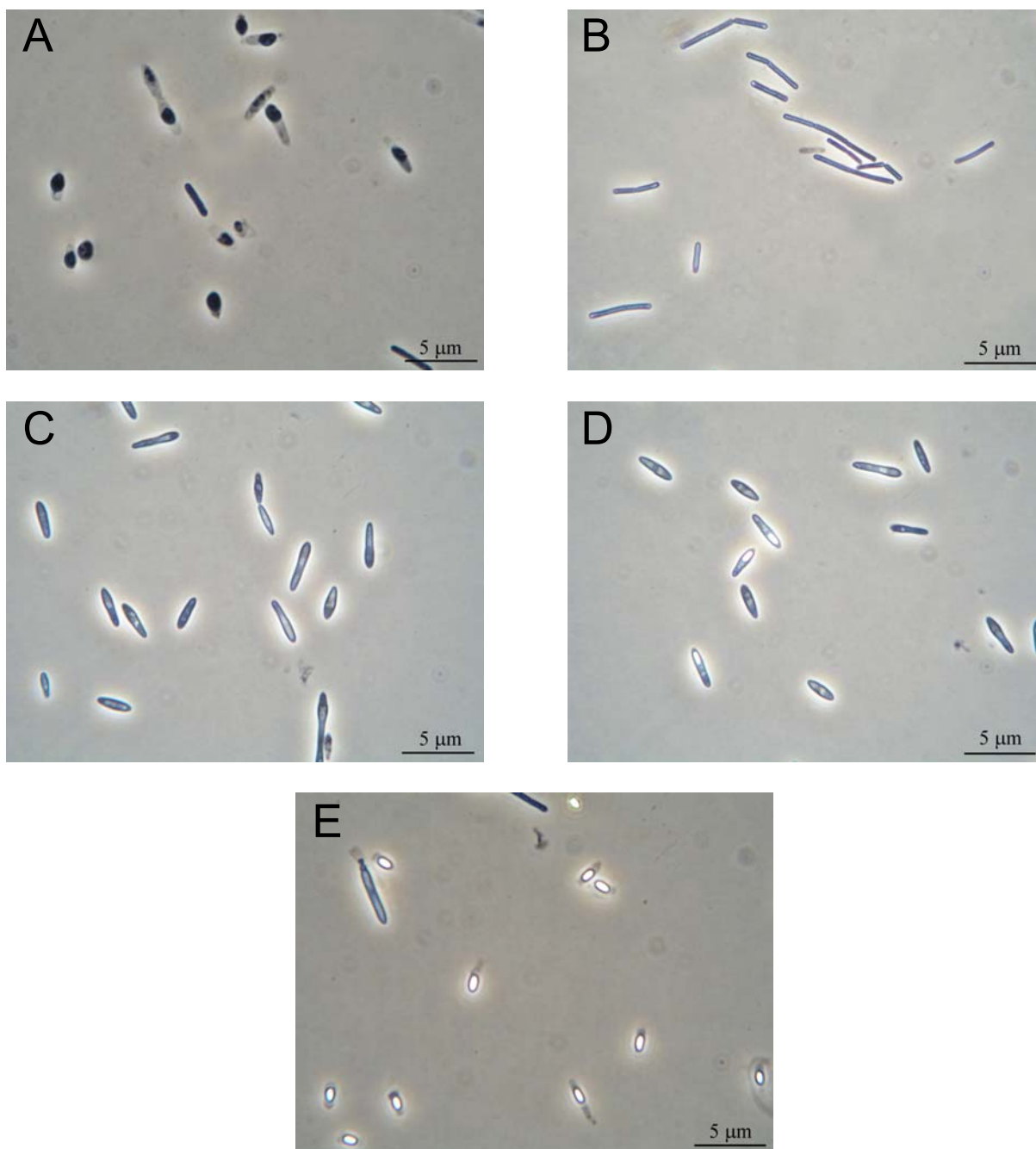
Granulosa byla barvena podle metody Canganella a Wiegel (2000).

Fluorescenční analýza: Vzorky z kultivací byly dvakrát promyty a naředěny demineralizovanou vodou na $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,2 \pm 0,02$. HI byl přidáván k takto naředěným vzorkům tak aby jeho výsledná koncentrace v roztoku byla 2,5 µl.ml⁻¹. Vzorky byly inkubovány s fluorescenční sondou při pokojové teplotě, bez přístupu světla, po dobu 10 min; následně byly okamžitě analyzovány na průtokovém cytometru PAS III (Partec, Německo). Zdrojem excitace byl argonový laser (488 nm). Byly zaznamenány změny signálů forward scatter (FSC), side scatter (SSC) a červená fluorescence (FL3, >605 nm). Všechny signály z detektorů byly vyhodnoceny s použitím logaritmického měřítka a napětí na fotonásobičích detektorů bylo 418, 439, 494 pro FSC, SSC a FL3. Průtok nosné kapaliny cytometru byl nastaven na 0,5 µl.s⁻¹. U každého vzorku bylo analyzováno ~ 100 000 částic. Pro kalibraci signálů průtokového cytometru byly použity 3 µm kalibrační kuličky (Beckman Coulter, USA). Data byla analyzována softwarem FSC express version 3 (De Novo software, USA). Současně s cytometrickou analýzou byly vzorky sledovány fluorescenčním mikroskopem BX-51 (Olympus, Japonsko), kde byla zdrojem excitace 100 W rtuťová výbojka (excitace 450-480 nm, emise ≥ 515 nm). Mikrofotografie mikroorganismů byly pořízeny digitálním fotoaparátem Camedia C-5050ZOOM (Olympus, Japonsko) se zvětšením 2000 krát.

Výsledky a diskuse

Paredes *et al.* (2005) shrnuje vhodné podmínky pro sporulaci klostridií takto: nízké intracelulární pH buněk, přídavek butyrátu (doporučuje se taktéž octan), vysoký obsah uhlíkatého zdroje a ATP a zvyšující se obsah intracelulární redukované energie v podobě NAD(P)H. Proto jsme pro sledování průběhu sporulace zvolili kultivace na TYA médiu

(médium s dostatečným množstvím glukosy a octanem amonným) a mikroskopicky jsme pozorovali ve fázovém kontrastu různé morfologické fáze sporulace (Obr. 2).



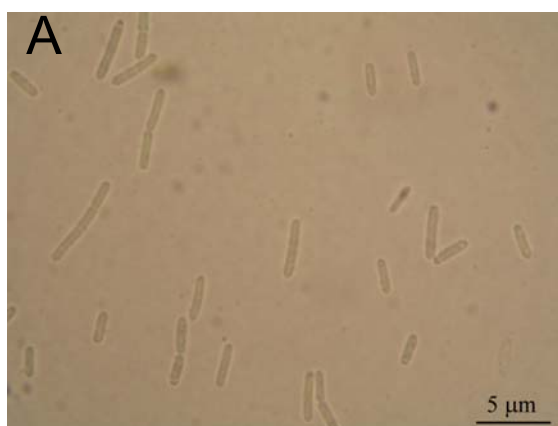
Obr. 2: Morfologická stádia *C. pasteurianum* během kultivace v bioreaktoru, sledováno ve fázovém kontrastu

(A) aktivované spory připravené na germinaci, (B) vegetativní b., (C) klostridiální (zduřelé) b., (D) endospory, (E) světlolomné klidové stádium spory

Zralé spory se po vystavení teplotnímu šoku (80°C, 1 min) nejprve tzv. aktivují při čemž přijímají větší množství vody a mění se jejich vzhled ze světlolomných na tmavé spory (Obr. 2A). Následuje klíčení (germinace) spór při níž se tvoří vegetativní buňky (Obr. 2B). Germinace spor klostridií je stejná jako u rodu *Bacillus*, stejnou změnu ve světlolomnosti spor během germinace ukazují ve fázovém kontrastu u *B. anthracis* také Swiecki *et al.* (2006). Vegetativní buňky se dělí dokud se podmínky v médiu (převážně způsobeno nahromadění

organických kyselin) nezmění natolik, že metabolismus přejde z acidogenní fáze do fáze solventogenní, což je spojeno se začátkem sporulace. Začne se tvořit předsporové septum, kdy buňky „duří“ za tvorby charakteristického tvaru tzv. klostridiálního morfologického stádia (Obr. 2C). Následuje vytvoření endospory, mikroskopicky pozorovatelné ve fázovém kontrastu jako světlé části uvnitř tmavé buňky (Obr. 2D). Následuje tvorba a dozrávání (maturace) obalových vrstev spory jako jsou plášť a kortex až se nakonec zralá spora uvolní z mateřské buňky. V tomto stádiu světloolomné volné spory (Obr. 2E) přechází nepříznivé podmínky a pokud spory převedeme do čerstvého média celý proces se opakuje. Stejně poznatky podrobně popisuje také Mackey a Morris (1971), kteří také upozorňují na rozdíl *C. pasteurianum* a ostatních klostridií ve tvorbě sporového pláště, která předchází tvorbě kortexu.

Během sporulace *C. pasteurianum* byl sledován také obsah granulosity, která byla barvena Lugolovým roztokem a pozorována mikroskopicky ve světelném poli. U vegetativních buněk nebyla pozorovatelná žádná granulosa (Obr. 3A). U následujícího stádia sporulace klostridiálních (zduřelých) buněk již granulosa patrná byla (Obr. 3B). U endospor na obrázku 3C lze pozorovat maximum nahromaděné granulosity, která se pak postupně spotřebovává při maturaci spor. Na obrázku 3D, kdy buňky byly odebrány na konci kultivace, již je pozorovatelné, že obsah granulosity je zanedbatelný a vyskytuje se pouze u buněk, které ještě dokončují sporulaci.



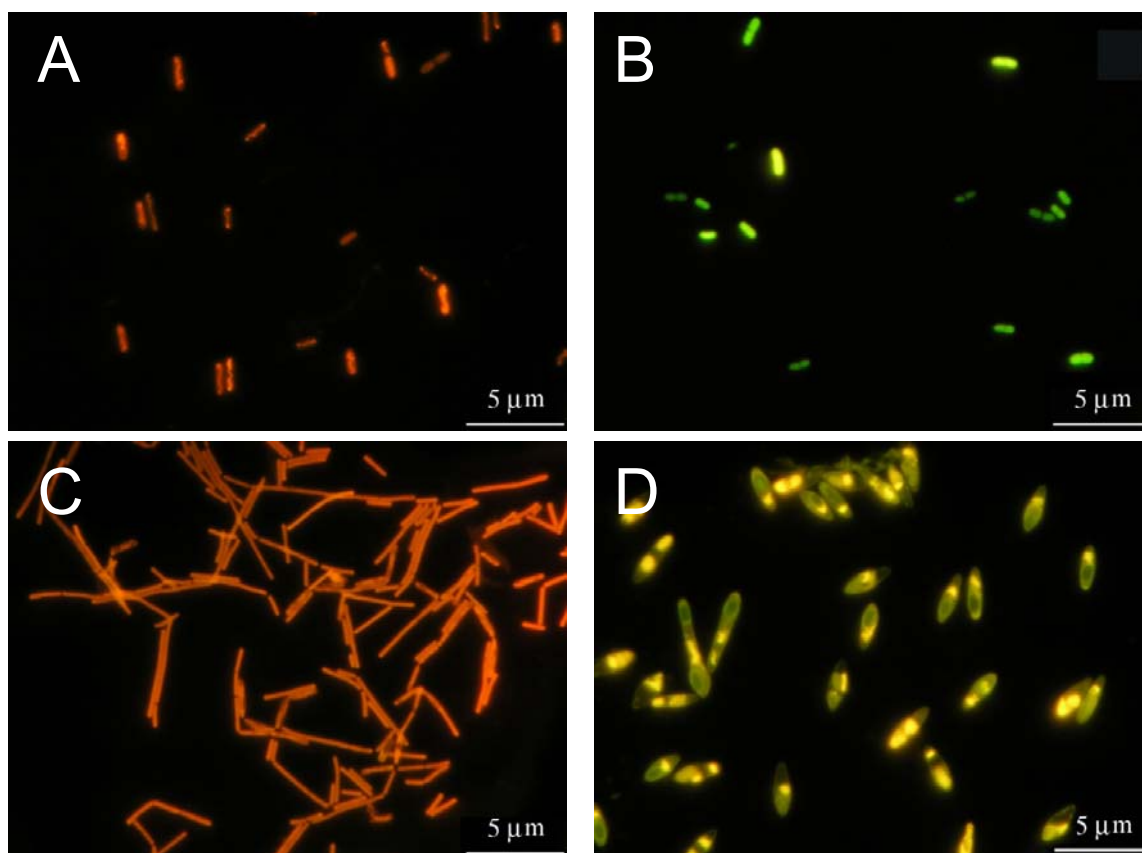
Obr. 3: Granulosa *C. pasteurianum* barvená Lugolovým roztokem při kultivace v bioreaktoru (A) počátek kultivace vegetativní b., granulosa se netvoří, (B) tvorba klostridiálních morfologických stádií, tvorba granulosity, (C) tvorba endospor, granulosa se spotřebovává během sporulace, (D) buňky z konečných fází kultivace, granulosa se již netvoří, pouze se spotřebovává u sporulujících buněk

Tyto fotografie potvrzují poznatky Reysenbacha *et al.* (1986), který u *C. acetobutylicum* zaznamenal nejvyšší množství granulosity po počátku tvorby endospor a postupně se tento obsah během kultivace snižoval. Nejvyšší obsah granulosity spojený s tvorbou endospor potvrzuje také Mackey a Morris (1971) a první známky tvorby granulosity pozorovali taktéž u klostridiálních stádií sporulace.

Během kultivace *C. pasteurianum* byl také sledován průběh značení hexidium jodidem pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie. Pomocí hexidium jodidu se podařilo Mason *et al.* správně určit barvení podle Grama u 45 bakteriálních kmenů. Podle této techniky hexidium jodid značí G^+ bakterie červeně, zatímco přes vnější buněčnou membránu G^- bakterií neprochází. Pokud použijeme pro zviditelnění G^- bakterií nějaké zelené fluorescenční barvivo značící všechny bakterie (G^+ i G^-) např. syto 13, dosáhneme výsledného značení G^+ bakterií červeně a G^- bakterií zeleně (G^+ bakterie jsou značeny zeleně i červeně ale zelená fluorescence syto 13 je zhasena hexidium jodidem, výsledná barva je tedy červená a G^- bakterie jsou značeny pouze zeleně). Při sledování intenzity fluorescence značení hexidium jodidem byla použita veličina FL3/FSC (intenzita červené fluorescence dělená ekvivalentem velikosti-FSC), protože jak lze pozorovat na Obr. 1 i Obr. 2 velikost buněk *C. pasteurianum* se během kultivace mění. Značení hexidium jodidu jsme nejprve ověřili na G^+ mikroorganismu *B. megatherium* a G^- mikroorganismu *E. coli*. Stejně jako Mason *et al.* (1998) se nám podařilo správně určit G^+ (Obr. 4A) a G^- (Obr. 4B) bakterie. Pomocí průtokové cytometrie jsme pro G^+ bakterie získaly poměr FL3/FSC rovný $2,60 \pm 0,14$ a pro G^- bakterie měl tento poměr podle předpokladu nižší hodnotu $1,02 \pm 0,33$. Buňky *C. pasteurianum* se během kultivace značili hexidium jodidem (pro mikroskopické pozorování značeno v kombinaci se syto 13) nejprve červeně (Obr. 4C) jako G^+ bakterie, naopak v závěru kultivace se značili zeleně (Obr. 4D) jako G^- bakterie. Podobné změny ve značení propidium jodidem pozoroval také Jones *et al.* u *C. acetobutylicum* a vysvětloval si tento jev rozdílnými podmínkami v kultivačním prostředí, zatímco na počátku kultivace jsou v médiu obsaženy hlavně organické kyseliny na konci kultivace jsou hlavními produkty organická rozpouštědla. Pro analýzu na průtokovém cytometru byl *C. pasteurianum* kultivován ve 2 médiích: TYA médium, vhodné pro sporulaci a produkci rozpouštědel klostridiemi (Paredes *et al.*, 2005) a v RCM médiu. Komerčně vyráběné RCM médium bylo zde použito jako srovnávací, solventogenní klostridie v tomto prostředí nepřepnou svůj metabolismus z počáteční acidogenní fáze na solventogenní, a nezačnou tedy tvořit organická rozpouštědla ani sporulovat (Shaheen *et al.*, 2000). Uvádí se, že důvodem zastavení metabolismu v acidogenní fázi je nedostatek hlavního zdroje uhlíku a energie (obsah glukosy v RCM médiu – 5 g.l^{-1}). Naopak v TYA médiu přejde kultura z vegetativního dělení ke sporulaci zároveň s počátkem produkce rozpouštědel (Patáková *et al.*, 2009)

V RCM médiu, kde *C. pasteurianum* nesporelovalo a produkce rozpouštědel byla zanedbatelná (Obr. 5C), poměr FL3/FSC byl $2,65 \pm 0,45$ (Obr. 5A), tedy blízko hodnot srovnatelných pro G^+ bakterii *B. megatherium* ($2,60 \pm 0,14$). V RCM médiu nedochází k výraznější změně vnějších podmínek vlivem produkce rozpouštědel, a proto jsme nezaznamenali pokles intenzity fluorescence k hodnotám typickým pro G^- bakterie. Od 8. hodiny kultivace se zvýšil poměr FL3/FSC, což bylo způsobeno usmrcením populace, jak je patrné z poklesu optické density vlivem vyčerpání glukosy (Obr. 5A). Během smrti se

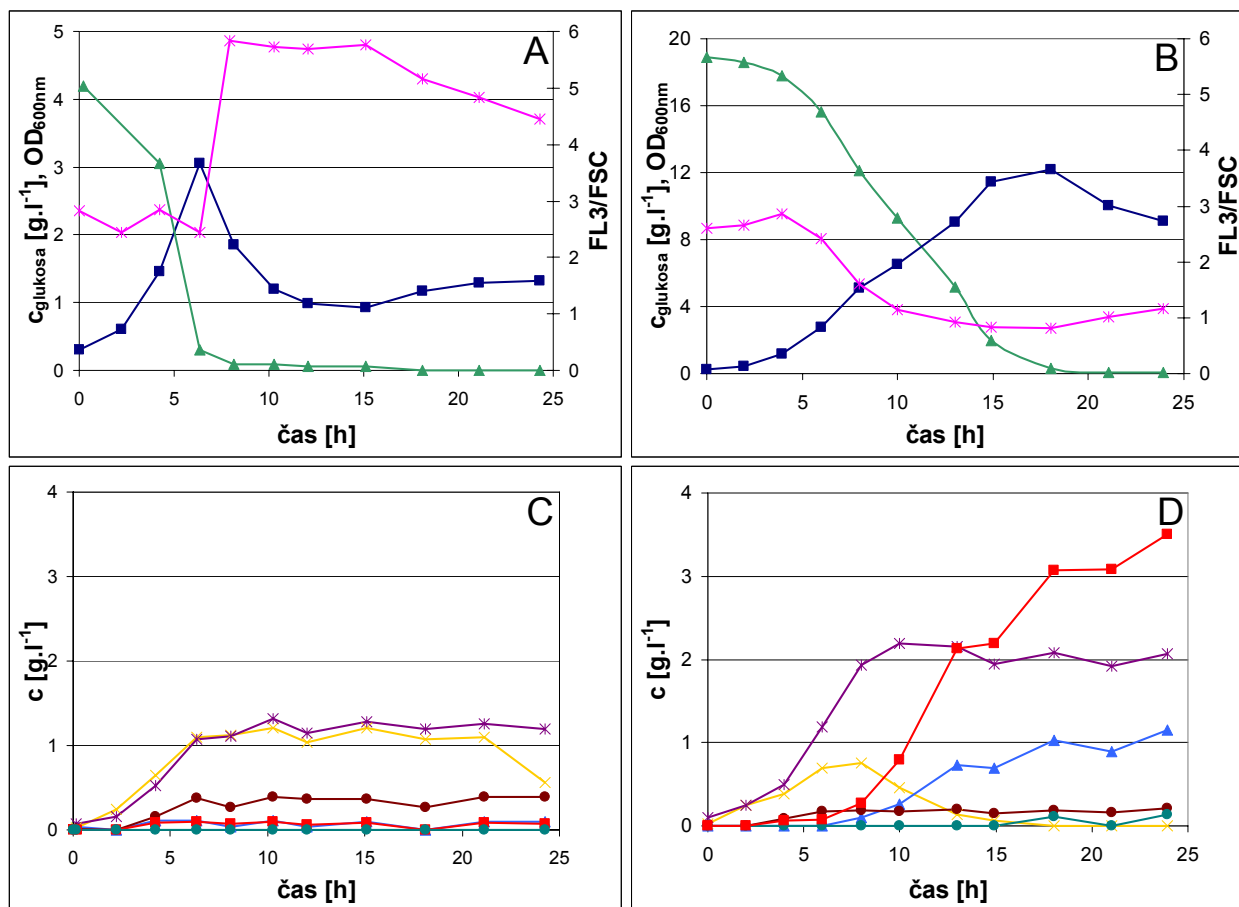
buněčné obaly mikroorganismů stávají prostupnější pro fluorescenční sondy jako je např. hexidium jodid a důsledkem je vyšší intenzita fluorescence nezávisle na tom jestli je bakterie G^+ nebo G^- .



Obr. 4: Mikroorganismy fluorescenčně značené hexidium jodidem v kombinaci se syto 13 pro rozlišení G^+ a G^- bakterií

(A) G^+ *B. megatherium*, značí se HI červeně, (B) G^- *E. coli*, značí se syto 13 zeleně, (C) *C. pasteurianum* počátek kultivace, buňky se značí červeně jako G^+ bakterie, (D) *C. pasteurianum* konec kultivace, buňky se značí zeleně jako G^- bakterie

V TYA médiu buňky *C. pasteurianum* v exponenciální fázi růstu začaly sporulovat a produkovat rozpouštědla (Obr. 5D). Počátek tvorby rozpouštědel a sporulace byl doprovázen významným poklesem poměru FL3/FSC z $2,64 \pm 0,37$ na $0,94 \pm 0,27$ (Obr. 5B), tedy z hodnoty typické pro G^+ bakterie (*B. megatherium* - $2,60 \pm 0,14$) na hodnotu typickou pro G^- bakterie (*E. coli* - $1,02 \pm 0,33$). Tento pokles poměru FL3/FSC si vysvětlujeme jako reakci mikroorganismu na nepříznivé vnější prostředí (produkce rozpouštědel) přestavbou buněčné stěny na odolnější vůči rozpouštědlům, tedy buněčnou stěnu podobnou G^- bakteriím. Tento možný jev pozoroval Bartholomew a Mittwer (1952) při barvení klostridií podle Grama. Tyto výsledky jsou také v souladu s Jones *et al.* (2008), kteří se domnívají že změna ve fluorescenčním značení *Clostridium acetobutylicum* propidium jodidem je způsobena reakcí mikroorganismu na změnu vnějšího prostředí.



Obr. 5: Srovnání batch kultivací *C. pasteurianum* v RCM (A, C) a TYA (B, D) médiu z hlediska produkce rozpouštědel a intenzity fluorescence značených buněk hexidium jodidem (HI)

A, B: růžová hvězda-intenzita fluorescence FL3/FSC hexidium jodidu, modrý čtverec- OD_{600nm} , zelený trojúhelník- koncentrace glukosy v $g.l^{-1}$

C, D: koncentrace produktů fermentace v $g.l^{-1}$: červený čtverec-butanol, zelené kolečko-ethanol, modrý trojúhelník-aceton, fialová hvězda-kyselina máselná, žlutý kříž-kyselina mléčná, hnědé kolečko-isopropanol

Závěr

Postupným sledováním sporulace až po vývin metody fluorescenčního značení hexidium jodidem s detekcí průtokovou cytometrií jsme umožnili lépe a rychleji rozpoznat počátek tvorby rozpouštědel během kultivace *C. pasteurianum*. Věříme, že tato metoda najde své uplatnění při monitorování ABE fermentace jako jeden z markerů počátku produkce butanolu (v nejvyšší míře produkované rozpouštědlo).

Tato studie byla zpracována s finanční podporou projektů TIP č. FR-TI1/218, NAZV č. QH81323/2008, FRVŠ za podpory MŠMT č. 546/2010, výzkumného záměru MŠM6046137305 a z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT č. 21/2010.

Literatura

Bartholomew J. W., Mittwer T. (1952) The Gram stain, *Bacteriological Reviews* 16, pp. 1-29

Canganella F., Wiegel J. (2000) Continuous cultivation of *Clostridium thermobutyricum* in a rotary fermentor systém, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24, pp. 7-13

- P. Dürre (2005) Handbook on Clostridium, CRC Press, USA, 1. vydání
- Fisher C. R., Klein-Marcuschamer D., Stephanopoulos G. (2008) Selection and optimization of microbial host for biofuels production, Metabolic Engineering 10, pp. 295-304
- Foster S., Snape J. R., Lappin-Scott H. M. (2002) Simultaneous Fluorescent Gram Staining and Activity Assessment of Activated Sludge Bacteria, Applied and Environmental Microbiology 68, pp. 4772-4779
- Givan A. L. (2001) Flow cytometry: First principles, Wiley-Liss, New York, pp. 41-57
- Haughland R. P. (1996) Nucleic Acid Stains, Handbook of Fluorescent Probes Research, Molecular probes
- Jones S. W., Paredes C. J., Tracy B., Cheng N., Sillers R., Sanger R. S., Papoutsakis E. T. (2008) The transcriptional program underlying the physiology of clostridial sporulation, Geonome Biology 9, R114
- Jones D. T., Woods D. R. (1986) Acetone-butanol fermentation revisited, Microbiological Reviews 50, pp. 484-524
- Kaprálék F. (1987) Fyziologie bakterií, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1. vydání
- Lee S. Y., Park J. H., Jang S. H., Nielsen L. K., Kim J., Jung K. K. (2008) Fermentative butanol production by clostridia, Biotechnology and Bioengineering 101, pp. 209-228
- Mackey B. M., Morris J. G. (1971) Ultrastructural changes during sporulation of *Clostridium pasteurianum*, Journal of General Microbiology 66, pp. 1-13
- Mason D. J., Shanmuganathan S., Mortimer F. C., Gant V. A. (1998) A fluorescent Gram stain for flow cytometry and epifluorescence microscopy, Applied and Environmental Microbiology 64, pp. 2681-2685
- Paredes C. J., Alsaker K. V., Papoutsakis E. T. (2005) A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology, Nature Reviews Microbiology 3, pp. 969-978
- Patáková P., Lipovský J., Čížková H., Fořtová J., Rychtera M., Melzoch K. (2009) Exploitation of food feedstock and waste for production of biobutanol. Czech Journal of Food Sciences 27, pp. 276-283
- Reysenbach A. L., Ravenscroft N., Long S., Jones D. T., Woods D. R. (1986) Characterisation, biosynthesis, and regulation of granulose in *Clostridium acetobutylicum*, Applied and Environmental Microbiology 52, pp. 185-190
- Shaheen R., Shirley M., Jones D.T. (2000) Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 2, pp. 115-124
- Swiecki M. K., Lisanby M. W., Shu F., Turnbough Ch. L. Jr., Kearney J. F. (2006) Monoclonal antibodies for Bacillus anthracis spore detection and functional analyses of spore germination and outgrowth, The Journal of Immunology 176, pp. 6076-6084

Hodnocení fyziologického stavu rozpouštědlových klostridií pomocí průtokové cytometrie

Keprova A., Linhová M., Patáková P.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu sledování viability u rozpouštědlových klostridií s využitím fluorescenčního barvení a průtokové cytometrie. Ze šesti testovaných sond byl jako nejvhodnější, na základě schopnosti odlišit ve směsi mrtvé buňky *Clostridium pasteurianum* od živých, vyhodnocen bis oxonol, pro který byly nalezeny optimální podmínky značení: demineralizovaná voda, buněčná suspenze naředěná na OD_{600nm} ~ 0,2, koncentrace sondy 0,05 mg.ml⁻¹ a doba značení 7 min. Tato metoda byla následně použita jak pro sledování toxického vlivu kyseliny máselné nebo butanolu na kmeny *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium acetobutylicum* a *Clostridium beijerinckii*, kdy bylo zjištěno, že maximální tolerovaná koncentrace kyseliny máselné je 5 g.l⁻¹ a maximální tolerovaná koncentrace butanolu je 8 g.l⁻¹ pro kmen *Clostridium pasteurianum* tak pro monitorování fyziologického stavu bakterií *Clostridium pasteurianum* při vsádkové kultivaci.

Vliv koncentrace původní mladiny na obsah mykotoxinů

Knytl M., Fiala J.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Předmětem této práce bylo studium vlivu zvýšené koncentrace mladiny spolu se zvýšeným obsahem mykotoxinů na fyziologii pivovarských kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (carlsbergensis), průběh hlavního kvašení a vliv koncentrace původní mladiny na obsah mykotoxinů.

Bylo sledováno kvašení 12%, 16%, 20% mladiny a dále pak kvašení 16% a 20% mladiny s přídavkem deoxynivalenolu v množství $80 \mu\text{g.l}^{-1}$. V průběhu kvašení byly sledovány základní analytické parametry mladiny a mladých piv. Při posuzování fyziologického stavu byla použita průtoková cytometrie, pomocí níž byl sledován obsah trehalosy, glykogenu, bílkovin a DNA v buňkách odebraných během hlavního kvašení.

Ukázalo se, že koncentrace původní mladiny nemá po naředění na jednotnou koncentraci zásadní vliv na obsah mykotoxinů v hotovém pivě. Zvýšený obsah mykotoxinů a zvýšená koncentrace mladiny může mít vliv na fyziologii pivovarských kvasinek.

Význam a stanovení alkoholů, esterů a mastných kyselin v pivu

Štěrbá K., Dostálek P.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Alkoholy, estery a mastné kyseliny patří mezi významné senzoricky aktivní látky piva. Je ukázáno aroma vybraných látek, jak vznikají a které technologické faktory mohou jejich vznik ovlivnit. Dále je uveden seznam metod, které jsou používány k jejich stanovení (destilační metody, extrakční metody, SPE, SBSE, statická HS, dynamická HS, SPME), stručný popis metod a zhodnocení, zejména s přihlédnutím k jejich jednoduchosti, rychlosti a možnosti automatizace.

Struktura pивní pěny

Baszczyński M.^{1,2}, Novák P.^{1,2}, Brányik T.¹, Růžicka M.C.²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Ústav chemických procesů AV ČR

Úvod

Pěny jsou běžnou součástí potravin a nápojů (např. sycené nealkoholické nápoje, šampaňské, pivo), výrobků osobní hygieny farmaceutických výrobků, hasících přístrojů, minerální flotace, čistících prostředků, stavebních hmot atd. Výzkum pěn je proto atraktivní oblast vědy, která se těší pozornosti mnoha vědců. (Weaire et al, 1999 ; Wilson, 1989)

Pěna je definována jako disperze plynu v kapalině, kde dispergovanou fází je vždy plyn. K nejdůležitějším pojmům popisujících pěnu patří pěnivost, přilnavost, barva, objem a hustota, ale především stabilita a struktura a všechny tyto parametry jsou dány jak fyzikálními tak i chemickými vlastnostmi kapaliny i plynu.

Pěnivost vyjadřuje schopnost kapaliny tvořit pěnu. Stabilita pěny je dána časem mezi vytvořením pěny a její samovolnou destrukcí. Pro vznik stabilní pěny je nutná přítomnost vhodných pěnotvorných látek, které vytváří stabilizující film okolo jednotlivých částic disperzního podílu. O stabilitě pěny rozhodují především vlastnosti povrchových filmů a disperzního prostředí. Mezi nejdůležitější faktory patří chemické složení roztoku, pružnost a stálost fázového rozhraní, tloušťka filmu, viskozita disperzního prostředí, elektrický náboj povrchového filmu a hodnota tlaku nasycené páry disperzního prostředí nad pěnou. (Exerowa et al, 1997)

Vlastnosti pивní pěny jsou vnímány rozdílně. V jiných zemích se pивní pění tolik pozornosti nevěnuje. Britové dokonce čepují pivo takovým způsobem, aby mělo pěny co nejméně a při pití nepřekážela. Pro středoevropany má však objem, vzhled a stabilita pивní pěny zásadní vliv na to, jestli jim pivo bude chutnat nebo naopak ne. Stabilita pивní pěny je důležitý ukazatel, podle kterého se hodnotí její kvalita. Kvalita pивní pěny je definována jako kombinace její stability, množství, barvy, chuti, smetanovosti, pevnosti a schopností “kroužkovat” (ulpívat na sklo). Nejdůležitější je však celkový dojem, jakým na nás pěna působí. Taková pěna se tedy očekává u piva s “rozumnou” pěnivostí, narozdíl od pěny z nepřírozeným vzhledem a strukturou. (Bamforth, 2004) Pěny u pив plzeňského typu by měly vydržet okolo 200 sekund.

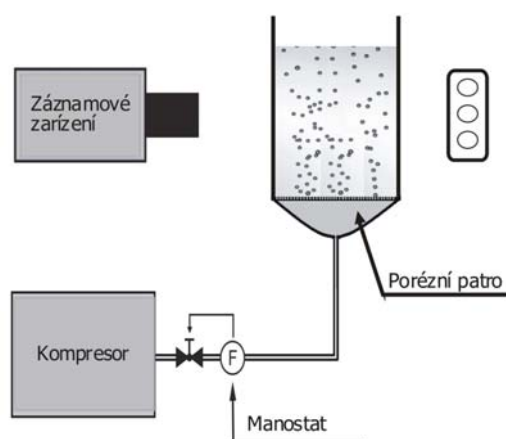
Stabilita pěny se dnes měří převážně konduktometricky pomocí přístroje typu NIBEM. Ke stanovení stability pěn se využívá mnoho dalších metod. (Evans et al, 2008; Walin et al, 2010).

Nejjednodušší a nejsnadnější způsob k posouzení pěnivosti vzorku piva, je nalít pivo do sklenice a posoudit pouhým okem kvalitu pěny (stabilitu strukturu

pěnovost atd.). To je čistě subjektivní metoda a z toho vyplývají nevýhody tohoto postupu. Jak ale ukázali (Haugsted et al, 1990), je možné využít analýzy obrazu (objektivní metoda) k posouzení kvality pěny, které je nejen snadno měřitelné ale i opakovatelné.

Materiál a Metody

Ke studiu pěny jako celku bylo využito rektangulárních skleněných a plexisklových kolon různých průměrů (3,5-10 x 10-15 cm) a výšky 30 cm s porézním patrem pro tvorbu bublin. Zdrojem plynu je kompresor s uhlíkovým filtrem. Manostat pro kontrolu průtoku plynu umožňuje nastavení průtoku vzduchu. Jako záznamové zařízení byly použito fotoaparát (Nikon D70) s oběktivy 65mm a 105 mm a kamery s vysokým rozlišením obrazu (Pulnix, 2048x2048 pixelů) se stejnými oběktivy. K nasvícení bylo použito studeného světla, které bylo umístěno za kolonou, proti oběktivu. (obr. 1)



Obr.1: Model aparatury pro tvorbu pěn: systém se skládá ze zařízení pro uchycení cely s porézním patrem, záznamového zařízení, zdroje pro jednotné podsvícení cely, zdroje vzduchu a manostatu.

Jako modelové roztoky byly využity různé koncentrace BSA (bovine serum albumin) rozpuštěného v destilované vodě, protože pěna vytvořená z tohoto roztoku je velice podobná té pивní.

K vyhodnocení stability pěny jsme vytvořili vlastní program v programu MatLab, který k analýze využívá pohybu rozhraní fází pěna/vzduch pěna/kapalina.

K vyhodnocení struktury pěny byl použit komerčně dostupný program Nis elements od firmy Laboratory imaging, spol sro. Tento program je určen převážně pro úpravu a analýzu 2D obrazu.

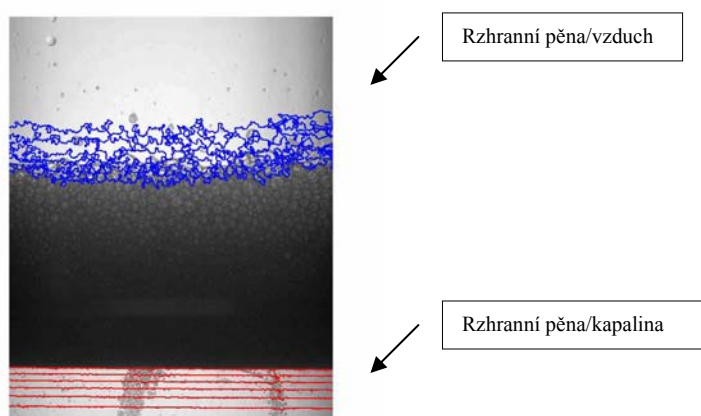
Výsledky a diskuze

Pivní pěna patří mezi první vjemy, které spotřebitel vnímá po natočení piva do sklenice. Aby kvalita piva splňovala požadavky zákazníků, je velice pečlivě kontrolována. Pro každou součást určující kvalitu piva (chuť, barva, hořkost, obsah alkoholu atd.) existuje v dnešní době analytická metoda. Stejně tak existuje pro kvalitu pivní pěny. Posuzuje se především stabilita pěny, která se měří převážně konduktometricky pomocí přístroje typu NIBEM. Parametry, které se dají touto metodou zjistit popisují úbytek pěny v čase (její stabilitu).

Obrazová analýza pěny může poskytnout podstatně víc parametrů popisujících chování pěny v čase, které můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin. První popisují pěnu jako celek, pohyb fázových rozhraní pivo/pěna, pěna/vzduch, a mohou nám poskytnout údaje o stabilitě pěny, rychlosti odvodňování (drinage), poločasu a času rozpadu. Druhá skupina parametrů popisuje detail pěny a může nám poskytnout informace o struktuře pěny, velikosti bublin, jejich tvaru a velikosti. Parametry jsou přehledně shrnuty v tabulce (tab.1., tab. 2.)

Metoda určení stability pěny obrazovou analýzou

Světelný zdroj je umístěn za celou pro získání jednotného pozadí. Uživatel vybere počet snímků, které za určitý časový interval pořídí. Podprogram programu MatLab na sekvenci obrázků vyhodnotí hranice pivo/pěna a pěna/vzduch (obr.2.)

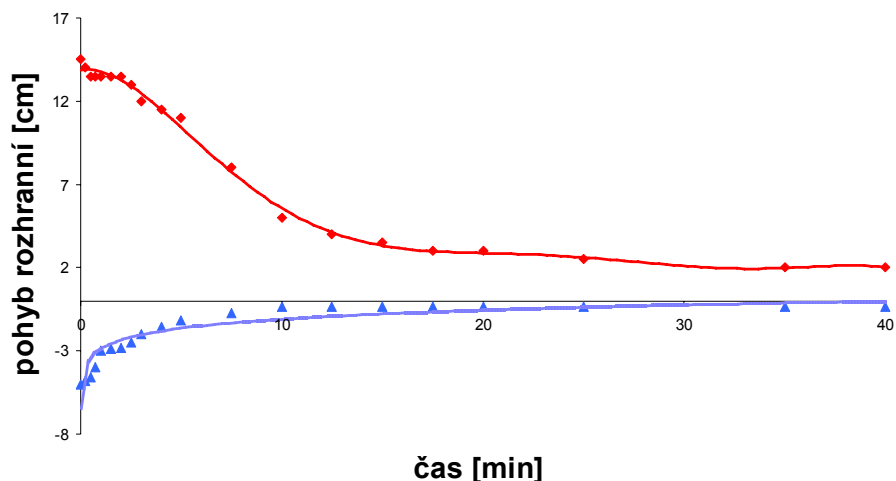


Obr.2: Pohyb rozhraní: modré čáry vyjadřují úbytek pěny v čase, červené čáry vyjadřují pohyb rozhraní kapalina/pěna (drainage)

Jakmile je série snímků vyhodnocena, data se převedou do programu microsoft excel, kde se data přehledně zpracují do grafu (graf. 1).

parametry	jednotky
Hranice pěna X vzduch	[mm]
Výška pěny	[mm]
Objem pěny (Potenciál)	[mm ³]
Hranice pivo X pěna	[mm]
Drainage (stékání kapaliny)	[mm ³]
Poločas rozpadu, Čas rozpadu	[s]

Tab.1: Přehled parametrů a jejich jednotek, které je možno pomocí obrazové analýzy stability pěny vyhodnotit



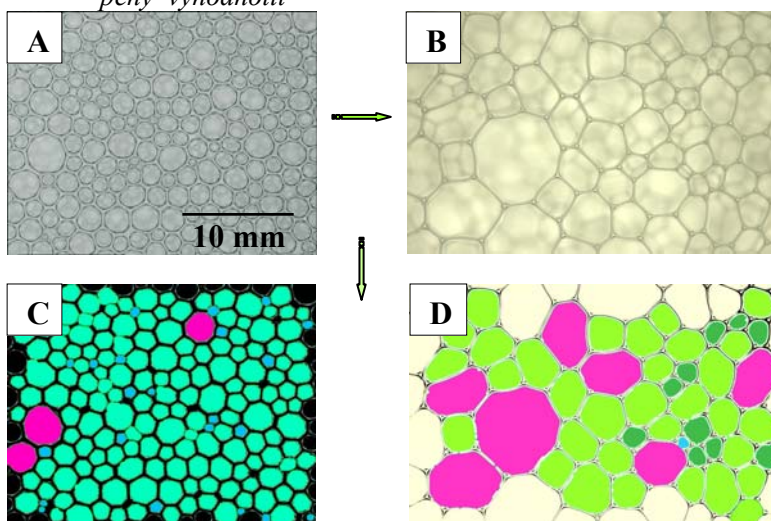
Graf 1: Pohyb rozhraní: ♦- pěna/vzduch, ▲-kapalina/pěna

Metoda určení struktury pěny obrazovou analýzou

Jedná se o dvou dimenzionální (2D) obrazovou analýzu struktury pěny. Poskytuje informaci o velikosti bublin, jejich tvaru, plošném rozdělení, a vývoji v čase (Tab.2.) Zapojení aparatury pro záznam obrazu pěny v čase je obdobné jako u předchozí metody, ale je mnohem náchylnější pro získání vyhodnotitelných obrázků. Obrázky musí být kvalitní s minimální hloubkou ostrosti. Sekvence takto získaných obrázků je nejprve graficky zpracována a poté vyhodnocena v programu Nis elements.(Obr.3.)

parametry	jednotky
Velikost bublin 2D	[mm ²]
Distribuce bublin	[histogram]
Tvarový faktor	[%]
Distribuce bublin v čase	[histogram]

Tab.2: Přehled parametrů a jejich jednotek, které je možno pomocí obrazové analýzy struktury pěny vyhodnotit



Obr.3: A a B jsou reálné fotky pěny A-pěna ihned po vytvoření. Bublínky jsou malé a kulaté kapalně filmy širší. B-pěna v čase t, bublínky jsou větší mají n-úhelníkovou strukturu a jejich velikosti jsou různé. C a D jsou grafické zpracování obrázků A a B

Závěr

Obrazová analýza je vhodná k popisu celkového charakteru pěny a může poskytnout mnoho důležitých informací. Výše uvedené metody objektivně popisují základní charakteristiky pěny, které můžeme hodnotit pouhým okem. V dnešní době využívání různých stabilizátorů pěn a látek ovlivňujících vlastnosti pěny, je obzvláště důležité mít informaci o tom, jestli jejich přítomnost negativně neovlivňuje celkový charakter pěny.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT č.21/2010 a z grantu GAČR č. 104/08/H055.

Literatura

Bamforth CW, 2004, The relative significance of physics and chemistry for beer foam excellence: Theory and practice, Journal of the Institute of Brewing, 110(4), 259-266.

Bamforth CW, 2000, Perception of beer foam, J. Inst. Brew. 106:229-238,

Evans, D. E. and Bamforth, C. W., 2008, Beer foam: Achieving a suitable head. In: Beer, a Quality Perspective, C. W. Bamforth, Ed., Elsevier: New York, Achieving a suitable head. In: Beer, a Quality Perspective

Exerowa D, Kruglyakov P.M., 1997, Foam and foam films: Theory, Experiment, Application, Antony Rowe Ltd., Eastbourne.

Haugsted, C., Pederson. MB and Erdal. K. (1990) An opto-electrical foam assay system. Monatsschrift für Brauwissenschaft. 43 (10). 336-9.

Wallin C. E., DiPietro M.B., Schwarz D.W. and Bamforth C.W., 2010, A Comparison of Three Methods for the Assessment of Foam Stability of Beer, J. Inst. Brew. 116(1), 78–80

Weaire D, Hutzler S, 1999, The physics of foams, Oxford University Press, Oxford, UK.

Wilson AJ, 1989, Foams: Physics, Chemistry and Structure, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

Vliv vybraných fyzikálně-chemických vlastností piva na stabilitu pěny

Novák P.^{1,2}, Baszczyński M.^{1,2}, Brányik T.¹, Růžicka M. C.², Drahoš J.²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Ústav chemických procesů AV ČR

Úvod

Mezi kvalitativní a kvantitativní znaky charakterizující pivo patří bohatá, hustá a dlouhotrvající pěna. Spotřebitel ji vnímá velice citlivě a je jedním z kritérií, podle kterého posuzuje kvalitu produktu a rozhoduje o nákupu dané značky piva. Kvalita pивní pěny je definována především jako její stabilita, ale také záleží na barvě, struktuře, chuti.

Pивní pěna je tvořena z bublinek CO₂, které vznikají homogenní nebo heterogenní nukleací v pivu. Ve vytvořených bublinách dochází k jevům jako odvodňování kapalného filmu mezi bublinkami, izotermnímu převodu plynu z menších bublin do větších, koalescenci bublin atd., které ovlivňují stabilitu pивní pěny. (Ronteltap, 1991)

V problematice okolo piva se vyskytuje celá řada látek, které mají pozitivní i negativní vliv na tvorbu a stabilitu pěny. Některé z nich (bílkoviny, hořké látky, atd..) vykazují povrchovou aktivitu (snižují povrchové napětí). Pro stabilitu pěny je nezbytné, aby změna povrchového napětí v závislosti na koncentraci povrchové aktivní látky byla co největší (velká rychlost difuze povrchové aktivní látky). Mezi látky pozitivně ovlivňujícími stabilitu patří některé bílkoviny z ječmene (protein Z, bílkoviny označené jako přenašeče lipidů, hordeiny). Z ostatních látek nebílkovinné povahy to jsou polysacharidy β-glukany, pentosany a gumovité látky, které zvyšují viskozitu piva a tím zpomalují odvodňování lamel mezi bublinami. Dále se na stabilizaci pěn podílejí chmelové iso-α-hořké kyseliny, díky nim má pěna intenzivní hořkou chuť (vykazují povrchovou aktivitu) a pravděpodobně společně s ionty kovů Mn²⁺, Al³⁺ a Mg²⁺ zvyšují afinitu k aminoskupinám peptidů. Tím se dále podílí na stabilizaci filmu, který odděluje jednotlivé bubliny. (Čížková, 2006; Basařová, 2010)

Tato experimentální práce se zabývá vlivem povrchového napětí na stabilitu jedné bubliny u hladiny (dobu života bubliny) a stabilitu pěny jako celku v čisté vodě a v různě koncentrovaných roztocích hovězího sérového albuminu.

Materiál a metody

Měření doby života jedné bubliny

Pro studium doby života jedné bubliny (tj. doby od prvního kontaktu bubliny s hladinou až do jejího prasknutí) v jednotlivých modelových roztocích byla použita následující aparatura (Obr. 1).

a) Čtvercová skleněná kolona o rozměrech 220 mm x 110 mm x 110 mm s kapilárou pro vznik

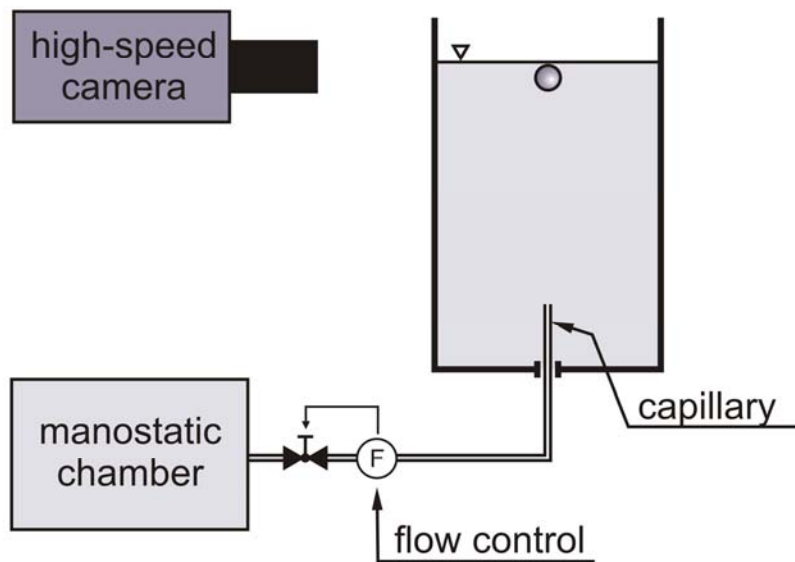
bublin (vnitřní průměr kapiláry $d=180\text{ }\mu\text{m}$)

b) Zdroj filtrovaného vzduchu s manostatem

c) Rychloběžná kamera Redlake (maximální počet snímků 64 000/sec.)

d) Zdroj monochromatického světla

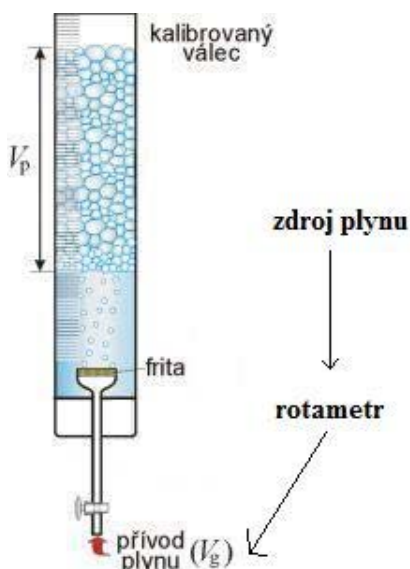
e) PC a příslušný software pro vyhodnocení



Obr.1: Aparatura pro studium doby života bubliny na hladině

Stanovení stability dynamické pěny

Metoda spočívá ve tvorbě bublinek na porézním patře kolny definovaným průtokem plynu ($Q=20\text{ l/h}$) a stanovení rovnovážné výšky sloupce pěny. Rovnovážná výška sloupce pěny se ustálí, kdy rychlost tvorby pěny je rovna rychlosti rozpadu pěny.



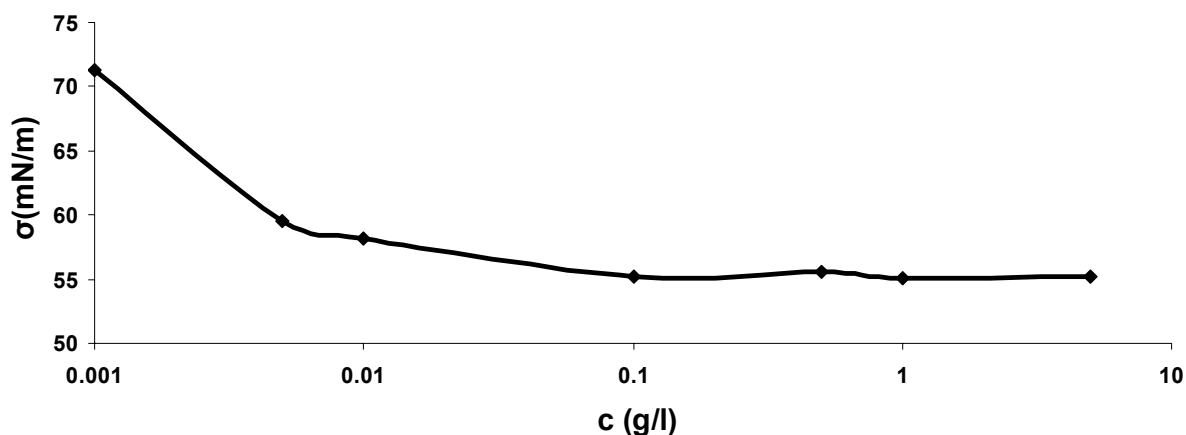
Obr.2: Aparatura na stanovení rovnovážné výšky pěny

Povrchové napětí bylo měřeno na tenziometru KRÜSS K11 pomocí kroužkové metody při 20 °C. Jako kapalná fáze byla použita destilovaná voda, jež byla deionizována a vyčištěna přes uhlíkový filtr. Pro snížení povrchového napětí jsme použili povrchově aktivní látku hovězí sérový albumin frakce V. Plynou fází byl vzduch přečištěný přes borokřemičitanový filtr zachycující nečistoty do rozměru 0.01 μm .

Výsledky a diskuze

Měření povrchového napětí

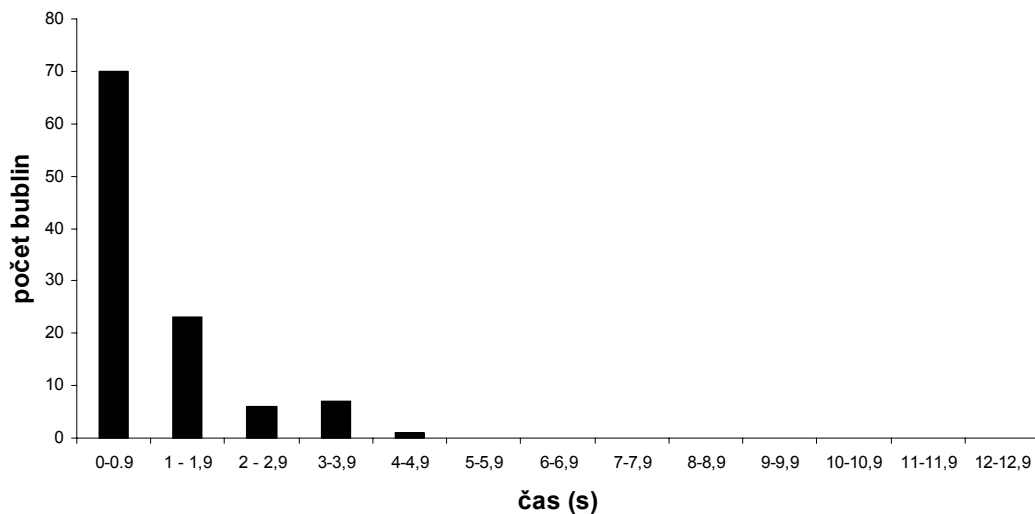
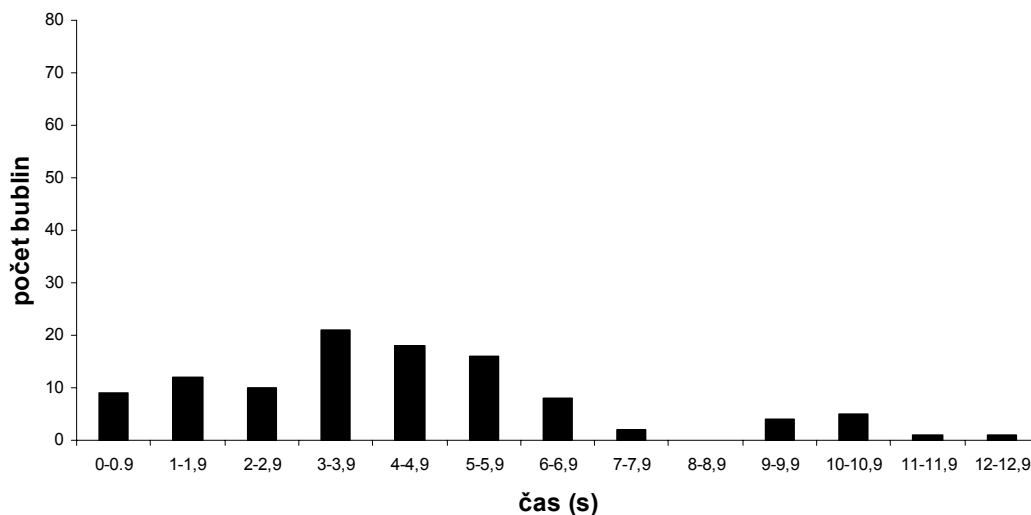
Povrchové napětí roztoků albuminu (Obr. 3) vykazuje klesající tendenci s rostoucí koncentrací bílkoviny (povrchově aktivní látka). Od koncentrace 0.01 g/L je povrchové napětí téměř konstantní ($\sigma = 58.5 \pm 0.7 \text{ mN/m}$)



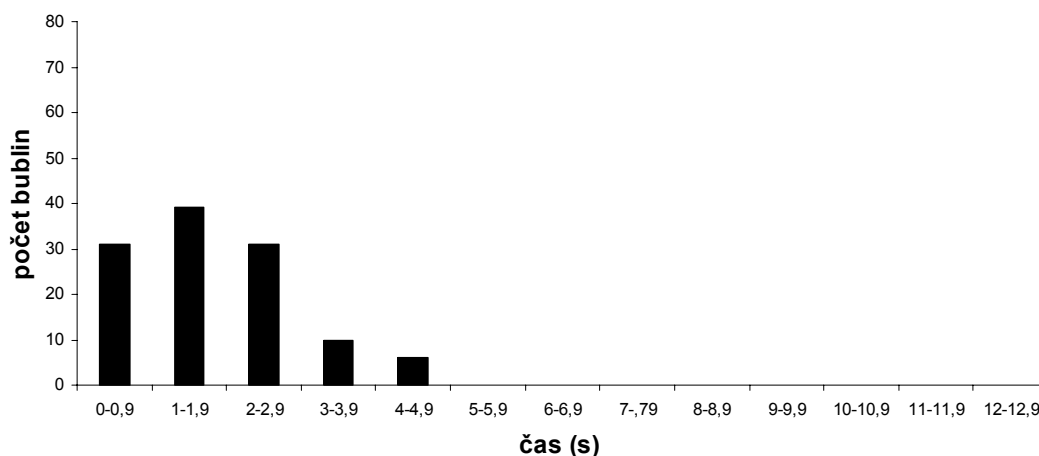
Obr. 3: Závislost povrchového napětí na koncentraci hovězího sérového albuminu.

Měření doby života bubliny na hladině

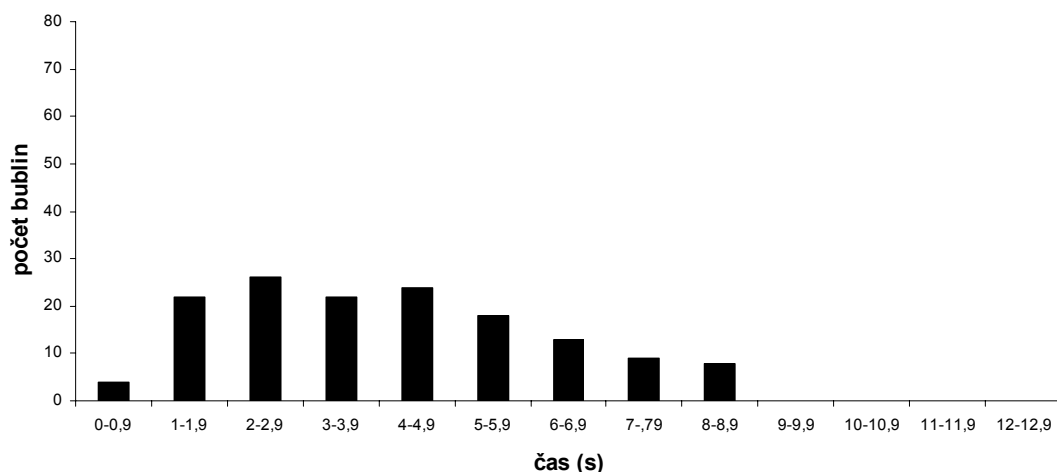
Bubliny byly tvořeny na kapiláře o definovaném průměru (pro všechny bubliny stejná doba tvorby). Vzdálenost kapiláry od hladiny byla vždy 6 cm. Bublíny u hladiny byly snímány rychloběžnou kamerou, snímky byly vyhodnoceny v programu Matlab. Doby života bubliny u hladiny v různě koncentrovaných roztocích albuminu byly rozděleny do intervalu a vyneseny do histogramů (Obr.4,5,6,7).



Obr. 5: Histogram doby života bubliny u hladiny v roztoku albuminu $c = 0.001$ g/L.

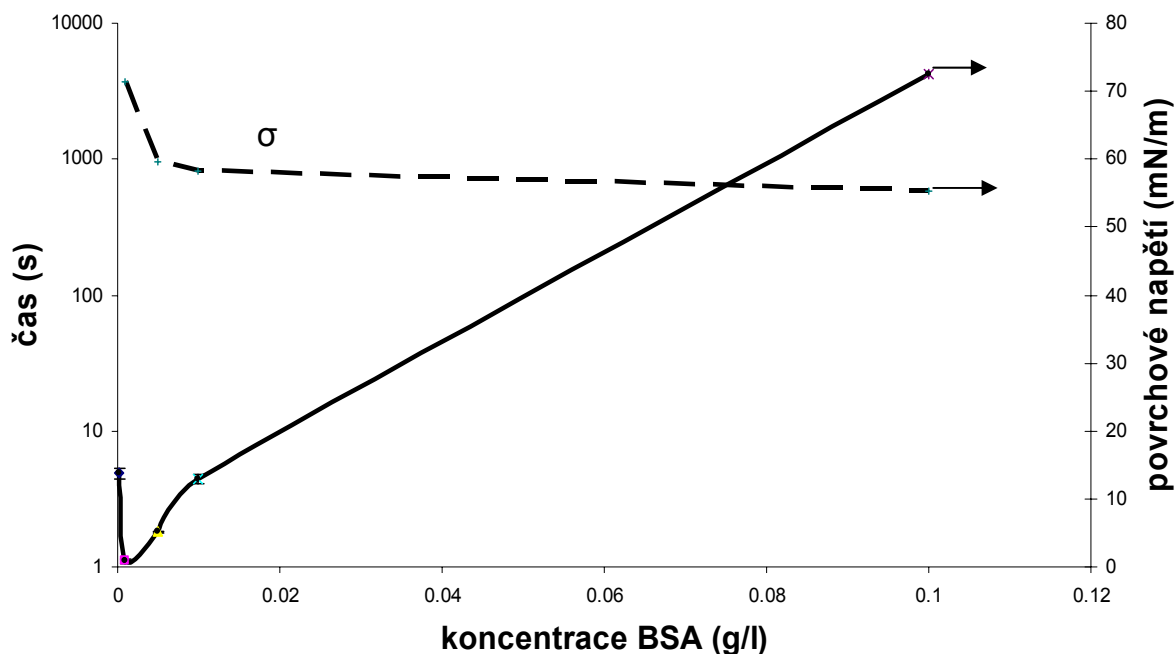


Obr.6: Histogram doby života bubliny u hladiny v roztoku albuminu $c = 0.005$ g/L.



Obr.7: Histogram doby života bubliny u hladiny v roztoku albuminu $c = 0.01$ g/L.

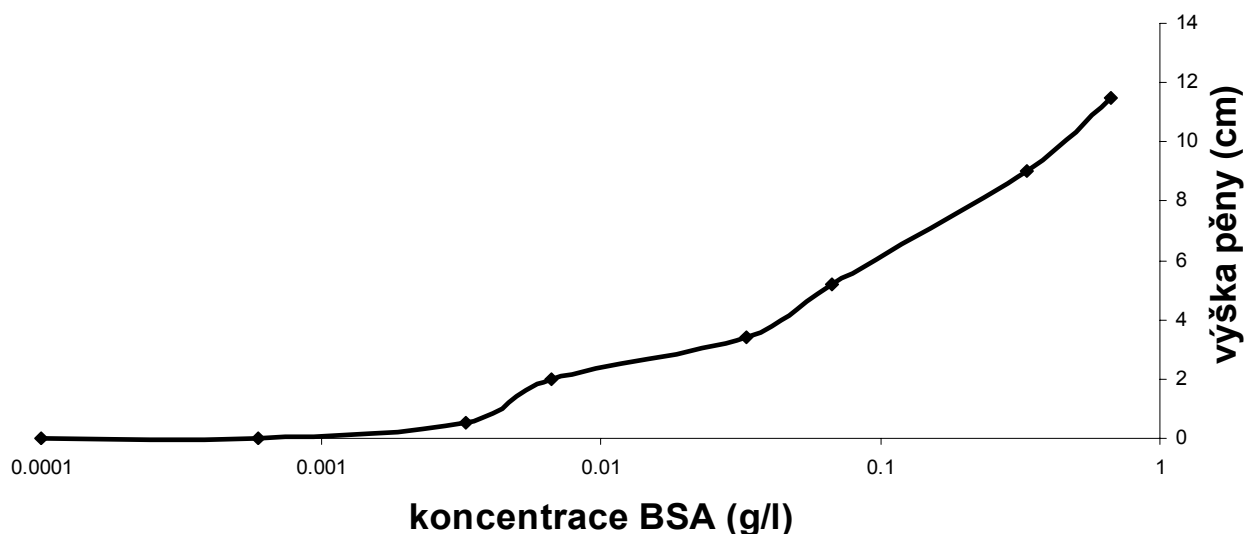
Průměrná doba života bubliny o průměru 2 mm v ultra čisté vodě u hladiny je $4.4 \text{ s} \pm 2.1 \text{ s}$ (Obr.8). Přídavek albuminu do vody ($c = 0.001 \text{ g/L}$) způsobí snížení průměrné doby života bubliny u hladiny ($1.1 \text{ s} \pm 0.3 \text{ s}$). Tento pokles průměrné životnosti je pravděpodobně způsoben nesymetrickým rozložením povrchově aktivní látky na povrchu bubliny a ve filmu oddělujícím bublinu od hladiny. (Jachimska, 1998; Krzan 2004; Malysa, 2005). Zvyšující se koncentrace albuminu prodlužuje dobu života bubliny u hladiny, při koncentraci 0.01 g/L je doba života bubliny u hladiny podobná jako v čisté vodě. Od koncentrace albuminu 0.1 g/L je životnost bubliny v řádech několika hodin. Vliv povrchového napětí na životnost bubliny se projevuje pouze v nízkých koncentracích albuminu (do 0.01 g/L).



Obr.8: Závislost průměrné doby života bubliny u hladiny na koncentraci albuminu.

Měření výšky dynamické pěny

Pro měření výšky dynamické pěny jsme použili stejné roztoky albuminu jako v předchozím případě. Rovnovážná hodnota výšky pěny byla odečtena po 1 minutě probublávání, kdy zjevně nedocházelo již ke změnám výšky pěny a kapaliny. Roztok albuminu vykazoval pěnové schopnosti od koncentrace 0.01 g/L, tj. při výrazném poklesu povrchového napětí (z 72.1 na 59.2 mN/m) což odpovídá obecně známému fakt, že klesající povrchové napětí podporuje tvorbu pěny.



Obr. 9: Závislost rovnovážné výšky pěny na koncentraci albuminu.

Závěr

Naše experimenty prokázaly, že snížení povrchového napětí vede ke zvýšené tvorbě a stabilitě pěny jako celku. Bohužel na úrovni jedné bubliny se toto zcela jasně neprokázalo. Pro koncentrace albuminu nižší než 0.01 g/L je životnost bubliny nižší než v čisté vodě (roztok vůbec nepění), při koncentraci nad 0.01 g/L je vyšší než v čisté vodě. Lze se domnívat, že tento pokles doby života bubliny je způsoben nerovnoměrným rozvrstvením bílkoviny po povrchu bubliny. V našem případě, kdy velikost bubliny je $d = 2$ mm, dráha bubliny od vzniku na kapiláře k hladině $l = 6$ cm a použité bílkovině, nastává tento jev při koncentracích bílkoviny v rozmezí 0.0001 g/L až 0.01 g/L. Pro koncentraci bílkoviny 0.1 g/L a vyšší je samotná bublina mnohem stabilnější než celková pěna. Toto lze přisuzovat vzájemným interakcím bublin v pění, které vedou ke koalescenci bublin, odvodňování filmů a následnému praskání lamel mezi nimi. Proto bude vhodnější se zaměřit na studium chování více bublin (klastřů o počtu několika desítek až stovek bublin).

Poděkování

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentury ČR (Grant č. GA104/08/H055) a Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České Republiky za účelovou podporu na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21/2010).

Literatura

Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T.: Pivovarství, Vydavatelství VŠCHT Praha, 2010, ISBN 978-80-7080-734-7

Čížková H, Dostálek P, Fiala J, Kolouchová I, 2006, Význam bílkovin z hlediska pěnivosti a stability pěny piva, *Chemické listy* 100 (2006), 478-485.

Jachimska B., Warszyński P., Malysa K.: Effect of motion on lifetime of bubbles at *n*-butanol solution surface; *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* 143 (1998) 429–440.

Krzan M. , Lunkenheimer K., Malysa K.: On the influence of the surfactant's polar group on the local and terminal velocities of bubbles; *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 250 (2004) 431–441.

Malysa K., Krasowska M., Krzan M.: Influence of surface active substances on bubble motion and collision with various interfaces; *Advances in Colloid and Interface Science* 114–115 (2005) 205– 225.

Ronteltap D.A., Hollemans M., Bispering Ch.G.J., Prins A.; Beer Foam Physics, *MBAA Technical Quarterly*, 28(1991), 25-32.

Produkce biobutanolu na modelovém glukosovém médiu

Lipovský J., Linhová M., Fribert P., Toure M., Patáková P.,
Rychtera M., Melzoch K.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Úvod

Díky biopalivům druhé generace dochází v dnešní době k obnovení zájmu o technologie produkující butanol založených na Aceton-Butanol-Etanolové (ABE) fermentaci. Oproti „klasické“ produkci etanolu kvasinkami má ABE fermentace výhodu v možnosti využití širší škály substrátů (navíc např. pentosových sacharidů, laktosy, škrobu a inulinu) bez předcházející úpravy.

Pro ekonomicky rentabilní produkci butanolu je však potřeba nalézt vhodný a dostatečně levný substrát, který by primárně nebyl potravinářskou surovinou (1), a proto je snaha o využití odpadních surovin jako je například obilná sláma, dřevní štěpka, či organické odpady z domácností. Tyto suroviny se skládají hlavně z lignocelulosy, která obsahuje tři hlavní polymery a to celulosu - nerozpustný lineární neprovázaný homopolysacharid skládající se z podjednotek glukózy propojených β -1,4 glykosidickou vazbou, hemicelulosu - polysacharidy obsahující hlavně xylany, manany, glukany a lignin - polyfenolické struktury. Problémy při utilizaci sacharidů obsažených v lignocelulosových materiálech vyplývají z jejich nepřístupnosti pro buňky. (2) U lignocelulosových materiálů je proto nutné nejprve provést hydrolytickou předúpravu (kmeny klostridií produkující rozpouštědla nejsou schopny štěpit celulosu, která je společně s hemicelulosou a ligninem hlavní složkou těchto surovin). Použití lignocelulosových surovin pro aceton-butanolové kvašení zde proto naráží na nutnost hydrolytické předúpravy (kyselé, alkalické nebo enzymové hydrolýzy, parní exploze nebo jejich kombinace). Lignocelulosové hydrolyzáty se dají s výhodou použít pro bakteriální produkci butanolu, protože butanol produkující klostridia mohou využívat kromě hexos i pentosy na rozdíl od tradiční výroby bioetanolu pomocí *Saccharomyces cerevisiae*. (1)

Hydrolyzáty lignocelulosových materiálů obsahují jako hlavní zdroj uhlíku glukosu a proto je výhodné použít glukosového modelového média (TYA) pro studium butanolové fermentace. Pro měření základních charakteristik procesu je vhodné vsádkové uspořádání, které je však omezeno produktivitou butanolu menší než $0,5 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ z důvodu zejména nízké koncentrace buněk (3). Dalšími nevýhodami použití vsádky jsou substrátová a produktová inhibice a také vysoká koncentrace zbytkového substrátu při počáteční koncentraci substrátu vyšší než 70 g.l^{-1} . Nevýhody vsádkového uspořádání částečně eliminuje přítokovaný proces (fed-batch). Tento proces je však stejně jako vsádkové

uspořádání omezen hromaděním butanolu, potažmo jeho toxicitou k produkčnímu kmenu.

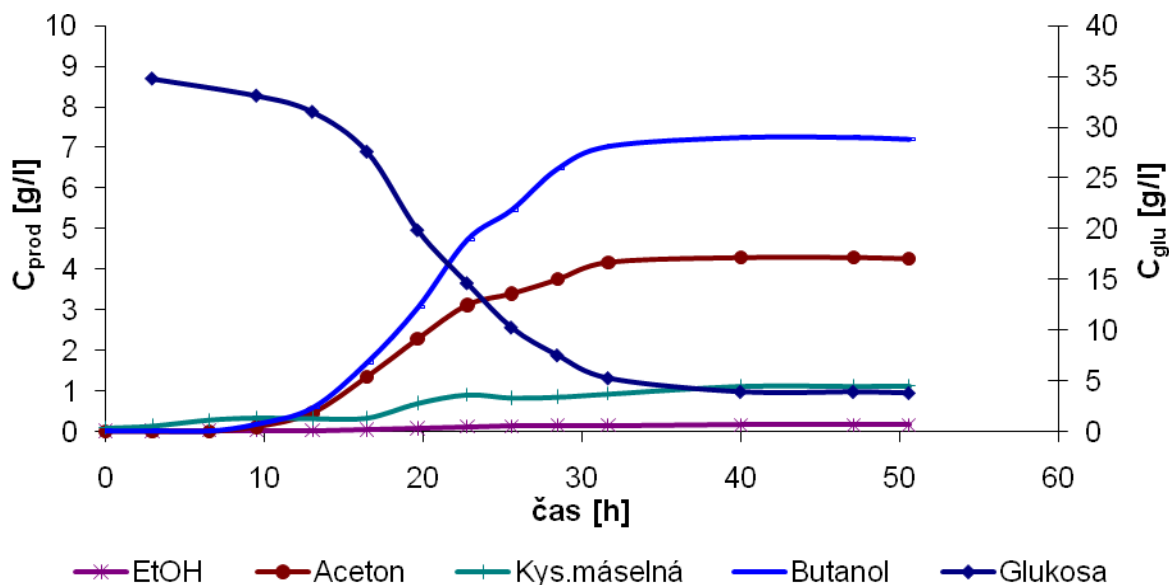
Materiál a metody

V našich experimentech bylo ke studiu butanolové fermentace použito modelového glukosového TYA média o složení glukosa 20 g/l, kvasničný autolyzát 2 g/l, trypton 6 g/l, octan amonný 3 g/l, KH_2PO_4 0,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g/l a $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/l.

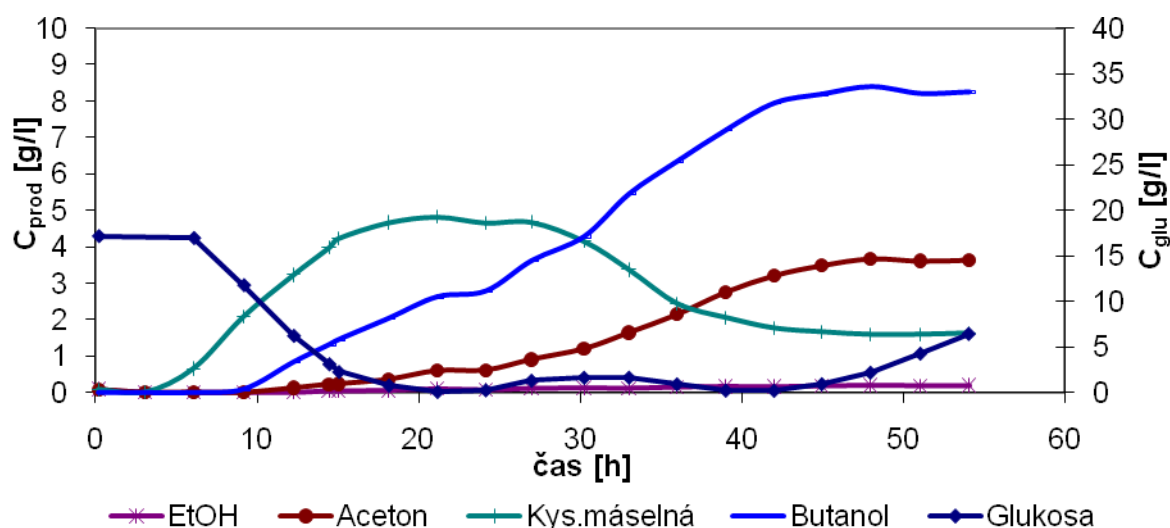
V naší laboratoři byly prováděny fermentace na modelovém TYA médiu s kmenem *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598 při teplotě 37°C. Pro inokulaci bylo použito 24 hodin staré kultury na TYA médiu s 20 g/l glukosy. Médium pro kontrolní vsádkový experiment obsahovalo 40g/l glukosy. Při experimentech s přítokovaným uspořádáním bylo použito médium s koncentrací glukosy 20 g/l. Přítokování bylo obvykle zahájeno v době kdy koncentrace glukosy ve fermentoru poklesla na 5 g/l. Koncentrace glukosy v přítoku kultivačního média jsou patrné z tabulky 1, přičemž ostatní složky přítokovaného média byly v polovičním poměru oproti základním navázkám TYA média. pH médií bylo upraveno před sterilací na hodnotu 6,8.

Analýza vzorků byla prováděna pomocí kapalinového chromatografu Agilent 1100 při použití kolony Watrex H⁺form, 60 °C, mobilní fáze - 5 mM H_2SO_4 , průtok mobilní fáze 0,5 ml/min.

Výsledky a diskuze



Obr. 1. Průběh koncentrací glukosy a produktů při kontrolní vsádkové kultivaci.



Obr. 2. Průběh koncentrací glukosy a produktů při přítokované 4. (pořadí označení v tabulce 1) kultivaci v závislosti na době kultivace.

Tabulka 1. Porovnání parametrů jednotlivých kultivací

číslo kultivace	1.	2.	3.	4.			
typ kultivace	batch	fed-batch	fed-batch	fed-batch s lineárním přítokem			
počáteční koncentrace glukosy [g/l]	40	20	20	20			
pracovní objem reaktoru [l]	3	2	2	3			
koncentrace přítoku [g/l]	-	100	150	100			
rychlost přítokování [g/h]	-	pulzně	pulzně	0 (batch)	15.15	30.3	
celkem nadávkováno glukosy [g]	-	56,6	72,0	0,0	10.9	57.7	99.0
celkem glukosy [g]	115,5	96,6	112,0	54,0	64.9	122.6	221.6
glukosy na konci [g]	10,8	11,8	17,1	9,2	18.8	0.8	38.6
spotřebovaná glukosa [g]	104,7	84,8	94,9	44,8	46.1	121.8	183.0
max. koncentrace butanolu [g/l]	7,3	8,3	8,2	1,3	2.6	7.9	8.4
max. koncentrace ABE [g/l]	11,7	12,4	11,7	1,6	3.3	11.3	12.3
výtěžnost butanolu na spotřebovanou glukosu [%]	20,9	22,8	20,2	8,6	17.2	21.2	16.7
výtěžnost ABE na spotřebovanou glukosu [%]	33,5	33,7	28,8	10,5	21.8	30.1	24.5
produktivita butanolu za celý proces [g/l/h]	0,14	0,17	0,17	0,17 (0-48 h)			
produktivita ABE za celý proces [g/l/h]	0,23	0,25	0,25	0,26 (0-48 h)			

Průběh kontrolní vsádkové kultivace je na Obr. 1., kde je patrná inhibice produktem po 32. hodině kultivace, přičemž v médiu zbylo na konci kultivace ještě okolo 5 g/l nespotřebované glukosy. Produktivita byla počítána pro 32. hodinu kultivace. Na Obr. 2. je znázorněn průběh přítokované kultivace 4., kdy bylo použito k dávkování substrátu lineárního přítoku nejprve 15,15 g/h a posléze od 22. hodiny kultivace pak 30,30 g/h. I zde je patrná produktová inhibice a koncentrace glukosy v jejím důsledku od 42. hodiny kultivace stoupá. Při srovnání výtěžností a produktivit vsádkového a přítokovaného systému (Tabulka 1) je zřejmé, že

v tomto případě přítokované uspořádání kultivačního procesu nepřináší výrazné změny kultivačních parametrů.

Závěr

Z výsledků lze potvrdit, že pro produkci rozpouštědel bakteriemi rodu *Clostridium* lze použít přítokovaného uspořádání procesu i když je zde stále omezení způsobené malou tolerancí produkčního kmenu k produkovaným rozpouštědlům. Dále můžeme usuzovat, že přítokované uspořádání mírně zvyšuje produktivitu procesu (vsádka 0,14 g/l/h; fed-batch průměrně 0,16 g/l/h). Problémem však stále zůstává inhibice produkčních kmenů hlavně vznikajícím butanolem.

K celkovému vylepšení ABE procesu by mohlo pomoci použití produkčního kmenu s vyšší tolerancí k vznikajícím produktům v kombinaci s použitím on-line separačních technik jako například separace rozpouštědel z média stripováním plynem.

Tato studie byla zpracována s finanční podporou projektů TIP č. FR-TII/218, NAZV č. QH81323/2008, FRVŠ za podpory MŠMT č. 546/2010, výzkumného záměru MŠM6046137305 a z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT č. 21/2010.

Literatura

1. **Qureshi, N. a Ezei, T., C.:** Butanol, "a superior biofuel" production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 2008, sv. 2, str. 319-330.
2. **Claassen, P., A., M., et al.:** Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, sv. 52, str. 741-755.
3. **Ezeji, T., C.; Qureshi, N. a Blaschek, H., P.:** Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology.* 2007, sv. 18, str. 220-227.

Využití stripování plynem jako separačního mezikroku při produkci biobutanolu

Fribert P., Jahodová L., Lipovský J., Linhová M., Patáková P., Rychtera M., Melzoch K.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Úvod

Fermentační produkce butanolu bakteriemi rodu *Clostridium*, tvořeného společně s ethanolem a acetonem, byla počátkem 20. století jednou z nejrozšířenějších biotechnologických výrob. Vzhledem k vysokým nákladům nebyla fermentační výroba butanolu schopna konkurovat výrobě z fosilních zdrojů. Dnes se její význam vrací, neboť se o butanolu uvažuje jako o možném alternativním palivu. Butanol může být produkován kvasnou cestou z obnovitelných zdrojů, to vede ke snížení emisí skleníkových plynů a omezení závislosti na ropě (Zheng a kol. 2009). Mikrobní produkce biobutanolu z odpadních sacharidických substrátů je jednou z možností výroby tzv. biopaliv druhé generace. Butanol je možné mísit se standardním benzínem podobně jako ethanol, který se dnes běžně do paliva přidává, avšak z hlediska palivářských vlastností představuje biobutanol vhodnější alternativu než bioethanol, neboť je méně korozivní, má nižší tlak par, neabsorbuje vodu a energetický obsah molekuly butanolu je vyšší než energetický obsah molekuly ethanolu, což snižuje spotřebu pohonných hmot (Dürre 2008).

Tradiční metodou separace organických rozpouštědel produkovaných při aceton-butanol-ethanolové (ABE) fermentaci bakteriemi rodu *Clostridium* je destilace. Tato metoda je energeticky a finančně náročná, neboť butanol má vyšší bod varu než voda a koncentrace všech zmíněných rozpouštědel v kultivačním médiu je nízká. Ve snaze snížit energetické nároky produkce butanolu jsou vyvíjeny alternativní způsoby separace produktů ABE fermentace. Mezi preferované metody separace patří stripování plynem, extrakce, adsorpce a membránové metody, jako pervaporace, pertrakce a reverzní osmóza.

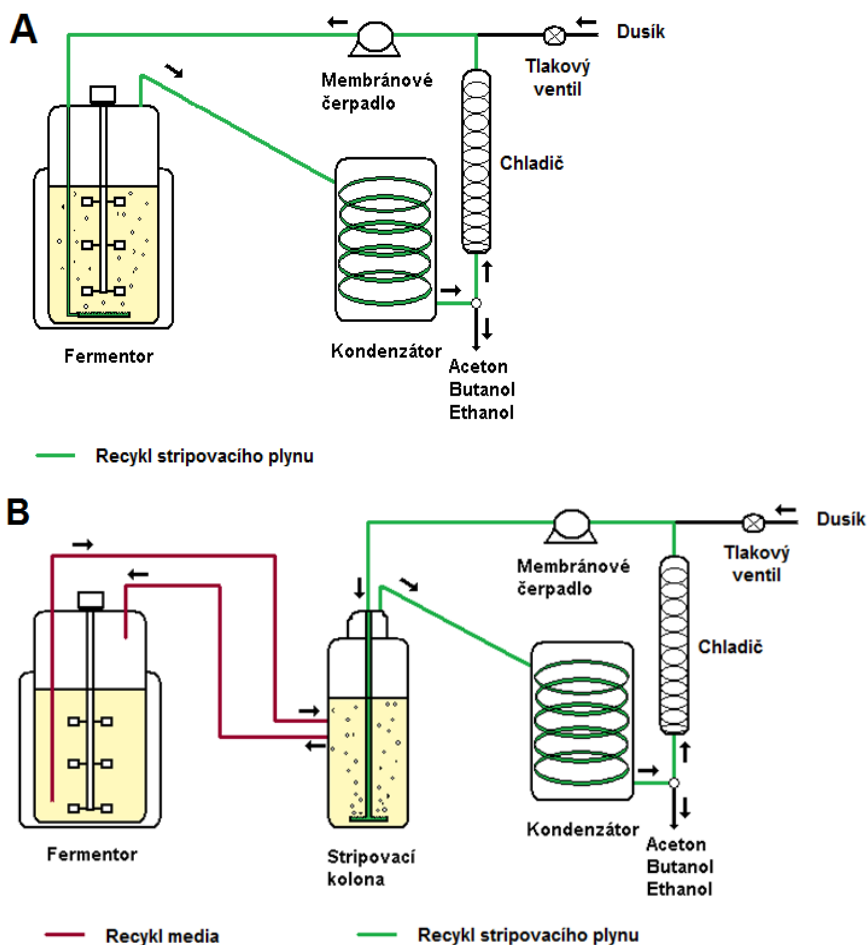
Stripování plynem

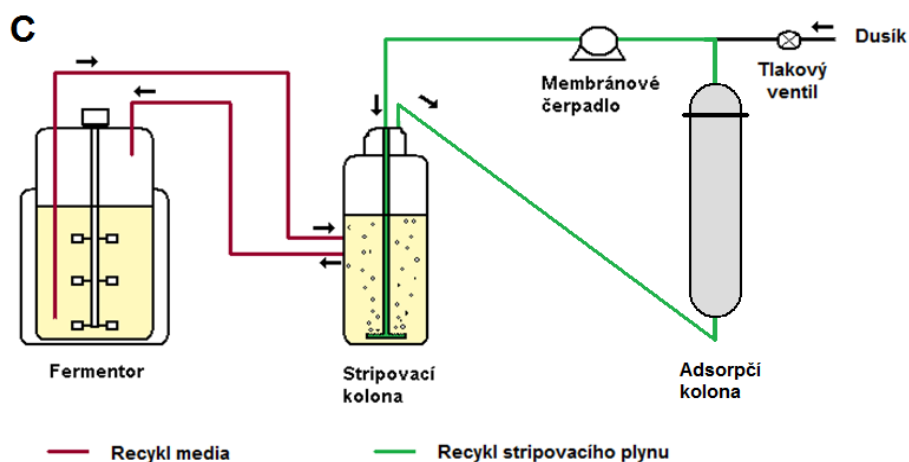
Metoda stripování plynem patří společně s pervaporací k preferovaným technikám izolace butanolu *in situ*. Z důvodu výhodného poměru cena/výkon v průmyslovém měřítku se jeví jako nejslibnější právě stripování plynem. (Ezeji a kol. 2005)

Stripování plynem je jednoduchou a zároveň účinnou cestou separace butanolu z kultivačního média. Je to metoda, která umožňuje selektivní separaci těkavých látek z média v průběhu kultivace bez nutnosti použití membrány nebo drahých chemikálií. (Ezeji a kol. 2005)

Při této metodě je fermentační plyn probubláván skrz kultivační médium. Do plynu jsou strhávány těkavé látky, které jsou v médiu obsažené. Tento plyn je následně veden do kondenzátoru, ve kterém dochází k separaci rozpouštědel. Stripovací plyn je poté recyklován a veden zpět do reaktoru a proces pokračuje až do vyčerpání zdroje uhlíku a energie. (Lee a kol. 2008) Parametrem ovlivňujícím sdílení hmoty je velikost bublin, kdy k lepšímu sdílení

dochází, pokud jsou bubliny malé. Naopak velké bubliny zvyšují recirkulaci a míchání v reaktoru. Mezi další parametry ovlivňující proces izolace patří rychlost recyklu plynu a přítomnost acetonu a ethanolu. (Qureshi & Blaschek 2001, Ezeji a kol. 2005) K separaci rozpouštědel ze stripovacího plynu lze také použít adsorpce butanolu na vhodný adsorbent, například aktivní uhlí nebo vhodné typy zeolitů, viz. Obr. 1C. Ke stripování plynem lze použít dva odlišné typy uspořádání stripovací aparatury. U prvního typu uspořádání je stripovací plyn distribuován přímo do nádoby bioreaktoru, ve kterém probíhá ABE fermentace. U druhého typu uspořádání probíhá stripování v samostatné stripovací koloně, stripované médium cirkuluje mezi bioreaktorem a stripovací kolonou. Schémata zapojení stripovacích aparatur jsou zobrazeny na Obr. 1

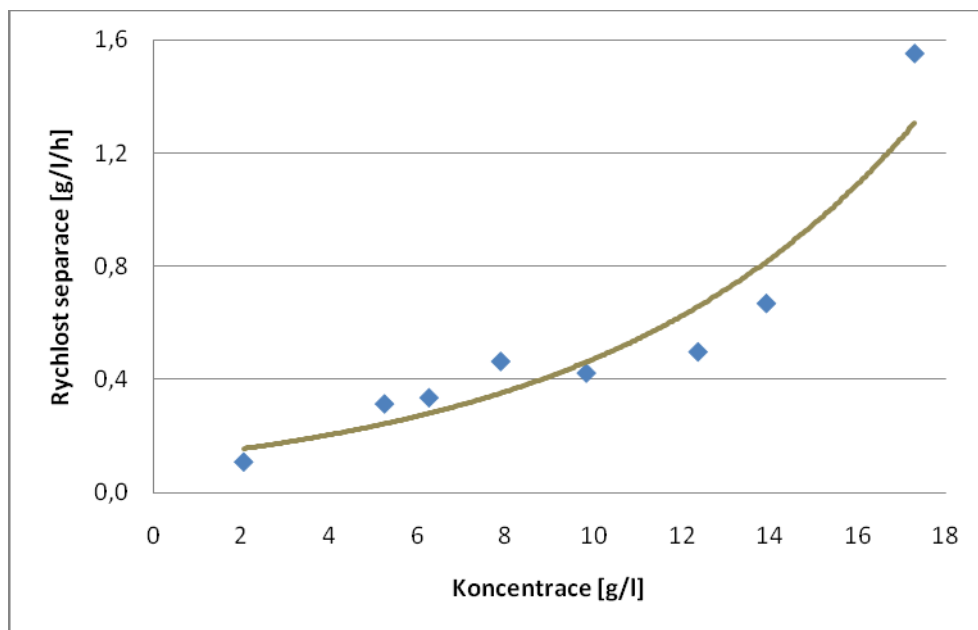




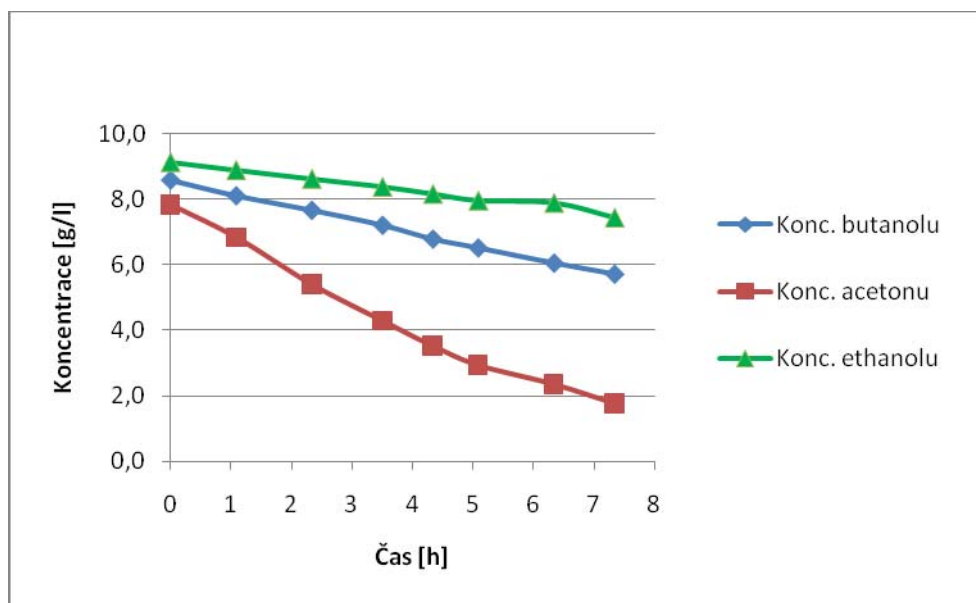
Obr. 1: Schéma laboratorní stripovací aparatury: **A** stripování přímo v bioreaktoru, **B** stripování ve stripovací koloně s recirkulací média, **C** stripování s adsorpční koncovkou a recirkulací média.

Rychlost separace 1-butanolu je závislá na koncentraci 1-butanolu v médiu, závislost poklesu rychlosti stripování na koncentraci butanolu ve stripovaném médiu je znázorněna na Obr. 2. (Ezeji a kol. 2004)

Z rychlostí stripování acetonu, butanolu a ethanolu vyplývá, že rychlost stripování klesá od acetonu přes butanol a ethanol se stripuje nejpomaleji. Tento trend je patrný z Obr.3.



Obr. 2: Závislost rychlosti separace butanolu na jeho koncentraci ve stripovaném médiu.



Obr. 3: Průběh poklesu koncentrace ABE během stripování.

Stripování plynem bylo použito pro separaci butanolu z fermentačního média v průběhu vsádkové fermentace *C. beijerinckii* BA 101. V těchto podmínkách došlo k úspěšnému zkvašení cukerného roztoku o koncentraci 161,7 g/l a produkci rozpouštědel v koncentraci 75,9 g/l. (Ezeji a kol. 2004)

Tato metoda byla dále použita ve spojení s přítokovanou kultivací. Při tomto procesu došlo k redukci inhibice produktem a zvýšení koncentrace biomasy v reaktoru. V tomto systému bylo zkvašeno 500 g glukosy a vyprodukováno 233 g rozpouštědel s rychlostí produkce 1,16 g/l/h a výtěžkem rozpouštědel 0,47 g/g glukosy. (Ezeji a kol. 2004)

V případě spojení kontinuální kultivace s touto metodou separace produktů bylo vyprodukováno 460 g rozpouštědel z 1163 g glukosy s rychlostí produkce 0,91 g/l/h. (Ezeji a kol. 2004)

Závěr

Tato metoda umožňuje použití koncentrovaných roztoků sacharidů ve fermentoru, redukci vlivů inhibice produktem a vysokou utilizaci sacharidů produkčním organismem. (Lee a kol. 2008) V některých systémech integrovaných se stripováním bylo dosaženo téměř 100% utilizace sacharidů přítomných v médiu. (Ezeji a kol. 2005)

Poděkování

Tato práce byla zpracována s finanční podporou projektů TIP č. FR-TII/218, NAZV č. QH81323/2008, FRVŠ za podpory MŠMT č. 546/2010, výzkumného záměru MŠM6046137305 a z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT č. 21/2010.

Literatura

DÜRRE, P. Fermentative Butanol Production Bulk Chemical and Biofuel. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2008**, 1125, 353-362.

EZEJI, C.E.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H.P. Butanol fermentation research: Upstream and downstream manipulations. *The Chemical Record*, **2004**, 4 (5), 305-314.

EZEJI, T.C.; KARCHER, P.M.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H.P. Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from *Clostridium beijerinckii* fermentation. *Bioprocess and biosystems engineering*, **2005**, 27 (3), 207-214.

LEE, S.Y.; PARK, H.J.; JANG, S.H.; NIELSEN, L.K.; KIM, J.; JUNG, K.S. Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, **2008**, 101 (2), 209-228.

QURESHI, N.; BLASCHEK, H.P. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping. *Renewable energy*, **2001**, 22, 557-564.

ZHENG, Y.N.; LI, L.Z.; XIAN, M.; MA, Y.J.; YANG, J.M.; XU, X.; HE, D.Z. Problems with the microbial production of butanol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2009**, 36 (9), 1127-1138.

Izolace butan-1-olu z fermentačních médií

Jahodová L., Fribert P., Melzoch K.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Aceton-butanol-etanolová fermentace využívající anaerobní bakterie rodu *Clostridium* nepřestává budít pozornost jako potenciální zdroj výchozích chemikálií a kapalných biopaliv. K separaci butanolu z fermentačního média byly zkoumány metody destilace, adsorpce a stripování. Stripování je jednou z metod, která může být použita k separaci butanolu. Tato metoda je jednoduchá a nevyžaduje drahé zařízení. Plyn je probubláván fermentorem a těkavý butanol kondenzuje v kondenzátoru nebo je zachycen v adsorpční koloně. Koncentrace butanolu v proudu je vyšší než ve fermentační půdě. K separaci rozpouštědel z modelových směsí a reálných médií po fermentaci byly používány metody stripování plynem a destilace. Cílem práce bylo vyvinout optimální metodu stripování, které by mohlo být použito v integraci s ABE fermentací.

Využití řepy cukrovky pro výrobu rozpouštědel

Toure M., Patáková P., Lipovský J., Linhová M., Fribert P., Rychtera M., Melzoch K.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Biopaliva jsou v současnosti považována za energetickou alternativu k tradičním fosilním palivům. Jejich produkce a problematika jsou předmětem výzkumných prací v laboratořích. Současně výroba rozpouštědel, zejména 1-butanolu, biotechnologickými procesy nevyhnutelně zahrnuje dvě základní podmínky: nalezení vhodné suroviny jako zdroje uhlíku a bakterie schopné produkovat rozpouštědla, hlavně 1-butanol. Některé nedávné publikace ukazují, že butanol má podobné vlastnosti jako benzin, proto je o tento výzkum zájem v praxi.

Náš projekt je obecně zaměřen na vývoj vhodných technologií pro průmyslovou výrobu 1-butanolu, které mohou přispět k využití obnovitelných zdrojů energie, zejména melasy a řepné šťávy na biopaliva.

Cílem této studie je určit optimální koncentraci sacharosy v kultivačním médiu vhodnou pro výrobu rozpouštědel, získat vhodný bakteriální kmen schopný produkovat butanol ze sacharosy a vyhodnotit bilanci přeměny sacharosy na organické kyseliny a rozpouštědla (aceton, butanol a ethanol) a kinetické parametry bioproduktu.

V rámci práce bylo testováno 5 různých kmenů bakterií v kultivačním médiu obsahujícím řepnou melasu. Pokusy byly provedeny v anaerobní komoře za anaerobních podmínek při teplotě 37 °C. Po 144 hodinách kultivace byly vzorky analyzovány pomocí HPLC.

Výsledky této práce ukazují, že melasové kultivační médium, obsahující 4 % sacharosy, je optimální pro produkci butanolu. Dále z 5 testovaných bakteriálních kmenů, se *Clostridium beijerinckii* CCM 6218, jeví jako nejlepší produkční kmen. Při jeho použití bylo dosaženo koncentrace butanolu 9,87 g/l a celkové výtěžnosti rozpouštědel 28%. Další experimenty budou prováděny v bioreaktoru spojeném se stripovací jednotkou, která umožní separaci vytvořených rozpouštědel z kultivačního média a tím i snížení jejich inhibičního vlivu na buňky.

Vliv kvality sladu na filtrovatelnost piva

Kovačková M.¹, Veselý P.², Fiala J.¹

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Plzeňský Prazdroj, a.s.

Podstatou práce bylo sledovat vliv β -glukanů, bílkovinných frakcí a polyfenolů na průběh membránové mikrofiltrace piva. Experiment byl prováděn u plně automatizované membránové filtrace v provozním měřítku. Sledoval se obsah uvedených látek v pivu před filtrací a po filtraci. K jedinému prokazatelnému zachycení na membráně docházelo u tanoidů, ale jejich koncentrace filtrovatelnost neovlivňovala. Součástí práce bylo monitorovat celý proces, od sladu až po výrobu piva, resp. filtraci piva. Pro experiment byly vybrány slady Malz, ročník 2008 a 2009, Bojos, ročník 2008 a 2009. U sladů se stanovovaly jakostní parametry, které byly porovnávány z pohledu kvality s důrazem na stanovení β -glukanů jako faktoru ovlivňující filtrovatelnost. Nebyl pozorován přímý vztah obsahu β -glukanů ve sladu s filtrovatelností piva. β -glukany byly měřeny a porovnávány dvěmi metodami, Skalar a Megazyme. U vzorků sladu byla dobrá korelace metod, u mladiny a piva byla korelace špatná.

Metabolická aktivita mikroorganismů degradujících fenol

Polová M., Pospíšilová D., Masák J., Čejková A.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Úvod

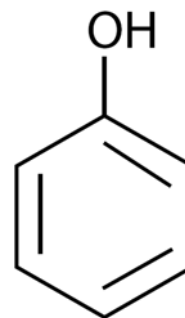
S lidskou činností je spojena produkce široké škály různorodých chemických látek. Tyto látky jsou zpravidla člověku velmi užitečné, mohou být ale zároveň nebezpečné. Pro člověka samotného i pro jeho okolí.

Mezi takové látky patří i fenol, který je produkován jako přirozený metabolit některých rostlin a živočichů, ve větší míře pak jako meziprodukt mnohých průmyslových výroby a procesů.

Vzhledem k nízké odbouratelnosti fenolu dochází k jeho akumulaci v životním prostředí a je nutné hledat cesty, jak tuto látku odstranit.

Fenol a životní prostředí

Fenol (strukturní vzorec viz obr. 1), neboli hydroxybenzen, je bezbarvá až bílá krystalická látka s dráždivým nasládlým zápachem připomínajícím dehet¹. Jeho rozpustnost ve vodě je 84 g.l⁻¹ při 20°C, dále je rozpustný v některých organických rozpouštědlech, jako například benzen, chloroform, aceton, ethanol, aj.²



Obr. 1: Struktura fenolu

Do životního prostředí se fenol dostává jako přirozený produkt některých živočichů a rostlin (fenol je např. součástí ligninu², Δ^9 tetrahydrocannabinolu, nebo thymolu³). Z hlediska znečištění jsou však významnějším zdrojem fenolu odpady některých průmyslových výroby, ve kterých se fenol vyskytuje jako meziprodukt (například výroba syntetických vláken, pryskyřic, polymerních materiálů, farmaceutik, pesticidů, apod.).

Fenol je látka silně toxická, především pro vodní organismy, ale také pro savce a člověka. Fenol je protoplasmatický jed, který poškozuje všechny typy buněk. Vstupními branami do lidského organismu jsou dýchací cesty, kůže, trávicí trakt (platí pro něj věty R23/24/25: toxický při inhalaci, kontaktu s pokožkou a při požití)¹. Akutní otrava se projevuje drážděním dýchacích cest, očí, sliznic, nevolností. Při dlouhodobější expozici může docházet k poškození centrální nervové soustavy a některých důležitých orgánů (slezina, slinivka, játra a ledviny⁴).

Pro fenol jsou uváděny následující hodnoty LD₅₀: při orálním podání krysy 340 mg.kg⁻¹, myši 300 mg.kg⁻¹, králíci méně než 620 mg.kg⁻¹. Při expozici kůží se u krysy uvádí LD₅₀ 660-707 mg.kg⁻¹ (1).

Biodegradace fenolu

V důsledku malé těkavosti a špatné odbouratelnosti dochází k akumulaci fenolu v půdě², což je vzhledem k jeho vysoké toxicitě silně nežádoucí. Jednou z možných cest odstranění fenolu z prostředí je využití technik bioremediace. Bioremediace je obecně proces, který využívá biologický systém (např. mikroorganismus) k rozkladu nebo transformaci nežádoucích látek.

Hlavní výhodou tohoto procesu je flexibilita biologického systému, možnost aplikace procesu *in situ* a nižší cena ve srovnání s klasickými chemickými metodami.

Efektivita degradace závisí na mnoha faktorech, jako jsou koncentrace dané látky, její struktura a dostupnost (volná x vázaná), charakter biologického činitele, jeho enzymovém vybavení a v neposlední řadě i na vnějších podmínkách procesu (teplota, pH, vlhkost, koncentrace rozpuštěného kyslíku, nutrientů, přítomnost snáze utilizovatelných zdrojů aj.).

Mikroorganismy degradující fenol

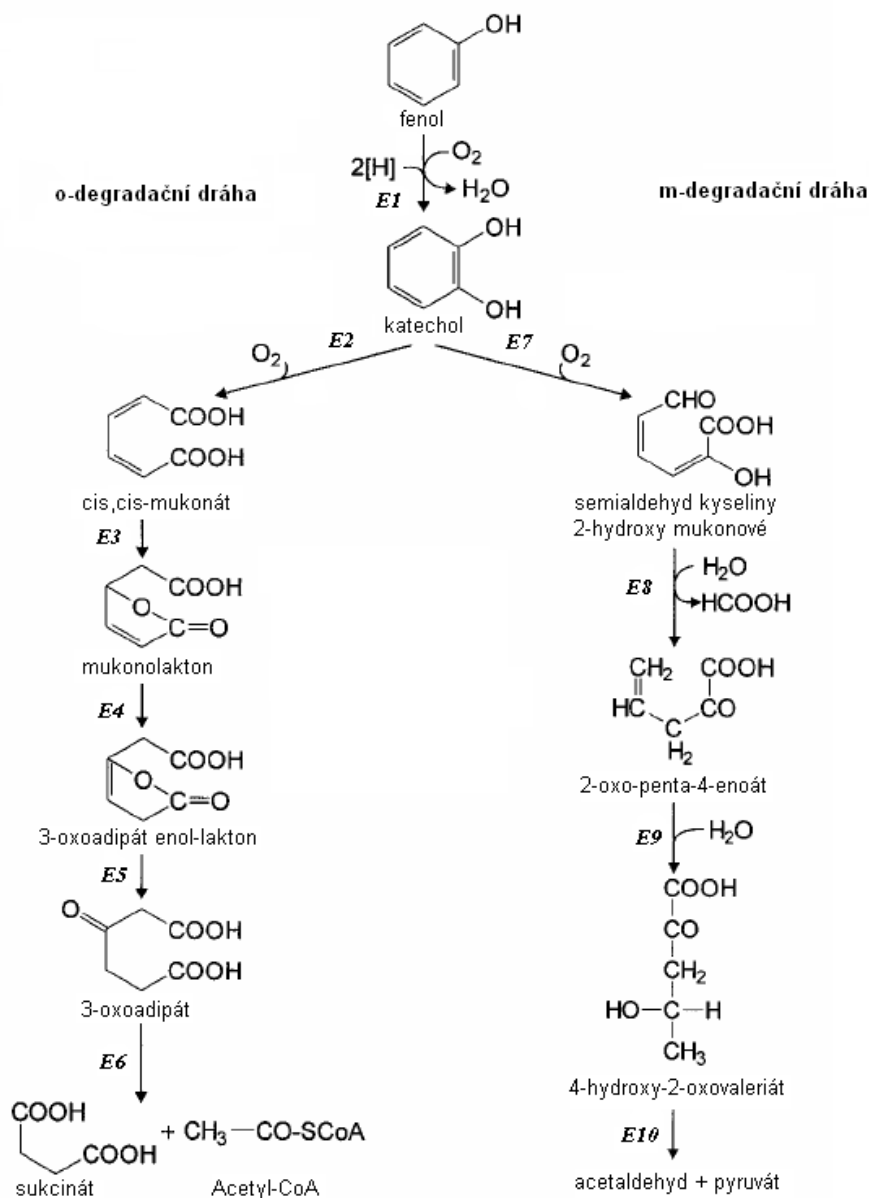
Schopností degradovat fenol disponuje celá řada mikroorganismů, jak prokaryotních, tak i eukaryotních. Tato schopnost je obvykle dána jejich enzymovým vybavením a dlouhodobou adaptací mikroorganismů žijících v prostředí s trvalým znečištěním fenolem.

Z bakterií jsou degradace fenolu schopni například zástupci rodů *Pseudomonas*. Tyto bakterie jsou kromě fenolu schopny degradovat i mnohé jiné toxické organické polutanty⁵. Zajímavým zástupcem rodu *Bacillus* je termofilní bakterie *Bacillus thermoleovorans*, jejíž optimální růstová teplota je 65°C. Při této teplotě je rychlost degradace fenolu až čtyřikrát vyšší, než u mezofilních mikroorganismů, jako je například *Pseudomonas putida*⁶. Dále byla schopnost degradovat fenol pozorována u zástupců rodů *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus* aj.^{5,7}. Z technologického hlediska zajímaví jsou psychrotolerantní zástupci rodu *Rhodococcus*, kteří degradují fenol i při nízké teplotě (až okolo 1°C)⁽⁸⁾.

Mezi mikroorganismy schopné degradovat fenol se řadí i některé druhy kvasinek. Jejich využití je však ve srovnání s bakteriemi omezené, protože pro svůj růst vyžadují zpravidla komplexnější média a jsou celkově náročnější na růstové podmínky. Mezi dobré degradéry fenolu patří například zástupci rodů *Trichosporon*^{9,10}, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*¹⁰, *Candida*⁵ *Saccharomyces*¹¹ aj.

Některé vláknité houby mohou také hrát důležitou roli v degradaci fenolu a dalších aromatických sloučenin v biosféře. Mezi významné degradéry fenolu patří plísně *Fusarium flocciferrum* a *Aspergillus fumigatus*¹⁰. Kromě plísní rodu *Fusarium* a *Aspergillus* jsou degradace fenolu schopny také zástupci rodů *Penicilium* a *Graphium*¹⁰.

Enzymy v degradační dráze fenolu



Obr. 2: Degradační dráha fenolu

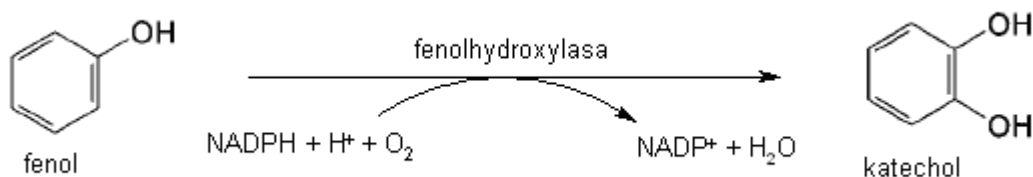
Za aerobních podmínek je prvním krokem degradace fenolu oxidace na katechol (viz obr. 2), při které dochází k připojení hydroxylové skupiny na aromatický kruh do polohy *ortho* vůči původnímu hydroxylu. Tato reakce je katalyzována enzymem fenolhydroxylasa a je společná pro všechny typy mikroorganismů degradujících fenol. V dalším kroku je pak aromatický kruh katecholu štěpen v závislosti na mikroorganismu buď v poloze *ortho* (*o*-degradační dráha), nebo *meta* (*m*-degradační dráha)¹².

Degradace fenolu *m*-degradační drahou byla popsána např. u bakterií rodu *Pseudomonas*, *o*-degradační dráha byla popsána u rodů *Trichosporon*, *Acineobacter*, *Rhodococcus*, aj.¹². Některé mikroorganismy jsou schopny využívat obě zmíněné degradační dráhy, například bakterie *Pseudomonas putida*¹¹.

Degradace fenolu zpravidla probíhá jednou z výše uvedených cest až na běžné meziproducty centrálního metabolismu, které jsou dále zpracovávány v citrátovém cyklu.

Fenolhydroxylasa a katecholdioxygenasa

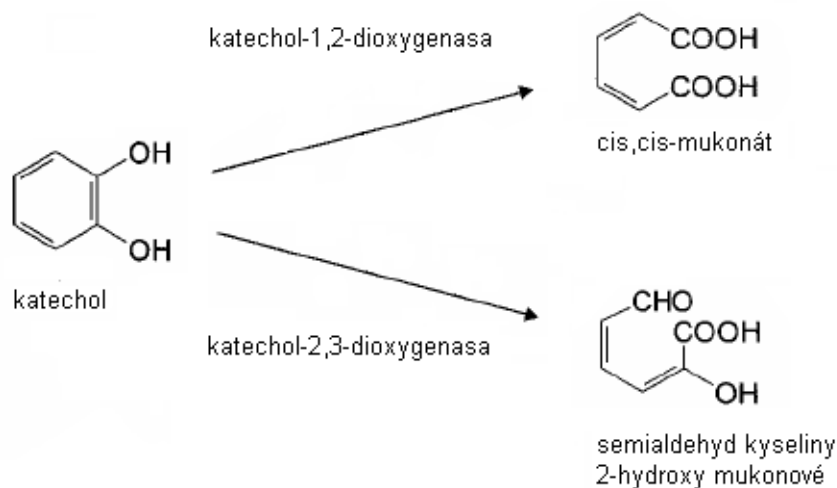
Fenolhydroxylasa (EC 1.14.13.7) katalyzuje klíčovou přeměnu fenolu na katechol (viz obr. 3)¹³. Fenolhydroxylasa se zpravidla vyznačuje širokou substrátovou specifikou, kromě fenolu je tento enzym schopen katalyzovat přeměnu také mnohých derivátů fenolu na příslušné *o*-diol deriváty^{9,14}. Fenolhydroxylasa patří mezi NADPH dependentní flavinové monooxygenasy¹⁴. Tento enzym je ve většině případů induktivního charakteru, jeho syntéza může být reprimována například přítomností snáze utilizovatelných zdrojů uhlíku a energie¹⁵. Fenolhydroxylasa je zpravidla podjednotkový enzym, počet a uspořádání jednotek je závislý na typu mikroorganismu.



Obr. 3: Oxidace fenolu na katechol katalyzovaná fenolhydroxylasou

Katecholdioxygenasa se vyskytuje ve dvou formách (viz obr. 4). Katechol-1,2-dioxygenasa (EC 1.13.11.1) katalyzuje *ortho*-štěpení aromatického kruhu, katechol-2,3-dioxygenasa (EC1.13.11.2) katalyzuje *meta*-štěpení aromatického kruhu¹³.

Oba tyto enzymy jsou podjednotkové dioxygenasy a využívají jako kofaktor trojmocné železo¹⁶. Všechny známé katecholdioxygenasy jsou podjednotkové induktivní enzymy, jejichž struktura je závislá na typu mikroorganismu. Substrátová specifita se značně liší pro jednotlivé mikroorganismy¹⁶.



Obr. 4: Dvě cesty štěpení aromatického kruhu katecholu katalyzované katecholdioxygenasou.

Závěr

Bližší poznání struktury, stability, substrátové specifity a dalších vlastností jednotlivých enzymů vede k usnadnění regulace degradačních procesů. Umožňuje zajištění optimálních podmínek v průběhu těchto procesů a tím maximalizaci účinnosti degradace.

Získané poznatky lze uplatnit i v odvětvích, která využívají enzymy nezávisle na mikroorganismu, například v imobilizovaných systémech. Výhodou těchto systémů je možnost jejich použití i v podmínkách, které jsou pro mikroorganismus neslučitelné se životem.

Literatura

- 1 Phenol - Summary risk assessment report (2006), Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau
- 2 Integrovaný registr znečišťování. Ministerstvo životního prostředí ČR, Dostupné na URL: <<http://www.irz.cz/latky/fenoly>> [cit. 25.1.2009].
- 3 CAREY, F.A., Organic chemistry. Boston: Mc Graw Hill, 1996. 3rd edition. 977 – 1010.
- 4 MANAHAN, S.E.: Toxicological Chemistry and Biochemistry. Lewis Publisher, 2003. 3rd edition. 297 - 298.
- 5 REARDON, K.F., MOSTELLER, D.C., BULL ROGERS, J.D.: Biodegradation Kinetics of Benzene, Toluene, and Phenol as Single and Mixed Substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotech. Bioeng.*, 2000. **69**: 385-400.
- 6 FEITKENHAUER, H., SCHNICKE, S., MÜLLER, R., MÄRKL, H.: Determination of the kinetic parameters of the phenol-degrading thermophile *Bacillus thermoleovorans* sp. A2. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 2001. **57**: 744-750.
- 7 NAIR, C.I., JAYACHANDRAN, K., SHASHIDHAR, S.: Biodegradation of phenol. *Afr.J.Biotech.*, 2008. **7**: 4951-4958.
- 8 MARGESIN, R., FONTEYNE, P.A., REDL, B.: Low-temperature biodegradation of phenol by *Rhodococcus* spp. and basidiomycetous yeasts. *Research in microbiology*, 2005. **156**: 68-75.
- 9 NEUJAHR, H.Y., GAAL, A: Phenol hydroxylase from yeast. Purification and properties of the enzyme from *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J.Biochem.*, 1973. **35**: 386-400.
- 10 SANTOS, V.L, LINARDI, V.R: Phenol degradation by yeasts from industrial effluents. *J.Gen.Appl.Microbiol.*, 2001. **47**: 213-221.
- 11 NEUJAHR, H.I, VARGA, J.M.: Degradation of Phenols by Intact cells and Cell-Free Preparations of *Trichosporon cutaneum*. *Eur.J.Biochem.*, 1970. **13**: 37-44.
- 12 AGARRY, S.E., DUROJAIYE, A.O.: Microbial degradation of phenols: a review. *Int. J. Environment and Pollution*, 2008. **32**: 12-28.
- 13 SCHOMBURG, D., STEPHAN, D.: Oxidoreductases. Chapter 1.14.13.7 Phenol 2-monooxygenase. *Enzyme Handbook 8*. Springer-Verlag, Berlin.1994.
- 14 NEUJAHR, H.Y., KJELLEN, K.G.: Phenol hydroxylase from yeast. Reaction with phenol derivatives. *J.Biol. Chem.*, 1978. **24**: 8835-41.
- 15 AMPE, F, LÉONARD, D., LINDLEY, N.D.: Repression of phenol catabolism by organic acids in *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998. **64**. 1-6.
- 16 BRIGANTI, F., PESSIONE, E., GIUNTA, C., SCOZZAFAVA, A.: Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. *FEBS Letters*, 1997. **416**: 61-64.

Fyzikálně-chemická charakteristika buněčných obalů a její význam pro adhezi bakterie *Rhodococcus erythropolis*

Pospíšilová D., Polová M., Čejková A., Masák J.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Úvod

Bakterie *Rhodococcus erythropolis* patří mezi půdní bakterie, které jsou přítomny v kontaminovaných prostředích a z mnoha příčin jsou slibným kandidátem pro bioremediační procesy. Tato bakterie bývá řazena do skupiny mikroorganismů vhodných pro biodegradaci řady látek, které nejsou jinými organismy transformovány[1]. Její metabolický potenciál umožňuje utilizaci velmi problematických, těžko odbouratelných a resistantních sloučenin, mezi které patří řada významných škodlivin životního prostředí. Xenobiotické sloučeniny metabolizované rhodokoky zahrnují řadu strukturních skupin, včetně alifatických i aromatických sloučenin, dále halogenovaných sloučenin, včetně polychlorovaných bifenylů, nitroaromátů, nitrilů, heterocyklických sloučenin a různých herbicidů[2,3].

Kromě řady metabolických aktivit má *Rhodococcus erythropolis* ve srovnání s jinými bakteriemi lepší schopnost tvorby biofilmu. Biofilm bývá charakterizován jako mikroorganismy uzavřené v polymerní matrix adherující k povrchu a k sobě navzájem, které vytvářejí dynamické prostředí umožňující buňkám dosažení homeostaze a jsou optimálně organizované tak, aby bylo možno využít všechny dostupné nutrienty[4]. Biofilmy a agregáty mikroorganismů jsou zodpovědné za většinu mikrobiálních konverzí ve vodním prostředí, za koloběh prvků i biodegradaci environmentálních polutantů. Biofilmy a agregáty mikroorganismů jsou zodpovědné za většinu mikrobiálních konverzí ve vodním prostředí, za koloběh prvků i biodegradaci environmentálních polutantů[5]. Proces adheze a tvorby biofilmu je podřízen řadě proměnných vycházejících z podstaty samotného bakteriálního druhu (složení buněčných obalů, genová exprese, ap.), fyzikálně-chemických vlastností nosiče a podmínek prostředí. Poznání jejich vzájemných vztahů je důležité jak z hlediska akademického, tak průmyslového. Bylo zjištěno, že buňky rostoucí v biofilmu se svou fyziologií odlišují od buněk suspenzních a biofilm se v porovnání se suspenzní populací vyznačuje větší schopností odolat limitujícím i cytotoxickým vlivům, jako je nedostatek živin, či přítomnost antibiotik a toxikantů, včetně environmentálních polutantů[4]. Tyto fyziologické předpoklady mají z antropocentrického hlediska velký význam. Biofilm má své praktické využití v environmentální biotechnologii, řada technologií používá biofilmy v bioreaktorech při biodegradaci a bioremediaci. Biofilmové reaktory dovolují dosažení vysoké koncentrace biomasy umožňující např. účinné čištění velkých objemů průmyslových odpadních vod[6], které jsou typicky

představovány zředěnými vodnými roztoky často perzistentních sloučenin (např. fenol). Biofilmy svými vlastnostmi mohou zároveň ale působit řadu problémů jak v průmyslu, tak v medicíně. Některé komplikace spojené s výskytem biofilmu jsou uvedeny v Tabulce I.

Tabulka I: Problémy spojené s výskytem biofilmu[5]

Problém	Důsledek
Zanášení tepelných výměníků	Ztráty účinnosti výměny tepla, snížení průtokové kapacity
Zanášení průmyslových a vodovodních potrubí	Ztráty energie, koroze, kontaminace produktů, rezervoár patogenů
Zubní plak	Zubní kaz
Infekce	Kolonizace nástrojů (např. katetrů), kontaktních čoček apod.

Materiál a metody

Zkoumaným mikroorganismem byl *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595. Kultivace probíhala v minimálním BS mediu[7] s fenolem, jako zdrojem uhlíku a energie, o koncentraci 0,3 g/l a 0,7 g/l, nebo sukcinátem o koncentraci 10 g/l, v třepaných baňkách za různých teplotních podmínek (15, 20, 30 °C). Fenol, látka toxická pro mikroorganismy a vyšší živočichy i v nízké koncentraci, je nebezpečným kontaminantem životního prostředí. Vzhledem k tomu, že fenol a jeho deriváty jsou základní strukturní jednotkou pro řadu látek, bývá fenol jedním z nejčastějších polutantů řek i odpadních vod. Možnost účinného odbourání fenolu při zpracování odpadních vod má proto značný význam.

Charakteristika povrchu buňky

Pro určení hydrofobity povrchu buňky *R. erythropolis* byla použita metoda MATH[8], která je založena na sledování afinity k uhlovodíkům. 2,5 ml buněčné suspenze ($OD_{400}=0,6$) bylo 60 s vytřepáváno do 0,25 ml hexanu. Suspenze pak byla ponechána 10 minut v klidu, aby došlo k oddělení fází a organická fáze byla odstraněna. Koncentrace biomasy ve vodné fázi byla stanovena spektrofotometricky při 400 nm a hydrofobita vyjádřena jako procentuální část buněk, které přešly do organické fáze podle vztahu:

$$H(\%) = \left(\frac{1 - A}{A_0} \right) \times 100$$

kde A_0 je absorbance počáteční buněčné suspenze a A po extrakci.

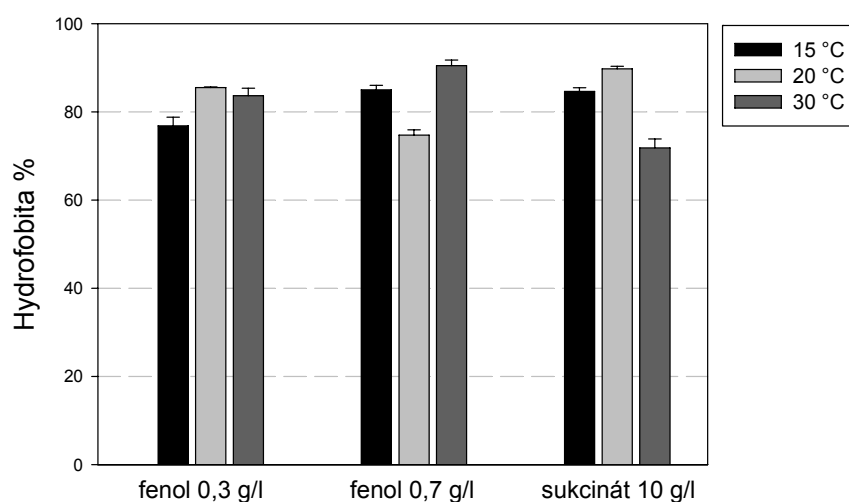
Další metodou bylo měření kontaktních úhlů pomocí metody přisedlé kapky[9]. Při této metodě je určován úhel smáčení (kontaktní úhel) θ , který se vytvoří mezi plynnou, kapalnou a pevnou fází v místě styku všech tří fází. Na homogenní vrstvu buněk, získanou odstředěním a promytím 0,1M KNO_3 , která byla po tenkých vrstvách nanášena na podložní sklo, byla kapána kapka vody a snímána kamerou pomocí přístroje KSV CAM200 (KSV, Finsko) a pomocí softwaru vyhodnocen kontaktní úhel.

Test adheze

Pro testy adheze byly vybrány dva referenční materiály, hydrofilní sklo a hydrofobní silikon. Buněčná suspenze o koncentraci $OD_{400} = 0,6$ v BS mediu s C-zdrojem byla převedena do sterilních kyvet, kam byl vložen testovaný materiál. Kyvety byly třepány (100 ot/min), temperovány na příslušnou teplotu a byla sledována míra osídlení nosičů po 1 a 24 hodinách. Materiál byl vyjmut, opláchnut fyziologickým roztokem a buňky byly obarveny fluorescenčním barvivem SYTO 13 (Invitrogen). Po 15 minutách inkubace ve tmě byl materiál znovu opláchnut fyziologickým roztokem a po odpaření volné vody byly pořízeny snímky povrchu (fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse E 400). Míra osídlení povrchu nosiče byla stanovena metodou analýzy obrazu v softwaru Lucia (Laboratory Imaging, s.r.o., ČR).

Výsledky a diskuze

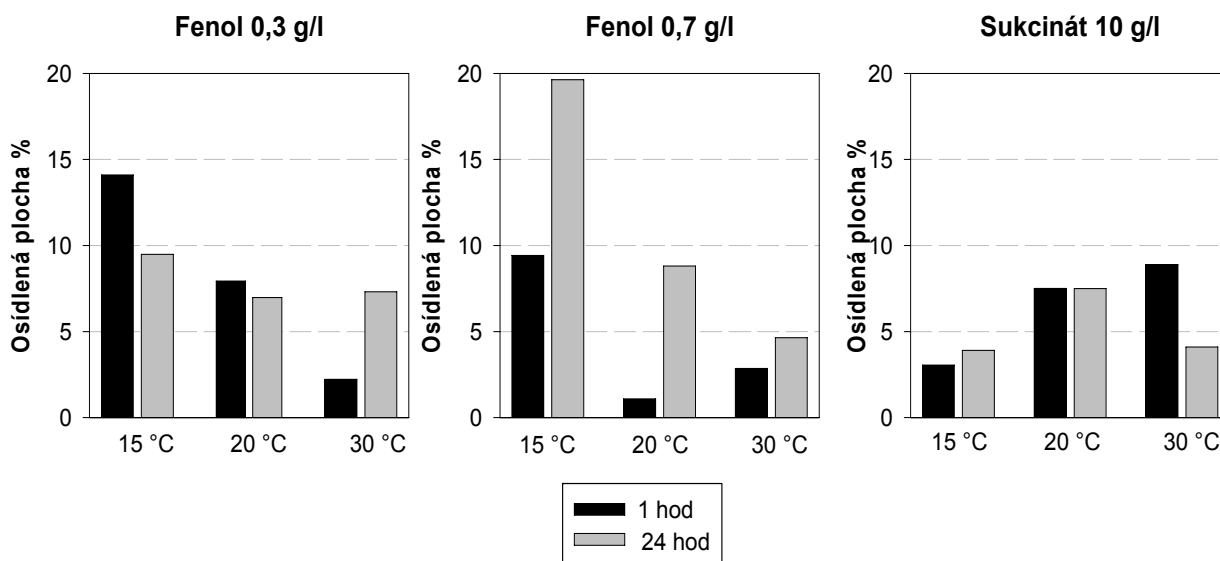
Hydrofobita povrchu bakterie *Rhodococcus erythropolis* určená metodou MATH (Obr. 1) se za daných experimentálních podmínek (použitý druh a koncentrace C-zdroje, teplota kultivace) vždy pohybuje nad hodnotou 70 %. Jak je uváděno v literatuře, afinita k uhlovodíkům větší než 70%, značí silně hydrofobní povrch[10]. Za všech použitých podmínek je povrch bakterie *Rhodococcus erythropolis* tedy silně hydrofobní. Nejvyšší hydrofobita 90 % byla zjištěna při kultivaci na fenolu o koncentraci 0,7 g/l při 30 °C, nejnižší 72 % při kultivaci na sukcinátu také při 30 °C. Kultivace při 30 °C je jediným případem, kdy se projevuje trend v hydrofobitě podle použitého C-zdroje fenol 0,7 g/l > fenol 0,3 g/l > sukcinát 10 g/l. V ostatních případech se podobný trend neukazuje, nelze tedy říci, že by se projevil vliv kultivačních podmínek na hydrofobitu určenou metodou MATH.



Obr. 1: Hydrofobita podle metody MATH

Metodou měření kontaktních úhlů byl povrch této bakterie identifikován také jako hydrofobní. Nejvyšší kontaktní úhel byl změřen pro kultivace na fenolu 0,3 g/l při všech teplotách, a to 89°. V ostatních případech se hodnoty pohybují od 60-75° bez zjevného trendu a ani při určení touto metodou se neprojevil výrazný vliv použitých kultivačních podmínek na hydrofobitu povrchu. Hydrofobita povrchu této bakterie tedy pravděpodobně není ovlivněna teplotou. Neprojevil se ani vliv použití daných C-zdrojů.

Při sledování počátečních stadií adheze bylo zjištěno, že osídlená plocha skleněného materiálu byla velmi nízká, nepřesahuje 0,5% plochy materiálu. Silikon byl osídlen ve větší míře (Obr. 2).



Obr. 2: Míra osídlení silikonového nosiče při testech adheze

Nejvyšší procento osídlení nastává při kultivaci na fenolu o koncentraci 0,7 g/l při 15 °C, téměř 20% povrchu materiálu a při kultivaci s použitou koncentrací fenolu 0,3 g/l také při 15 °C. Při použití sukcinátu, jednoduchého C-zdroje, dochází k mnohem nižší adhezi (pod 9 % osídlené plochy). Ukazuje se tak, že nejméně vhodné podmínky, které negativně působí na rychlost růstu (nízká teplota, přítomnost vysoké koncentrace fenolu), stimulují adhezivní schopnosti zkoumané bakterie, zatímco při použití C-zdroje vhodného pro růst je adheze nízká.

Závěr

Jedním z faktorů, které ovlivňují bakteriální adhezi je hydrofobita povrchu buňky a materiálu. Zkoumaná bakterie *Rhodococcus erythropolis* disponující vysoce hydrofobním povrchem preferuje adhezi k hydrofobním materiálům. Dalším parametrem, který má na adhezi vliv, jsou podmínky vnějšího prostředí. Bakterie vystavené nepříznivějším podmínkám, zejména nižší teplotě a toxickému C-zdroji, adherují ve větší míře, než buňky v pro růst optimálním prostředí. Těchto vlastností lze potenciálně využít při vytváření biofilmu pro průmyslové procesy (např. pro biodegradaci fenolu).

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR 6046137305 a AROMAGEN - 2B08062 a FTTA3/077 a FTTA3/0,63.

Literatura

- [1] Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V. (2009): Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*, Environment International 35: 162-177
- [2] Warhurst A. M., Fewson C. A. (1994) : Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. Critical Reviews in Biotechnology 14: 29–73
- [3] Bell K. S., Philip J. C., Aw, D. W., Christofi N. (1998): A review: The genus *Rhodococcus*. Journal of Applied Microbiology 85: 195–210
- [4] McLandsborough L., Rodriguez A., Perez-Conesa D., Weiss J. (2006): Biofilms: At the interface between biophysics and microbiology. Food Biophysics 1: 94–114
- [5] De Beer D., Stoodley P. (2006): Microbial biofilms. Prokaryotes 1: 904-937

- [6] Nicolella C., Van Loosdrecht M. C. M., Heijnen S. J. (2000): Particle-based biofilm reactor technology. Trends in biotechnology 8: 312-320
- [7] Masák J., Čejková A., Jirků V. (1997): Isolation of acetone/ethylene glycol utilizing and biofilm forming strains of bacteria. Journal of Microbiology Methods 30:133–9
- [8] Geertsema-Doornbusch G. I., Van der Mei H. C., Busscher H. J. (1993): Microbial cell surface hydrophobicity: The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH), Journal of Microbiological Methods 18: 61-68
- [9] Van der Mei H. C., Busscher H. J. (1998): A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 11: 213–221
- [10] Schneider P. F., Riley T. V. (1991): Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus saprophyticus*. Epidemiology and Infection.106: 71-75

Vliv kultivačních podmínek na biodegradační aktivitu a adhezi bakterií

Březinová T., Pospíšilová D., Masák J.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

První část práce byla zaměřena na studium adheze buněk *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595. Byl prokázán vliv kultivačních podmínek na adhezivní schopnosti buněk, přičemž nejvyšší míra adheze byla pozorována v podmínkách nejméně vhodných pro růst mikroorganismu. V souvislosti s adhezí byla studována hydrofobita buněčného povrchu tohoto kmene. Pomocí metody MATH bylo dále prokázáno, že se jedná o bakterii se silně hydrofobním charakterem. Vliv kultivačních podmínek na hydrofobitu prostřednictvím této metody prokázán nebyl. Předmětem této práce bylo rovněž sledování degradačních schopností studovaného kmene. Byly sestaveny biofilmové reaktory s nosiči z různých materiálů (silikonová pryž, PVC a sklo) osídlené populací tohoto kmene. V závislosti na typu nosiče a způsobu uspořádání kultivace byl sledován průběh degradace fenolu. Bylo prokázáno, že degradace buňkami biofilmu je účinnější než degradace buňkami suspenzními. Jako nejvhodnější systém byl stanoven reaktor se silikonovými nosiči v kontinuálním uspořádání.

Biofiltrace směsí hydrofobních a hydrofilních sloučenin

Korbel M., Halecký M., Hudcová T., Páca J.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Práce se zabývá biologickou dekontaminací směsí par hydrofobní a hydrofilní složky. Degradovanými polutanty byly styren a aceton. Degradace probíhaly v biofiltru a ve zkrápěném náplňovém reaktoru. U obou typů reaktorů byly studovány pracovní charakteristiky, tedy eliminační kapacita a degradační účinnost a výsledky byly porovnány. Oba reaktory vykazovaly vysokou účinnost odbourávání směsi daných polutantů. Zkrápěný náplňový reaktor degradoval lépe aceton a naopak biofiltr lépe degradoval styren. Byla také studována kinetika odstranění acetonu rozpuštěného v cirkulujícím médiu ve zkrápěném náplňovém reaktoru za různých podmínek.

Celulolytická aktivita: vliv podmínek a substrátu

Procházková G., Hrdinová J., Jirků V.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Klíčová slova: celulóza, celulolytický biofilm, adheze, povrchové vlastnosti

Celulosoový odpad je persistentním, netoxickým, pevným polutantem, jehož biologická likvidace je stále řešenou otázkou. V této souvislosti je aplikace celulolytické mikroflóry formou přirozeného biofilmu, který by kolonizoval tento polutant, jednou z potenciálně vhodných možností. Proces buněčné adheze a následný vývoj celulolytického biofilmu je procesem komplexním, s výraznou (často obecně platnou) fyziologickou i fyzikálně-chemickou závislostí. V tomto kontextu je práce zaměřena na primární charakteristiku populací třech celulolytických kmenů, která tyto taxony popisuje z hlediska nutriční závislosti reprodukční a celulolytické aktivity, a také z hlediska stavu buněčného povrchu, který je (mimo jiné) determinován i schopností jednobuněčného organismu produkovat vlastní, povrchově aktivní látku(y) (biosurfaktant). Tato práce je částí experimentálního bloku, který byl vypracován pro diplomovou práci (Procházková, 2010).

Úvod

V přírodě se vyskytující celulosové materiály jsou persistentní povahy a jejich biodegradace probíhá velmi pomalu (Bayer a Lamed, 1992). Potenciálním řešením jejich likvidace je cílená technologická aplikace celulolytických mikroorganismů ve formě biofilmu.

Během procesu adheze, kolonizace a degradace celulosových substrátů s případnou následnou tvorbou biofilmu využívají celulolytické mikroorganismy individuální strategii v závislosti na jejich genetické výbavě a podmínkách prostředí (variabilní stavba a uspořádání celulolytického systému). Lze říci, že celulolytický biofilm je prostorovým uspořádáním buněčné populace celulolytického taxonu, který ve svém mezibuněčném prostoru kombinuje (mimo jiné) komponenty celulasového systému a komponenty mimobuněčné polymerní matrix (EPS). Celulolytický biofilm má obdobné charakteristiky jako „obecný model“ biofilmu, tj. vznik a vývoj biofilmu je mnohastupňovým komplexním procesem, struktura (architektura) a vlastnosti (funkce) vzniklého biofilmu jsou determinované vlastnostmi okolního prostředí, kolonizovaného povrchu a vlastnostmi příslušných mikroorganismů (charakterem jejich buněčných povrchů, jejich schopností produkovat širokou škálu extracelulárních polymerních látek apod.). V tomto kontextu bylo cílem předložené experimentální práce charakterizovat populace třech taxonů z hlediska mimobuněčné produkce uvedených komponentů a její závislosti na vlivu nutričního profilu kultivačního prostředí.

Experimentální část

Mikroorganismy: Pro experimentální práci byl použit kmen *Pseudomonas fluorescens*, (sbírka laboratoře Aplikované biologie a bioinženýrství VŠCHT Praha), kmen

Cellulosimicrobium cellulans CCM 2814 (sbírka CCM Masarykovy univerzity, a kmen *Trichosporon cutaneum* CCY 30.5.10 (sbírka Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy).

Média: Vzhledem ke sledovanému vlivu kultivačního prostředí byla použita tato media: komplexní média (ŽB, SE), média obsahující různé typy organických N-zdrojů (pepton, trypton, kvasničný extrakt či močovinu), obohacená syntetická média obsahující vitaminy a aminokyseliny, syntetická média obsahující jako jediný C-zdroj CMC či dusičnan sodný jako jediný N-zdroj. Dále byla testována citlivost reprodukční aktivity vybraných buněčných populací vůči různým koncentracím anorganických zdrojů Ca, N a P. Syntetická média obsahovala jako jediný C-zdroj 1% CMC (w/v). Celkem bylo testováno 37 typů médií a jejich přesné složení je uvedeno v diplomové práci (Procházková, 2010).

Příprava inokula: Inokulum bylo připraveno v Erlenmeyerových baňkách o objemu 500 ml, obsahující 200 ml kapalného komplexního média. Batch kultivace probíhala aerobně na třepačkách při teplotě 28°C po dobu 48-72 hodin. Po ukončení kultivace byla biomasa odstředěna (centrifuga Medifriger-BL, 9660 rpm, 10°C, 10 min.), několikrát promyta a resuspendována sterilním fyziologickým roztokem. Tato koncentrovaná buněčná populace byla použita pro inokulaci různých typů médií.

Kultivace v objemu 300 µl média: Vliv individuálních variant kultivačních podmínek byl sledován s použitím metodologie Bioscreen C (LabSystems Corporation Helsinki, Finland). Pro každou experimentální variantu byly provedeny dvě paralely. Kultivace probíhaly při teplotě 28°C a průběh růstu (reprodukční aktivita) byla automaticky monitorována jako změna absorbance při 405 nm. Slepé vzorky byly v případě kultivace buněčné suspenze na komplexních médiích příslušná sterilní média, v případě kultivace na syntetických médiích byla použita sterilní destilovaná voda.

Kultivace v objemu 200 ml média: Mikroorganismy byly kultivovány vsádkově v 200 ml sterilního média v Erlenmeyerových baňkách (o objemu 500 ml) za aerobních podmínek na třepačce (100 rpm) a při teplotě 28°C. Pro každou experimentální variantu byly provedeny tři paralely. Průběh růstu (reprodukční aktivita) byla během kultivace sledována jako změna OD při 400 nm. Slepé vzorky byly v případě kultivace buněčné suspenze na komplexních médiích příslušná sterilní média, v případě kultivace na syntetických médiích byla použita destilovaná voda.

Stanovení celulolytické aktivity DNS metodou: Stanovení celulolytické aktivity bylo provedeno modifikovanou Millerovou metodou (Miller, 1959), přičemž jako standard byla použita D-glukosa. K 1 ml odstředěnému vzorku, v případě slepého pokusu 1 ml destilované vody, bylo pipetováno 0,5 ml roztoku 1% CMC v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7. Po 30 min. inkubaci ve vodní lázni (40°C) a po přidání 1,5 ml roztoku DNS činidla byla směs 15 min. vařena. Poté bylo přidáno 0,5 ml 40% roztoku vinanu sodno-draselného a po zchladnutí na laboratorní teplotu byla změřena absorbance při 575 nm. Tuto metodu nelze použít u médií obsahující komplexní substráty (např. médium SE, ŽB), vzhledem k interferencím se složkami těchto médií.

Stanovení koncentrace extracelulárních proteinů: Stanovení koncentrace extracelulárních proteinů bylo provedeno modifikovanou Lowryho metodou (Lowry, 1951) a jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Koncentrace extracelulárních proteinů byla stanovena v supernatantu (10 000 rpm, 4°C, 10 min, Centrifuge Eppendorf 5415R) a slepým vzorkem byla destilovaná voda. Bylo umístěno 100 µl vzorku do jamky mikrotitrační destičky (od

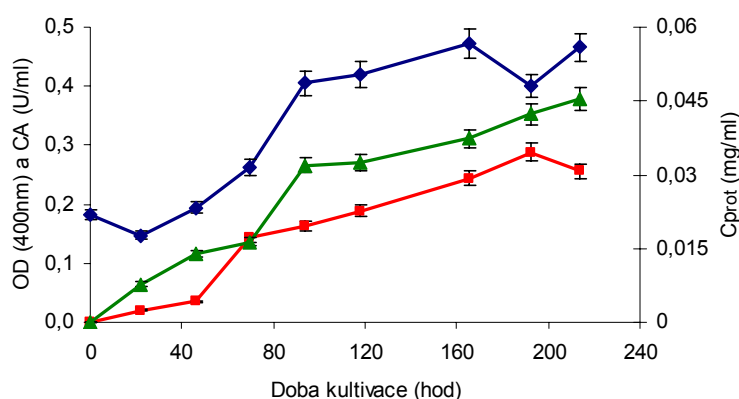
každého roztoku byly provedeny tři paralely) a bylo přidáno 140 μ l Lowryho činidla (připravené smícháním Lowryho činidla č.1., č. 2. a č. 3. v poměru 100 : 1 : 1).

Po 10 min. inkubaci při laboratorní teplotě bylo přidáno 20 μ l Folin-Ciocalteuova činidla (1N). Po další inkubaci (25°C) trvající 30 min. byla odečtena absorbance při 600 nm pomocí přístroje Bioscreen C. Tuto metodu nelze použít v případě kultivačních médií obsahujících komplexní substráty (např. médium SE, ŽB).

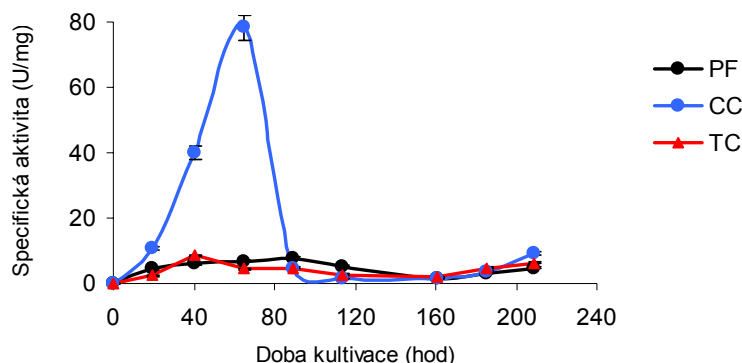
Detekce produkce povrchově aktivních látek mikroorganismy: Schopnost daného mikroorganismu produkovat extracelulární povrchově aktivní látky (tzv. biosurfaktanty) byla detegována metodou stanovení emulsifikačního indexu (E_{24}). Pro experimentální práce byly testovány buněčné populace exponenciálně rostoucí i populace buněk stacionární fáze, přičemž zvoleným nepolárním rozpouštědlem byl hexan (Ilori a kol., 2005). Při dosažení požadované růstové fáze byl z každé baňky odebrán vzorek (2 ml buněčné suspenze), který byl vnesen do zkumavky spolu s 2 ml hexanu. Celkem byly provedeny tři paralely a slepými vzorky byla vždy příslušná sterilní média. Zkumavky byly uzavřeny teflonovými víčky a směs byla intenzivně třepána (ručně) po dobu 2 minut. Poté zkumavky stály po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě (Abouseoud a kol., 2008). Po uplynutí stanovené doby byl vypočten emulsifikační index (E_{24}) na základě publikovaného vztahu (Cooper a Goldenberg, 1987).

Výsledky a diskuse

Reprodukční a celulolytická aktivita, koncentrace proteinů: Z hlediska vlivu kompozice media na reprodukční aktivitu sledovaných populací byla zvolena média kompozičně odlišná, ale výrazně neinterferující s reprodukční aktivitou. Vybraná média pro buněčné populace *Pseudomonas fluorescens* a *Cellulosimicrobium cellulans* byla: ŽB, M1, M4, M5, M18 a M19, pro buněčné populace *Trichosporon cutaneum*: SE, M1, M4, M8 a M32 (Procházková, 2010). U výše zmíněných médií (vyjma SE, ŽB a M1 z důvodu interferencí s metodou DNS a metodou podle Lowryho) byla (ve stejné závislosti) paralelně sledována změna produkce extracelulárních proteinů (c_{prot}), změna extracelulární aktivity celulasového systému (CA) a změna specifické celulolytické aktivity. V následující části je uvedeno pouze několik ilustrativních příkladů, které byly vybrány ze širokého souboru experimentálních dat. Kompletní soubor dat je uveden v diplomové práci (Procházková, 2010).



Obr. 1. Průběh růstu (—◆—), extracelulární celulolytická aktivita (—■—) a produkce extracelulárních proteinů (—▲—) buněčné populace *Pseudomonas fluorescens* rostoucí v prostředí média M18. Chybové úsečky jsou uvedené pro hladinu pravděpodobnosti 95%.



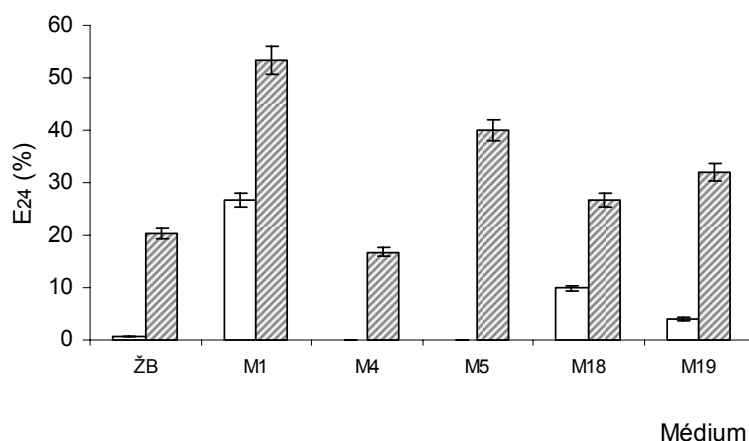
Obr. 2. Změna specifické aktivity celulasového systému buněčné populace *Pseudomonas fluorescens* (PF), *Cellulosimicrobium cellulans* (CC) a *Trichosporon cutaneum* (TC) rostoucí v médiu M4. Chybové úsečky jsou uvedené pro hladinu pravděpodobnosti 95%.

Na základě provedených kultivací bylo zjištěno, že všechny tři vybrané taxony jsou schopné růst na široké škále nejrozličnějších typů médií, s hodnotou pH od 4,1 do 7,7. Vlivem variabilní kompozice jednotlivých médií byly získány individuální profily změny reprodukční aktivity populací sledovaných taxonů (nelze zatím konfrontovat s publikovanými daty). Z grafického vyjádření vlivu kompozice média na celulytickou aktivitu (Obr. 1) vyplývá, že během kultivace dochází ve většině případů k postupnému zvyšování hodnot celulytické aktivity, přičemž jednotlivá média obsahovala jako jediný C-zdroj 1% CMC (w/v). Maximální hodnoty celulytické aktivity jednotlivých experimentálních variant byly stanoveny až po dosažení stacionární fáze růstu. Tyto výsledky jsou rámcově shodné s nálezy jiných laboratoří (Reynolds a kol., 1986; Tamburini a kol., 2004; Bakare a kol., 2005; Hazlewood a kol., 1992; Béguin a Eisen, 1977; Alani a kol., 2007; Sanchez a kol., 1999; Sandhu a kol., 1984).

Profil změny koncentrace extracelulárních proteinů v závislosti na typu média je velmi variabilní. Ve většině případů bylo dosaženo nejvyšších hodnot až po dosažení stacionární fáze růstu, a v některých situacích dochází následně (v pozdějších fázích) k prudkým poklesům profilu pravděpodobně vlivem extracelulárních proteas. Tyto výsledky odpovídají nálezu Sancheze a kol. (1999).

Při kultivaci v prostředí stejného média byly získány profily specifické celulytické aktivity populací sledovaných taxonů. Tyto profily se liší od profilů celulytické aktivity. Rozdíl profilů indikuje variabilní zastoupení celulytické frakce v souboru všech (celkových) proteinů během různých fází růstu populací vybraných taxonů (Obr. 2). Variabilní průběhy změn specifických celulytických aktivit v závislosti na druhu celulytického mikroorganismu odpovídají publikovanému nálezu (Sandhu a kol., 1984).

Detekce produkce povrchově aktivních látek mikroorganismy:



Obr. 3. Hodnoty emulsifikačních indexů (E_{24}) buněčné populace *Pseudomonas fluorescens* exponenciálně rostoucí (□) či ve stacionární fázi růstu (▨) v závislosti na typu média (ŽB – M19). Chybové úsečky jsou uvedené pro hladinu pravděpodobnosti 95%.

V rámci problematiky produkce biosurfaktantů jsou většinou charakterizovány buněčné populace využívající hydrofobní sloučeniny (např. ropné uhlovodíky – viz bioremediace - Rahman a Gakpe, 2008; Densai a Banat, 1997). Podle dostupných informací nebyla zatím studována produkce povrchově aktivních látek u celulólytických mikroorganismů, a není tedy možné uvedené výsledky konfrontovat s výsledkem jiné, ale stejně orientované experimentální práce.

Sledovaná závislost produkce povrchově aktivních látek dokládá, že populace všech použitých taxonů jsou schopné produkovat tyto látky s intenzitou závislou na typu média, růstové fázi a druhu mikroorganismu (Obr. 3). Celkově je tato produkce velmi variabilní. Tyto výsledky rámcově odpovídají nálezům Densaie a Banata (1997). V případě bezbuněčného filtrátu média, a promytých buněčných suspenzí (fyziologický roztok), jsou hodnoty emulsifikačních indexů zanedbatelné až nulové. Tyto výsledky naznačují, že produkované povrchově aktivní látky jsou pravděpodobně volně asociované s buněčným povrchem a experimentální manipulace spojené s jejich stanovením mohou získané hodnoty ovlivnit (Pembrey a kol., 1999).

Závěr

Populace sledovaných taxonů jsou schopné růstové a reprodukční aktivity v prostředí s velkou variabilitou profilu nutrientů a zároveň jsou schopné utilizace rozpustného celulosového substrátu (CMC). Profil změny extracelulární celulólytické aktivity, specifické celulólytické aktivity a produkce extracelulárních proteinů je závislý na typu média a druhu mikroorganismu. V případě sledovaných závislostí byly maximální hodnoty celulólytické aktivity nalezeny až po dosažení stacionární fáze růstu. Populace všech sledovaných taxonů jsou potenciálními producenty povrchově aktivních látek, a tato produkce je výrazně závislá na kultivačních podmínkách.

Literatura

Abouseoud M., Maachi R., Amrane A., Boudergua S., Nabi A. (2008) Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Desalination, 223, str. 143–151.

- Alani F., Anderson W.A., Moo-Young M. (2007) New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnol. Lett.*, 30, str. 123-126.
- Bakare M.K., Adewale I.O., Ajayi A.O., Okoh A.I., Shonukan O.O. (2005) Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulase in *Pseudomonas fluorescens*. *Afr. J. Biotechnol.*, 4, str. 838-843.
- Bayer E.A., Lamed R. (1992) The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource. *Biodegradation*, 3, str. 171-188.
- Béguin P., Eisen H. (1977) Free and cellulose-bound cellulases in a *Cellulomonas* species. *J. Gen. Microbiol.*, 101, str. 191-196.
- Cooper D.G., Goldenberg B.G. (1987) Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. *Appl. Environ. Microb.*, 53, str. 224-229.
- Densai J.D., Banat I.H. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 61, str. 47-64.
- Ilori M.O., Amobi C.J., Odocha A.C. (2005) Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere*, 61, str. 985-992.
- Lowry O.H., Nira J., Rosenbrough A., Farr L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, str. 265-275.
- Miller G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31, str. 426-428.
- Pembrey R.S., Marshall K.C., Schneider R.P. (1999) Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Appl. Environ. Microbiol.* 65, str. 2877-2894.
- Procházková G. (2010) Celulolytická aktivita: vliv podmínek a substrátu, VŠCHT v Praze, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, 110 stran.
- Rahman P.K.S.M, Gakpe E. (2008) Production, characterisation and applications of biosurfactants – review. *Biotechnology*, 7, str. 360-370.
- Reynolds P.H.S, Sissons C.H., Daniel R.M., Morgan H.W. (1986) Comparison of cellulolytic activities in *Clostridium thermocellum* and three thermophilic, cellulolytic anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, str. 12-17.
- Sandhu D.K., Mondal D., Sidhu M.S. (1984) Utilization of cellobiose and production of β -glucosidase by nine yeast species. *Acta Biotechnol.*, 4, str. 163-170.
- Sanchez C. R., Peres C. S., Barbosa H.R. (1999) Growth and endoglucanase activity of *Acetivibrio cellulolyticus* grown in three different cellulosic substrates. *Rev. Microbiol.*, 30, str. 310-314.
- Tamburini E., Perito B., Mastromei G. (2004) Growth phase-dependent expression of an endoglucanase encoding gene (*eglS*) in *Streptomyces rochei* A2. *FEMS Microbiol. Lett.*, 237, str. 267-272.

Charakteristika fenotypu celulolytických mikroorganismů

Mannlová Z., Hrdinová J., Jirků V.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Celulosa je netoxická, v přírodě široce rozšířená polymerní sloučenina. Její biologické odbourávání je často diskutováno v souvislosti s likvidací odpadů obsahujících celulosu.

V této souvislosti byla u vybraných taxonomicky vzdálených kmenů sledována růstová utilizace, produkce mimobuněčných proteinů a jejich celulolytická aktivita v závislosti na vlivu počáteční koncentrace rozpustných a nerozpustných substrátů. Dále byl sledován vliv přítomnosti iontů kovů a povrchově aktivních látek na výše zmíněné vlastnosti.

Na základě získaných výsledků mohou být mikroorganismy s žádoucími technologickými vlastnostmi aplikovány na nerozpustné celulosové materiály za účelem usnadnění kontaktu buněčného povrchu a celulosového substrátu s následnou tvorbou biofilmu a tím k účinnější solubilizaci pevné odpadní celulosy.

Izolace a analýza buněčných obalů *Rhodococcus erythropolis*

Marešová E., Schreiberová O., Čejková A.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

V této práci byl zkoumán vliv kultivačních podmínek (teplota a použitý zdroj uhlíku a energie) na složení polysacharidů buněčných obalů tří kmenů bakterie *Rhodococcus erythropolis*: adaptovaného kmene *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595 Δ catR a dvou modifikovaných kmenů *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595 pSRK 21 phe s posílenou aktivitou enzymů metabolické dráhy degradující fenol. Nejprve byly hledány vhodné parametry metod desintegrace buněk a hydrolýzy buněčných stěn a následně byly analyzovány polysacharidy v buněčných stěnách. Bylo prokázáno, že kultivační teplota i zdroj uhlíku a energie výrazně ovlivňuje polysacharidové složení obalových vrstev této bakterie, a to jak v kvalitativním, tak i v kvantitativním měřítku. Rovněž byla u adaptovaného kmene provedena analýza povrchových skupin buněčných obalů pomocí metody XPS, která vedla ke zjištění vlivu kultivační teploty na složení buněčných obalů.

Vliv teploty na obsah a složení lipidové frakce obalových vrstev *Rhodococcus erythropolis*

Schejbalová P., Polová M., Krulíková T.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Díky širokému enzymovému vybavení je rod *Rhodococcus* schopen degradovat rozsáhlou škálu organických, často toxických sloučenin, mezi které patří i fenol. Jednou z možností fyziologické adaptace mikrobiálních buněk na toxické prostředí je změna zastoupení mastných kyselin v cytoplazmatické membráně v důsledku čehož dochází ke změně fluidity membrány a tím k ovlivnění její propustnosti.

Cílem této práce bylo sledovat vliv teploty a zdroje uhlíku na zastoupení mastných kyselin u tří kmenů bakterií rodu *Rhodococcus* (*Rhodococcus erythropolis* CCM 2595ad, *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595 Δ catR a *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595 pSRK 21 phe).

Kultivace mikroorganismů probíhala v minerálním médiu se sukcinátem o koncentraci 10 g/l a s fenolem o koncentraci 0,3 g/l a 0,7 g/l při teplotách 15°C, 20°C a 30°C. Izolace mastných kyselin byla provedena z lyofilizátu buněk. Mastné kyseliny byly derivatizovány na příslušné methylestery a analyzovány na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem.

Získané chromatogramy methylesterů mastných kyselin byly identifikovány porovnáním retenčních časů se standardem BAME SUPELCO (Bacterial Acid Methyl Esters CP Mix, 10 mg/ml in methyl caproate). Výsledky ukazují, že teplota a zdroje uhlíku mají vliv na zastoupení mastných kyselin v cytoplazmatické membráně.

Mikrobiální degradace benzínových par

Hudeček O., Halecký M., Páca J.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Práce se zabývá biodegradací benzínových par v biofiltru. Sleduje se vliv průtoku vzduchu, vliv vstupní koncentrace benzínu a vliv předřazení adsorbéru s aktivním uhlím na provozní charakteristiky biofiltru. Z výsledků plyne, že průtok vzduchu ovlivňoval celkovou degradační účinnost benzínu jak samotného biofiltru, tak systému adsorbér/biofiltr. Vyšší hodnoty vstupní koncentrace benzínu vykazují inhibiční účinek převážně na degradaci alifatických uhlovodíků. Ve srovnání s podmínkami degradace pouze v biofiltru, zařazení adsorbéru zlepšilo stupeň odstranění alifatických uhlovodíků, ale zhoršilo biodegradaci aromatické frakce.

Expres rekombinantního trypsinogenu a regulace syntézy alkoholoxidasy při kultivaci kvasinky *Pichia pastoris* fenotypu Mut⁺

Pravdová I., Hulín P., Paulová L.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Byla sledována exprese rekombinantního trypsinogenu a enzymu alkoholoxidasy při kultivaci kvasinky *Pichia pastoris* fenotypu Mut⁺ na médiích, které obsahovaly jako zdroj uhlíku a energie methanol nebo methanol ve směsi s víceuhlíkatým substrátem. Na základě dat získaných v kontinuálních experimentech bylo navrženo schéma přítokované kultivace na vybraných substrátech, cílem bylo dosažení maximální produkce vepřového trypsinogenu. V první fázi byly buňky kultivovány na glycerolovém médiu za účelem co nejvyššího nárůstu biomasy. Po 5 hodinách exponenciálního přítokování glycerolového média bylo opakovaně dosaženo koncentrace biomasy $45,3 \pm 0,2$ g/l. V produkční fázi, kdy bylo přítokováno methanolové médium či médium obsahující methanol s glycerolem (1:1), byl indukován AOX promotor a došlo k expresi enzymu alkoholoxidasy a rekombinantního trypsinogenu. Po 24 hodinách produkční fáze, bylo dosaženo velmi vysoké koncentrace rekombinantního proteinu, a to více než 1 g/l v závislosti na typu indukce a použitém substrátu.

Transformace kvasinky *Pichia pastoris* plasmidem obsahujícím GFP a fúzní protein

Pikalová T., Linhová M., Knejzlík Z., Paulová L.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývá klonováním cizích genů do kvasinky *Pichia pastoris* a následným sledováním exprese rekombinantního proteinu. Methylotrófní kvasinka *Pichia pastoris* má ve své genetické výbavě gen pro alkoholoxidázu, což je enzym sloužící pro utilizaci methanolu. Tento gen má velmi silný promotor, který je využíván zároveň jako promotor pro produkci rekombinantních proteinů a je methanolem indukovatelný. Klonování vycházelo z komerčního kitu firmy Invitrogen. Pro transformaci byly použity plazmidy pPICZA pro intracelulární a pPICZαA pro extracelulární expresi a jako kmen byl použit divoký typ *P. pastoris* X-33. Do *P. pastoris* byl úspěšně transformován gen pro Green fluorescent protein (GFP) a byla sledována intracelulární i extracelulární exprese GFP na minimálním médiu s methanolem pomocí fluorescenční mikroskopie a Dot blotu. Transformace plasmidem s genem pro fúzní proteinem Green fluorescen protein-trypsinogen bude dokončena v dalších měsících.

Mikroskopická řasa *Chlorella* jako alternativní zdroj zkvasitelných cukrů pro výrobu biopaliv

Maršálková B., Širmerová M., Brányik T., Brányiková I., Melzoch K.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Jedním z největších globálních problémů současnosti je vývoj technologie náhrady paliv z fosilních surovin biopalivy. Ta jsou tradičně vyráběna z biomasy převážně cíleně pěstovaných zemědělských plodin. Nejrychleji rostoucím takto získaným energetickým zdrojem současnosti se stává ethanol. Tradičním substrátem pro výrobu ethanolu jsou zkvasitelné cukry z cukernatých a škrobnatých surovin. Alternativním zdrojem zkvasitelných cukrů mohou být jednobuněčné řasy (*Chlorella* sp.) schopné vysoké akumulace intracelulárního škrobu (do 65% sušiny) srovnatelné s obilovinami. Navíc, tyto mikroorganismy kultivované na spalínách vznikajících ve spalovnách komunálního odpadu se jeví jako potenciální způsob zabezpečení vyrovnané bilance uhlíku. Díky účinné fixaci CO₂ tak dochází ke snížení emisí tohoto skleníkového plynu a zároveň významně snižuje náklady na produkci biomasy s vysokým obsahem škrobu. Zvýšení obsahu škrobu v řasách ($34,0 \pm 1,2\%$ hm. škrobu v sušině řasové biomasy) pěstovaných na odpaních spalínách bylo dosaženo zásahy do biochemických procesů buňky. Cílem této práce bylo zabývat se optimalizací enzymové hydrolýzy škrobu z jednobuněčných řas, jež dnes představují jednu z nejperspektivnějších surovin pro výrobu bioethanolu. Výtěžnost glukózy po enzymové hydrolýze škrobu z nedesintegrované biomasy byla 57%, zatímco mechanická desintegrace buněk vedla ke zvýšení výtěžnosti následného procesu štěpení škrobu na 73%. Vlivem zvýšení množství použitých enzymů na dvojnásobek se výtěžnost glukózy u nedesintegrované biomasy zvýšila o 46%. U desintegrované biomasy se pak výtěžnost glukózy zvýšila o 37% a dosahovala tak 100% teoretického výtěžku zkvasitelných cukrů vypočteného z původního obsahu škrobů.

Úvod

Ztenčování celosvětových zásob fosilních paliv a zvyšující se koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře nutí zejména vyspělé země k intenzivnímu hledání alternativ ke klasickým palivům, zejména takových, které by umožňovaly tzv. uzavřený koloběh uhlíku. Pozornost se proto zaměřila na biopaliva. [1-3]

V poslední době nabývá na významu využití jednobuněčných řas jako suroviny pro výrobu biopaliv. Tyto fotoautotrofní mikroorganismy mají totiž schopnost řádově rychlejšího růstu než vyšší rostliny, nižší nároky na spotřebu vody a hnojení, vytvořená biomasa může být spotřebována kompletně, bez vzniku významných odpadů a v neposlední řadě mohou být fotobioreaktory umístěny na územích, která nejsou vhodná k zemědělskému využití [4-7].

Často se mluví o různých druzích mikroskopických řas jako o potenciálním zdroji lipidů pro výrobu biodieselu [7, 8], nicméně tato technologie zatím naráží na principiální problémy.

Řasy s vysokým obsahem lipidů v biomase se vyznačují nízkou růstovou rychlostí a vysokou sensitivitou vůči střížným silám.

Pokud se nenajde nový vhodný druh mikroorganismu či nevyšlechtí nová genetická modifikace, nebudou výsledné energetické, ekologické a sociální efekty dostatečně pozitivní a záměr využití mikroskopických řas k produkci biodieselu tak nebude obhajitelný [7]. Vyskytují se ovšem i rostoucí odolné jednobuněčné zelené řasy, jejichž hlavní zásobní látkou je škrob.

V souvislosti s využitím řasové biomasy pro produkci bioetanolu byl pro experimenty použit rychle rostoucí produkční kmen autotrofní zelené chlorokokální řasy *Chlorella vulgaris*. Mezi její nejvýznamnější vlastnosti patří velmi vysoká růstová rychlost, rezistence vůči střížným silám a relativní nenáročnost pěstování biomasy ve velkoobjemových kultivacích. Produkce biomasy při nich může dosáhnout i více jak 100 tun suché biomasy na hektar za rok. Obsah škrobu v biomase je pak silně závislý na množství kultivačních podmínek a může se pohybovat v rozmezí 0 až 65% sušiny. Při velkoobjemových kultivacích provedených za optimálních podmínek bylo v suché biomase zjištěno 20% škrobu.

První provedené pokusy byly zaměřené na zvýšení obsahu škrobu v biomase. Kultivovány byly za podmínek limitace třemi hlavními makronutrienty (N, S, P) a potlačení proteosyntézy specifickými inhibitory. U buněk vystavených specifickým stresovým kultivačním podmínkám vzrostl obsah škrobu až na 65% suché váhy. Takto vypěstované řasy se dá využít jako surovina pro výrobu biopaliv, zejména bioetanolu. Předběžné výsledky následné enzymatické konverze škrobu z řas na fermentovatelné cukry jsou pak prezentován v tomto článku.

Experiment

Materiál a metody

Biomasa řas použitá při experimentech byla vypěstována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd ČR v Třeboni. Kultivace byla provedena za limitace zdrojem síry [9] ve venkovních velkoobjemových solárních jednotkách s tenkou vrstvou suspence na nakloněném povrchu [5, 10].

Prvním stupněm při enzymatické hydrolýze byla desintegrace buněk produkčního mikroorganismu a uvolnění intracelulárního škrobu pomocí balotibnového mlýnu Dyno-Mill KDL-Pilot A (Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Basel, Switzerland). Optimální velikost skleněných balotin byla 0,3-0,5 mm. Úspěšnost homogenizace rozemletím buněk byla 95% [10].

Analýza obsahu intracelulárního škrobu byla provedena v následujících krocích. Biomasa byla sklizena odstředěním kultivované řasové suspenze po dobu 5 minut při 5000 rpm a zmrazena při teplotě – 20 °C. Následně byla separovaná biomasa desintegrována. Před hydrolýzou škrobů (30% HClO₄, 15 min, 25°C) bylo nutné vyextrahovat pigmenty (80 % EtOH, 15 min., 68°C, třikrát). Vzniklá glukóza reagovala s anthronem (72% H₂SO₄, 8 min, 100°C) za vzniku barevného produktu, který byl měřen spektrofotometricky.

Strukturní analýza škrobu pocházejícího z biomasy řas. Poměr Amylóza/Amylopektin byl zjišťován za použití komerčního kitu (K-AMYL/04/06 Kit, Megazyme, Ireland). Škrob obsažený ve vzorcích řasové biomasy byl kompletně dispergován zahříváním v dimetyl sulfoxidu (DMSO). Lipidy byly odstraněny vysrážením škrobu, který byl následně regenerován. Po rozředění vysrážených vzorků v acetáto/solném rozpouštědle byl amylopektin vysrážen přidávkou Con A (lektin concanavalin A) a odstraněn centrifugací. Amylóza obsažená bez zbytku v supernatantu byla enzymaticky hydrolyzována na D-glukózu. Ta byla analysována glukóza - oxidáza/peroxidázovým reagentem. Celkový škrob

byl zjišťován obdobným způsobem z acetát/solných vzorků a měřen kolorimetricky glukóza - oxidáza/peroxidázou. Koncentrace amylózy ve vzorcích škrobu byla vyjádřena jako poměr absorbance (měřeno při 510 nm) supernatantu Con A z vysrážených vzorků k absorbanci celkového množství škrobu ve vzorcích [11, 12].

Konverze škrobu z řas na fermentovatelné cukry. Na hydrolýzu škrobu byly použity termostabilní amylázy vyvinuté společností Genencor (www.genencor.com). Shrnutí optimálních podmínek je uvedeno v Tabulce 1. Hydrolýza škrobu probíhala v následujících krocích. Na začátku byly připraveny čtyři zápary. Koncentrace suspenze z materiálu (desintegrovaná biomasa: DB, nedesintegrovaná biomasa: NDB) a destilované vody (0.5 L) byla 22 g sušiny L-1 a její pH bylo upraveno na hodnotu 6.0. Dále byla suspenze v termostatické lázni za stálého míchání (průměr magnetického míchadla 4.5 cm, 250 rpm) zahřívána na teplotu 85°C. Následně byla přidána termostabilní škrob zkapařující vysoce účinná alfa-amyláza (Spezyme® XTRA, Genencor, Danemark). Teplota byla po dobu 30 minut udržována na 85°C. Enzymatický proces zcukřování pokračoval zchlazením suspenze na teplotu 65°C a upravením pH na hodnotu 4.0 (HCL). Poté byla přidána zcukřující glukoamyláza (Distillase® L-400, Genencor, Danemark) a beta-glukanáza/xylanázový komplex (Optimash™ BG, Genencor, Danemark). Tento krok byl prováděn za stálého míchání suspenze po dobu 24 hodin při teplotě 65°C. Shrnutí přidávaných množství jednotlivých enzymů je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 1 Použité termostabilní enzymy a jejich optimální podmínky.

Amylázy	Enzymy	Optimální teplota	Optimální pH	Doporučené množství (kg enzymu t ⁻¹ suchého škrobu)
Spezyme® XTRA	α-amyláza	85°C	5,0-6,7	0,4-0,8
Distillase® L-400	amylglukosidáza	58-65°C	3,0-5,0	0,6-0,8
Optimash™ BG	glukanáza/xylanáza	60-70°C	4,0-5,0	0,025-0,05

Tabulka 2 Označení a příprava jednotlivých zápar.

Zápara	Surovina	Množství Spezyme® XTRA (μL)	Množství Distillase® L-400 (μL)	Množství Optimash™ BG (μL)
NDB-A	nedesintegrovaná biomasa	8,80	8,80	0,55
NDB-B	nedesintegrovaná biomasa	17,60	17,60	1,10
DB-A	desintegrovaná biomasa	8,80	8,80	0,55
DB-B	desintegrovaná biomasa	17,60	17,60	1,10

Analýza obsahu zkvasetelných cukrů. Vzorky reakční směsi odebrané v průběhu enzymové hydrolýzy byly zchlazeny na pokojovou teplotu, filtrovány přes mikrofiltry (Cellulose Nitrate Membrane Filters, Whatman GmbH, Germany) o velikosti pórů 0.2 μm, odplyněny a neutralizovány (pH=7). Druhy a množství cukrů pak byly stanovovány pomocí vysoko-účinné

kapalinové chromatografie HPLC (Agilent 1100) a separovány na ionexové koloně s předkolonou Ag+ (Phenomenex Rezex RSO Oligosaccharides 200x10 mm) při teplotě 80°C. Použita byla mobilní fáze obsahující odplyněnou demineralizovanou vodu o objemové průtokové rychlosti 0.4 mL.min⁻¹. Cukry jsou následně analyzovány měřením indexu lomu světla refraktometrickým detektorem (Agilent 1100 RID). Data byla zpracována v softwaru Agilent Chemstation

Výsledky a diskuze

Vhodnost škrobu pro specifické konečné využití závisí na jeho vlastnostech. Jedním z faktorů určujících vlastnosti škrobu je poměr amylosa/amylopektin. Na základě strukturní analýzy škrobu zjišťujeme stabilitu a odolnost, rozpustnost, bobtnavost, mazovatění a želírující vlastnosti škrobu. Ty ovlivňují dílčí kroky hydrolýzy (mazovatění, ztekucení, zcukření) s cílem optimalizovat výtěžnost procesu. Zjištění množství amylózy ve škrobu je tak velmi důležitý parametr pro výběr, aplikaci a dávkování vhodných amylolytických enzymů (zejména termostabilní amylázy) [13, 14], a dále pak pro optimalizaci provozních podmínek hydrolýzy (teplota, doba trvání, míchání). Obsah amylózy ve škrobu z řas byl stanovený pomocí konerčního kitu je presentován v tabulce 3. Z výsledků je vidět, že obsah amylózy ve škrobu z řas je srovnatelný s obsahem amylózy ve škrobu v rostlinách sloužících jako škrobářská surovina. Tudíž můžeme předpokládat, že škrobově bohatá biomasa z řas nebude vyžadovat žádná zvláštní opatření oproti škrobářským surovinám.

Tabulka 3 Srovnání obsahu amylózy v hlavních rostlinných zdrojích škrobu [13] s obsahem amylózy v biomase *Chlorella vulgaris* kultivované za limitace zdrojem síry.

Zdroje škrobu	Obsah amylózy (% celkového škrobu)
Chlorella vulgaris	34-38
Ječmen	21-24
Pšenice	25-29
Kukuřice	25-28
Brambory	18-21
Hrách	33-36

Pro optimalizaci výtěžnosti procesu enzymatické hydrolýzy reálného škrobového substrátu z řas byly studovány podmínky (teplota, doba enzymatické degradace) dílčích kroků hydrolýzy (mazovatění, ztekucení, zcukření) [13, 14]. Tento proces vyžadoval užití termostabilních α -amyláz. Pokusy byly provedeny ve vsádkovém uspořádání za regulovaných podmínek (přídavek enzymů, teplotní profil, míchání).

V prvním stupni hydrolýzy škrobu na koncentrovaný glukózový sirup se uvolňují procesem ztekucení škrobu krátké řetězce oligosacharidů. V druhém stupni sacharifikace se tyto dále štěpí procesem zcukřování až na zkvasitelnou glukózu. To je dáno hydrolytickým štěpením α -1-4 glykosidických vazeb z neredukovatelného konce vazby, čímž dojde k rozštěpení na menší sacharidové složky [15].

Biomasa řas používaná během všech experimentů byla kultivována ve venkovních velkoobjemových nádržích za limitace zdrojem síry. Tímto způsobem bylo dosaženo $34,0 \pm 1,2\%$ hmotnostních škrobu v sušině řasové biomasy. V tabulce 4 jsou zobrazeny koncentrace do vody vyextrahovaných rozpustných cukrů po 60 minutách macerace biomasy (11 g) v destilované (500 ml) vodě při 25 a 85°C. Výsledky ukazují, že rozdíl v obsahu celkových extrahovatelných cukrů mezi nedesintegrovanou (0,067 g.g⁻¹ sušiny) a desintegrovanou

(0,098 g.g⁻¹ sušiny) biomasou není významný (Tab. 4). Samotná desintegrace tudíž významně nezvyšuje obsah zkvasitelných cukrů v řasové biomase.

Tabulka 4 Koncentrace cukrů před a po enzymatické hydrolýze a výtěžnost enzymové hydrolýzy. (NDB- nedesintegrovaná biomasa; DB- desintegrovaná biomasa; A- základní množství enzymu, macerace při 25°C; B- zvýšené množství enzymu, macerace při 85°C).

Sacharid	Před hydrolýzou				Po hydrolýze				Výtěžnost			
	NDB-A (g.l ⁻¹)	NDB-B (g.l ⁻¹)	DB-A (g.l ⁻¹)	DB-B (g.l ⁻¹)	NDB-A (g.l ⁻¹)	NDB-B (g.l ⁻¹)	DB-A (g.l ⁻¹)	DB-B (g.l ⁻¹)	NDB-A (g.l ⁻¹)	NDB-B (g.l ⁻¹)	DB-A (g.l ⁻¹)	DB-B (g.l ⁻¹)
Maltóza	0,7	0,1	1,1	0,2	0,4	0,1	0,2	0,2	-	-	-	-
Glukóza	0,7	0,1	1,0	0,2	6,0	7,1	8,6	8,9	56,8	83,2	73,4	99,9
Maltotrióza	0,3	0,1	0,8	0,2	0,3	0,1	0,2	0,5	-	-	-	-

Na začátku enzymové hydrolýzy škrobu obsahovalo 22 g sušiny řasové biomasy přibližně 7,5 g škrobu. Analýzou sacharidů reakční směsy po hydrolýze (Tab. 4) bylo zjištěno, že škrob, a dále menší množství maltózy a maltotriózy, byl konvertován zejména na glukózu. Výtěžnost procesu značně ovlivnila mechanická desintegrace buněk řasové biomasy. V případě absence mechanického mletí buněčných obalů řas vzrostla koncentrace glukózy v reakční směsi na ca. 6 g.l⁻¹ a výtěžnost procesu štěpení škrobu na glukózu byla přibližně 57%. Mechanické narušení pevných buněčných stěn řas a intracelulárních membránových struktur před enzymovou hydrolýzou se projevilo zvýšením výtěžnosti procesu štěpení škrobu na 73,4% (Tab. 4). V rámci optimalizace bylo zvýšeno množství enzymů přidávaných při hydrolýze na dvojnásobek. Poté se výtěžnost glukózy u nedesintegrovaného materiálu zvýšila skoro o polovinu, na více jak 83% a u desintegrované biomasy se pak výtěžnost glukózy zvýšila o 37% a dosahovala tak skoro 100% teoretického výtěžku zkvasitelných cukrů vypočteného z původního obsahu škrobů. V budoucnu bude práce zaměřena na další zvýšení výtěžnosti enzymové hydrolýzy škrobu z řas.

Závěr

V této práci byla studována dvoustupňová enzymatická hydrolýza škrobu z řas za použití komerčně dostupných enzymů (alfa-amyláza, glucoamyláza). K hydrolýze byly nastaveny podmínky (koncentrace substrátu a enzymů, čas potřebný k působení enzymů) doporučené výrobcem termostabilních enzymů. Během experimentu byl škrob hydrolyzován z 73% na zkvasitelné cukry. Přesto byla výtěžnost hydrolýzy škrobu poněkud nižší než je tomu v případě hydrolýzy obilného škrobu (ca. 90%). To bylo způsobeno nedokonalou optimalizací procesu hydrolýzy (desintegrace, dávkování enzymu, doba působení). Po částečné optimalizaci bylo zjištěno, že zvýšením množství enzymů oproti standardnímu návodu výrobce dosahovala výtěžnost glukózy hydrolýzou škrobu z desintegrované biomasy 100% teoretického výtěžku zkvasitelných cukrů vypočteného z původního obsahu škrobů. To potvrzuje možnost použití tohoto zdroje škrobu k produkci bioetanolu. Nicméně, pro zvýšení ekonomické efektivity provozní aplikace je nutné produkční proces dále optimalizovat.

Poděkování

Tento výzkum je podporován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR prostřednictvím projektu EUREKA (OE09025-ALGANOL) a MSM 6046137305.

Reference

- [1] Scharlemann J. P. W. (2008) "How Green Are Biofuels?" Science, 319, 43-44.
- [2] Hill, J., (2006) "Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels", PNAS, 103, 11206–11210.
- [3] Farrell, A.E., et al., (2006) "Ethanol can contribute to energy and environmental goals", Science, 311, 506-508.
- [4] Patil V., T.K.-Q., Giselrod H. R., (2008) "Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae", Int J Mol Sc, 9, 1188-1195.
- [5] Doucha, J. and K. Livansky, (2006) Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate, J Appl Phycol, 18, 811-826.
- [6] Livansky, K., Doucha, J., (2000) Productivity of the microalga *Chlorella kessleri* in outdoor open thin-layer batch cultures, Arch Hydrobiol, 132, 103-122.
- [7] Huntley, M.E. and D.G. Redalje, (2007) CO₂ Mitigation and Renewable Oil from Photosynthetic Microbes: A New Appraisal, Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 12, 573-608.
- [8] Kheshgi, H.S., R.C. Prince, and G. Marland, (2000) The potencial of biomass fuels in the context of global climate change: Focus on Transportation Fuels, Ann Rev Energ Environ, 25, 199-244.
- [9] Doušková, I., Doucha, J., Umysová, D., Vítová, M., Zachleder, V., Microalgae - A Promising Source of Starch For Bioethanol Production, Polysacharidy IV, 13.–14. November 2008, Prague, Czech Republic
- [10] Doucha, J., Lívanský, K., (2009) Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potential productivity, J Appl Phycol, 21, 111–117
- [11] Yun, S.H., Matheson, N.K., (1990) Estimation of Amylose Content of Starches after Precipitation of Amylopectin by Concanavalin-A, Starch/Stärke, 42, 302-305.
- [12] <http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/K-AMYL.pdf>
- [13] Buléon, A., P. Colonna, V. Planchot, S. Ball, (1998) Starch granules: structure and biosynthesis, Int J Biol Macromol, 23, 85-112.
- [14] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra H., Goswami V.K., Chauhan B., (2003) Microbial α -amylases: a biotechnological perspective, Process Biochem, 38, 1599-1616.
- [15] Marc, J.E.C., van der Maarel, (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, J Biotechnol, 94, 137-155.

Enzymová hydrolýza řas polysacharidů

Čapek R., Maršálková B., Brányik T.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

V důsledku stále vyšších nároků na zdroje energie a zároveň ubývání těchto zdrojů je trendem dnešní doby zaměřovat se na alternativní obnovitelné zdroje energie. Vedle klasicky získávané energie (fotovoltaické panely, větrné elektrárny, apod.) se otevírá prostor i ve využití mikroorganismů a jejich zásob energie, například škrobu.

Jako zdroj biomasy byla v této práci použita zelená chlorokokální řasa *Chlorella vulgaris*. K získání zkvasitelných cukrů z této biomasy, v které je $34,0 \pm 1,2$ hm % škrobu v sušině (za podmínek limitace sírou to může být až 65% hm.), bylo využito enzymové hydrolýzy. Té se účastnily tyto enzymy: Spezyme XTRA v první fázi a Distillase L-400 a Optimash BG ve fázi druhé. Pro štěpení celulosy ve třetí fázi hydrolýzy byly testovány enzymy celulasového komplexu a β -glukosidasa. Na závěr byl proveden pokus s takto upravenou suspenzí ověřující možnost získávání bioethanolu, kde byla tato suspenze zaočkována lihovarskými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Navržený postup byl optimalizován z hlediska dávek enzymů a doby působení. Bylo zjištěno, že hydrolýzou polysacharidů obsažených v suspenzi 110 g/l sušiny řasové biomasy a následnou konverzí takto uvolněných zkvasitelných cukrů na ethanol lze získat roztok s koncentrací 19,3g/l ethanolu.

Adheze jednobuněčných řas *Chlorella vulgaris* na pevné povrchy

Širmerová M.¹, Maršálková B.¹, Kováčová R.², Bittner M.¹, Brányik T.¹

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha

Klíčová slova: Adheze, řasy, interakční energie, kontaktní úhel, optimalizace

Cílem tohoto projektu bylo identifikovat a kvantifikovat faktory prostředí, které ovlivňují a řídí adhezi řas, konkrétně průmyslově využívané řasy (*Chlorella* sp.), na pevné povrchy určením povrchových vlastností (povrchové napětí, povrchový náboj) interagujících ploch, tj. buněčných stěn a pevných inertních substrátů, v našem případě čistého skla, skla s upraveným povrchem (APTES) a polystyrenu. Za tímto účelem byly vypracované a optimalizované metody měření. Metoda měření kontaktních úhlů a měření zeta potenciálu buněk byly prostudovány a adaptovány a optimalizovány pro naše použití k predikci adheze jednobuněčných řas na zvolené inertní povrchy. Dosažené výsledky naznačují, že složení kultivačního média ovlivňuje povrchové napětí buněčných stěn jednobuněčných řas. Obecně lze říci, že koloidní a termodynamický model interakce koloidních částic aplikovaný pro mikrobiální buňky umožňuje alespoň přibližnou (i když ne zcela spolehlivou) selekci vhodných konstrukčních materiálů pro fotobioreaktory či materiálů pro imobilizaci jednobuněčných řas.

Experiment

Materiál a metody

Kultura řasy *Chlorella vulgaris*, kmen P12 má relativně vysokou růstovou specifickou rychlost (0,25 h⁻¹ při optimálních podmínkách) a jsou schopné růstu při vysoké koncentraci CO₂. Tento buněčný kmen pod označením CCAP 211/1 je skladován v botanickém institutu Akademie věd v České republice.

Podmínky pěstování kultury řas. Řasy jsou pěstovány v objemu 300 ml media ve skleněných válcích, které jsou probublávány směsí plynů CO₂ a O₂ (2% CO₂) a tento poměr vhaněných plynů je kontinuálně měřen. Válce jsou umístěny v termostatické vodní lázni, kde je teplota udržována při 30°C a v průběhu celé kultivace byly ozařovány stejnou intenzitou světla z fluorescenčních zářivek. Kompozice základního růstového média (Medium 1) je založena na složení biomasy řas a má následující obsah (mg.l⁻¹): 1100 (NH₂)₂CO; 237 KH₂PO₄; 204 MgSO₄·7H₂O; 88 CaCl₂; 4 C₁₀H₁₂O₈N₂NaFe; 0,83 H₃BO₃ 0.95 CuSO₄·5H₂O; 3,3 MnCl₂·4H₂O; 0,17(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O; 2,7 ZnSO₄·7H₂O; 0,6 CoSO₄·7H₂O; 0,014 NH₄VO₃ v destilované vodě. Při pěstování řas bylo změněno složení média a byly pozorovány změny v povrchových vlastnostech buněk. Změna složení média spočívala ve snížení obsahu složky média představující zdroj železitých iontů (C₁₀H₁₂O₈N₂NaFe) na 2 mg.l⁻¹ (Medium2) a bez zdroje mikroelementů (Medium3). Hodnota pH všech médií byla během všech kultivací udržována na hodnotě 7.

Příprava vrstev řas. Suspenze řas ve stacionární fázi růstové křivky byla odstředěna při 4000 ot/min po dobu 5 min a promyta destilovanou vodou. Tento proces byl opakován třikrát. Pak byla suspenze přefiltrována přes membránový filtr (velikost pórů 0.45 μm). Koncentrace buněk na filtru byla 4×10^6 cells/mm².

Měření kontaktních úhlů. Kontaktní úhly byly měřeny přístrojem na měření kontaktních úhlů CAM200 (KSV, Finsko). Jako testovací kapaliny byly zvoleny: voda, formamid, α-bromonaftalen. Z naměřených hodnot kontaktních úhlů, které tvoří kapka (5 μl) testovaným povrchem (vrstva buněk, nebo pevný inertní povrch) bylo vypočteno celkové povrchové napětí (γ_{tot}) a jeho dílčí složky (γ_{LW} , γ_{AB} , γ_{tot}) pro buňky a pevný povrch. Hodnoty volné interakční energie mezi buňkami ve vodě a buňkami a nosičem byly vypočítány podle van Oss a kol. [2].

Měření zeta potenciálu buněk. Povrchový náboj řas pěstovaných v médiu byl stanoven přístrojem Zetasizer Nano-ZS (Particle Sizer, Malvern, UK) v 5 mM KNO₃ (pH7) jenž svou iontovou silou odpovídá kultivačnímu médiu.

Měření velikosti buněk Měření velikosti buněk řasy *Chlorella vulgaris* byl stanoven pomocí obrazové analýzy. Pro toto měření byl použit mikroskop s napojením na digitální fotoaparát (Nikon Eclipse E400). Fotografie byly vyhodnoceny pomocí software LUCIA (Laboratory Imaging s.r.o., Czech Republic).

Předpověď adheze pomocí DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) teorie

DLVO teorie umožňuje výpočet průběhu interakční energie mezi dvěma povrchy v závislosti na separační vzdálenosti mezi povrchy. Přitom zohledňuje pouze působení disperzních a elektrostatických sil. V přístupu použitý během této práce byla použita Hamakerova konstanta odhadnuta pro biologické systémy (0.8 kT), iontová síla prostředí 5 mM (vypočítaná pro použité kultivační médium), a zeta potenciál buněk a nosičů při pH média (pH = 7). Dále pak byl při výpočtech použit průměr buněk stanovený obrazovou analýzou (Tab. 1)

Výsledky a diskuze

Tabulka 1 Průměrné hodnoty zeta potenciálu (5 mM KNO₃, pH7) pro buňky řas vypěstované v médiích o různém složení.

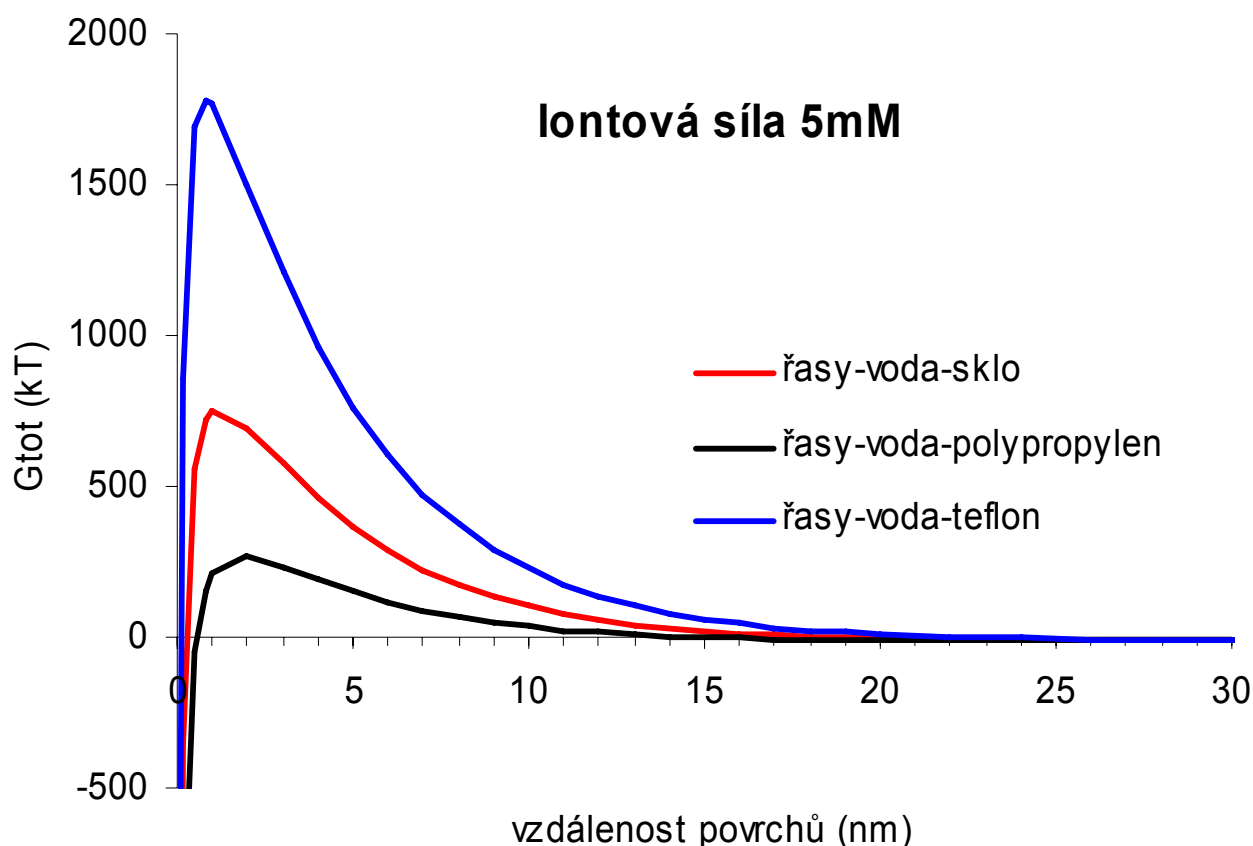
	Zeta potenciál (mV)	Průměr buněk (μm)
Řasy (médium1)	-13,1±0,6	5.51 ± 0.54
Řasy (médium2)	-15,7±0,3	5.28 ± 0.39
Řasy (médium3)	-16,2±0,7	5.36 ± 0.62
Sklo ^a	-20	-
Polypropylen ^b	-10	-
Teflon ^c	-40	-

^a Yongan Gu, Dongqing Li, Journal of Colloid and Interface Science **226**, 328–339 (2000)

^b M. Sfiligoj Smole, K. Stakne, K. Stana Kleinschek, M. Kurecic, M. Bele, D. Gregor Svetec, V. Ribitsch, Journal of Applied Polymer Science, 113, 1276–1281 (2009)

^c U. Meyer, S. Kostler, V. Ribitsch, W. Kern, Macromol. Chem. Phys. 2005, 206, 210–217

Výsledky simulace kolize mezi buňkou a různými pevnými povrchy podle DLVO teorie ukazují, že v minerálním médiu s iontovou silou 5mM zabráňují kontaktu povrchu s patřičným nábojem (with the corresponding zeta potentials of cells and support particles, there Tab. 1) výrazné energetické bariéry (Obr. 1). To znamená, že za reálných kultivačních podmínek bude těsnému kontaktu buněk s nosičem/stěnou fotobioreaktoru zabráňovat odpuzivá elektrostatická síla a tudíž kolize povrchů je nepravděpodobná. Jak je vidět z Obr. 1., energetická bariéra se zvyšuje s povrchovým nábojem pevného substrátu (Tab. 1). Kvůli elektrostatickému odpuzování se tudíž na základě DLVO teorie neočekává adheze řas na modelové povrchy. Obdobně nelze očekávat shlukování řas (flokulace). Vliv složení média (snížení obsahu železa a mikroelementů) nemělo výrazný vliv na zeta potenciál povrchu buněk a proto neovlivnilo ani výsledek simulace podle koloidní (DLVO) teorie.



Obr. 1. Změna interakční volné energie (G_{tot}) v závislosti na vzdálenosti povrchů mezi řasou (růst v médiu1) a povrchem různých pevných materiálů v 5 mM KNO_3 při pH7.

Spolu se simulací povrchové interakce v reálném médiu jsme provedli výpočty pro situaci se zvýšenou iontovou silou média (50 mM). To může například nastat v případě kdy močovinu jako zdroj dusíku nahradíme $NaNO_3$. Zvýšená koncentrace solí v médiu výrazně ovlivní průběh celkové interakční energie (G_{tot}) na vzdálenosti povrchů, přičemž se objevují v tzv. sekundárním minimu ve vzdálenosti přibližně 5-7 nm (výsledky zde nejsou zobrazeny). V tomto sekundárním energetickém minimu se mohou povrchy stabilizovat, čemuž napomáhají případné povrchové struktury buněčné stěny. Pracovní hypotézu přítomnosti těchto struktur bude nutné v budoucnu potvrdit.

Bilance mezifázových volných interakčních energií

Jelikož DLVO teorie zahrnuje pouze interakce působící na delší vzdálenost (elektrostatické, disperzní) a nezahrnuje do energetické bilance polární (acidobazické) a apolární (Lifshitz-van der Waals) interakce, bylo kvůli ověření předpovědi adheze v přímém kontaktu povrchů vytvořit bilance mezifázových volných interakčních energií. Průměrné kontaktní úhly buněčných povrchů a různých materiálů (Tab. 2) byly potřebné k výpočtům povrchového napětí jednotlivých interagujících povrchů (Tab. 3). Dále byly hodnoty povrchového napětí použity k výpočtu volných interakčních energií různých systému (dvou buněk, nebo buňky s pevným substrátem) ve vodním prostředí (Tab. 3).

Tabulka 2 Průměrné hodnoty kontaktních úhlů všech testovacích kapalin na povrchu pevných materiálů a na vrstvách řas vypěstovaných v médiích o různém složení.

Typ povrchu	Kontaktní úhel (°)		
	Voda	Formamid	α -Bromonaftalen
Sklo	36,0	30,9	32,3
Sklo (APTES)	56,8	44,8	30,8
Polystyren (PS)	98,8	75,5	17,2
Řasy (médiu1)	15,6	25,6	47,8
Řasy (médiu2)	20,6	15,4	54,8
Řasy (médiu3)	23,7	26,3	34,8

Tabulka 3 Hodnoty povrchového napětí a jejich komponent interagujících povrchů vypočítané z hodnot kontaktních úhlů.

Typ povrchu	Povrchové napětí (mJ.m ⁻²)		
	γ_{LW}	γ_{AB}	γ_{tot}
Řasy (medium1)	31.0	21.3	52.4
Řasy (medium2)	25.2	31.1	56.4
Řasy (medium3)	25.9	31.1	57.7
Sklo	36.79	1.7	38.4
Sklo (APTES)	38.35	5.4	43.8
Polystyren (PS)	42,43	1.64	44,06

Na základě výpočtu bilancí volné energie v interagujících systémech je možné predikovat, zda v této soustavě dojde k termodynamicky stabilní adhezi či nikoli. Z výsledků je vidět, že změna složení média ovlivňuje předpokládanou stabilitu adheze buněk na pevné substráty. Největší stabilitu adheze budou mít zřejmě buňky narostlé za limitace zdroje železa. Nicméně kladné hodnoty celkové volné energie (ΔG_{tot}) pro některé systémy naznačují, že adheze

buněk bude z energetického hlediska málo výhodná. Energeticky nevýhodnou interakční bilanci buněk se sklem lze snadno posunout do negativních hodnot ΔG_{tot} bilancováním adheze řas např. na polystyren. Dle našich předpokladů nejvíce stabilní adheze lze očekávat v mediu 3 na povrch polystyrenu. Souhrnně lze říct, že bilancování mezifázových volných interakčních energií předpovídá energetickou bilanci kontaktu povrchů narůstající ve směru: vzájemná adheze buněk < řasy na sklo < řasy na sklo (APTES) < řasy na polystyren. Přičemž skutečně stabilní adhezi předpovídá pouze řasám na polystyrenu. Pomocí termodynamického modelu lze proto dosáhnout vhodné volby konstrukčních či imobilizačních materiálů proto daný cíl. Následně byla spolehlivost předpovědi na základě obou teorií (DLVO a termodynamické) ověřena pomocí adhezních testů.

Tabulka 3 Vypočtené hodnoty povrchového napětí buněk řas vypěstované v médiích o různém složení a hodnoty volné interakční energie pro interakci dvou buněk ve vodním prostředí a buňky s povrchem čistého skla, skla upraveným APTES, s polystyrenovým povrchem a teflonovým povrchem ve vodním prostředí.

Interagující systém	Volná interakční energie (mJ.m ⁻²)		
	ΔG^{LW}	ΔG^{AB}	ΔG^{tot}
<i>Medium1</i>			
Řasa-voda-řasa	-1.6	37.1	35.5
Řasa-voda-sklo	-3.1	25.5	22.3
Řasa-voda-sklo(APTES)	-2.75	24.3	21.6
Řasa-voda-polystyren	-3.3	-6.3	-9.6
<i>Medium2</i>			
Řasa-voda-řasa	-0.7	21.7	21.0
Řasa-voda-sklo	-1.6	18.4	16.8
Řasa-voda-sklo(APTES)	-1.8	17.7	15.9
Řasa-voda-polystyren	-2.2	-6.6	-8.7
<i>Medium3</i>			
Řasa-voda-řasa	-3.9	35.3	31.4
Řasa-voda-sklo	-3.9	24.3	20.4
Řasa-voda-sklo(APTES)	-4.3	22.3	18.0
Řasa-voda-polystyren	-5.2	-11.1	-16.3

Závěr

Výše uvedená metoda je dobře využitelná v problematice při určování energetické bilance mezi dvěma povrchy. Cílem tohoto výzkumu je identifikovat a kvantifikovat faktory prostředí, které by evokovaly adhezi řas na pevné povrchy určením povrchových vlastností (povrchové napětí, povrchový náboj) interagujících povrchů, tj. buňky a pevného povrchu. Pomocí termodynamického modelu lze dosáhnout vhodné volby konstrukčních či imobilizačních materiálů proto daný cíl.

Poděkování

Tento výzkum je podporován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky při projektu EUREKA (OE09025-ALGANOL) a MSM 6046137305.

Reference

- [1] Doušková, I.; Doucha, J.; Livansky, K.; Machat, J.; Novák, P.; Umysová, D.; Zachleder, V.; Vitová, M. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2009, 82(1), 179-185.
- [2] van Oss C.J. Hydrophobicity of biosurfaces – origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 1995, 5, 91-110.

Vliv povrchových vlastností řas a pevných povrchů na jejich vzájemnou interakci

Bittner M., Širmerová M., Maršálková B., Brányik T.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Byla zkoumána přilnavost buněk řas, pěstovaných za různých podmínek, k pevným povrchům (hydrolyzované sklo, APTES (3-aminopropyltriethoxysilan) sklo, polykarbonát, plexisklo). Buněčná populace řas byla pěstována ve čtyřech typech médií. Experimentálně byly určeny některé parametry povrchu pevných nosičů i buněk. Na základě těchto parametrů byly pomocí termodynamického přístupu, DLVO a XDLVO teorie vypočteny výsledné interakční energie pro systém buňka-nosič, pomocí nichž byly předpovězeny adhezní vlastnosti buněk řas na různé materiály. Význam fyzikálně-chemických vlastností povrchu buněk řas byl pak zhodnocen na základě porovnání předpokladů s výsledky adhezních testů.

Úvod

Řasy (algae) jsou z velké části jednobuněčné a z menší části i mnohobuněčné organismy. Jsou to většinou vodní organismy. Uskutečňují fotosyntézu a obsahují různé pigmenty, jako zelený chlorofyl a další pigmenty, které je zabarvují zeleně, žlutě, červeně a hnědě. Celkový počet druhů řas je odhadován až na 200000. Doposud byla rozpoznána ovšem jen část z tohoto odhadu a to asi 40000 druhů řas. Řasy jsou využívány v mnoha oblastech a to jak ve zdravé výživě, potravinářství, medicíně i při biodegradačních procesech.

Velký zájem na sebe strhla poslední dobou především skupina zelených řas *Chlorophytes*, které jsou velmi zajímavým objektem výzkumu především díky své schopnosti akumulovat mastné kyseliny, uhlovodíky a škrob. To jde ruku v ruce s produkcí biopaliv. Předpokládaná produkce biopaliva z 1 ha je mnohonásobně vyšší než u jiných plodin. Bylo rozpoznáno již více než 7000 druhů zelených řas rostoucích v mnoha různých prostředích.

Mikroskopické řasy jsou kultivovány ve fotobioreaktorech. Jedním z klíčových faktorů dobrého růstu řas ve fotobioreaktoru je dobrá distribuce světla v celém pracovním objemu reaktoru. Tento faktor je však negativně ovlivňován často pozorovaným jevem, adhezí řas na stěny fotobioreaktoru. Fyzikálně-chemické síly řídící adhezi byly studovány určením vlastností povrchu buněk a materiálů, ze kterých se skládá bioreaktor. Adheze může být však naopak žádoucím efektem a to v případech, kdy chceme mikroorganismus imobilizovat na nějaký vhodný nosič a využít například v kontinuálním čištění odpadních vod (Širmerová a kol., 2009).

Materiál a metody

Mikroorganismus

Populace fotosyntetizujících jednobuněčných mikroskopických řas *Chlorella vulgaris* kmen P12. Jedná se o sladkovodní řasu s vysokou specifickou růstovou rychlostí (okolo $0,25 \text{ h}^{-1}$ za optimálních podmínek) se schopností růstu i za vysokých koncentrací CO_2 . Kmen je sbírky číslo CCAP 211/1e, uložené ve sbírce kultur řas laboratoří botanického ústavu Akademie Věd ČR.

Podmínky vsádkové kultivace

Mikroskopické řasy byly pěstovány v 300ml kultivačního média ve skleněných válcích probublávaných směsí CO₂ (2% obj.) a O₂ (98% obj.). Válce byly umístěny v termostátované vodní lázni (30°C). Zdrojem elektromagnetického záření byly luminiscenční zářivky. Kompletní růstové médium, založené na elementárním složení biomasy řas bylo ve formě roztoku v destilované vodě při hodnotě pH 7 a mělo následující složení: 1100 mg.l⁻¹ (NH₂)₂CO, 237 mg.l⁻¹ KH₂PO₄, 204 mg.l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 40 mg.l⁻¹ C₁₀H₁₂O₈N₂NaFe (tuto sloučeninu neobsahuje médium označované „bez Fe“), 88 mg.l⁻¹ CaCl₂ (tuto sloučeninu neobsahuje médium označované „bez Ca“), mikroelementy: 0,83 mg.l⁻¹ H₃BO₃ (tyto sloučeniny neobsahuje médium označované „bez mikroel“), 0,95 mg.l⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 3,3 mg.l⁻¹ MnCl₂·4H₂O, 0,17 mg.l⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 2,7 mg.l⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 0,6 mg.l⁻¹ CoSO₄·7H₂O, 0,014 mg.l⁻¹ NH₄VO₃.

Stanovení průběhu růstu řas a výtěžnosti biomasy

Průběh růstové křivky a výtěžnost biomasy řasy *Chlorella vulgaris* byly určeny stanovením sušiny buněčné suspenze. Sušení probíhalo za standardních podmínek (3hod, 105 °C) tzv. do konstantní hmotnosti.

Měření povrchového napětí buněk a pevných nosičů

Měření kontaktních úhlů

Kontaktní úhly byly měřeny metodou přisedlé kapky (objem kapky 3±0,2 µl) na vrstvách buněk řas a povrchu pevných nosičů použitím aparatury k měření kontaktních úhlů (CAM200, KSV, Finsko). Měření bylo prováděno za 25°C pomocí tří kapalin: vody, formamidu a α-bromnaftalenu. Celkové povrchové napětí (γ^{tot}) a jeho komponenty (γ^{LW} , γ^+ , γ^- , γ^{AB}) a hodnoty volných energií interakcí mezi buňkou a nosičem ve vodě byly vypočítané podle teorie van Osse (van Oss, 1995).

Měření zeta potenciálu

Povrchový náboj buněk mikroskopických řas byl měřen přístrojem Zetasizer Nano-ZS (Particle Sizer, Malvern, UK) v 5mM KNO₃ (pH7). Povrchový náboj pevných nosičů (hydrolyzované sklo, APTES sklo, polykarbonát a plexisklo) byl měřen na přístroji SurPASS (Anton Paar, Austria) v 5mM KNO₃ (pH7).

Adhezní testy

Buněčná suspenze řas (15ml, 5g sušiny/l) byla nalita do petriho misky (průměr 12cm) s pevným nosičem (hydrolyzované sklo, sklo modifikované APTES, Polykarbonát, plexisklo) a byla míchána na třepačce po dobu 1 hod při 75 otáček/min. Následně byly jednotlivé materiály dvakrát promyty ve 25 ml roztoku KCl (5mM) mícháním na třepačce po dobu 2 min při rychlosti 75 otáček/min. Procento osídlení plochy nosiče buňkami řas bylo změřeno obrazovou analýzou na fluorescenčním mikroskopu (Olympus BX51, Canon PowerShot A620) a vyhodnoceno pomocí softwaru (NIS-Elements AR3.0).

Měření velikosti buněk

Velikost buněk mikroskopických řas *Chlorella vulgaris* byla měřena pomocí obrazové analýzy. K tomuto účelu byl využit mikroskop, který je propojen s digitálním fotoaparátem (Olympus BX51, Nikon Eclipse E400). Fotografie byly posléze vyhodnocovány pomocí softwaru LUCIA (Laboratory Imaging s.r.o., Czech Republic).

Výpočet interakčních energií

Předpoklad adheze podle Termodynamického modelu

Umožňuje vypočítat hodnoty potenciální interakční energie v místě kontaktu buňky s nosičem ($0,158 \pm 0,009$ nm) na základě rovnováhy mezifázových volných energií a tím předpovědět, zda fyzikálně-chemické vlastnosti povrchů povedou ke stabilní adhezi či nikoliv. Mezifázové volné energie nejsou většinou známy, ale jejich rozdíl je možno vyjádřit z Youngovy rovnice pomocí známých veličin povrchového napětí a z měřitelných hodnot kontaktních úhlů různých kapalin na povrchu vrstvy buněk. Pro výpočet volné interakční energie povrchu nosiče a povrchu buňky ve vodním prostředí je nezbytné znát komponenty povrchového napětí interagujících částic (γ^{LW} , γ^+ , γ^-). K jejich výpočtu slouží tzv. rozšířená Youngova rovnice (Van Oss C.J., 1995), kterou lze řešit jako soustavu rovnic pro tři kapaliny (z toho dvě polární) se známým povrchovým napětí a úhlem smáčení (θ), který vytvářejí a povrchu buněk, nebo nosiče.

Předpoklad adheze podle DLVO teorie

Klasická DLVO teorie umožňuje výpočet interakčních energií dvou přibližujících se a na sebe působících povrchů. Zahrnuje působení nespecifických fyzikálněchemických sil (disperzní, elektrostatické interakce). Hodnoty vstupující do výpočtu získané experimentálně jsou zeta potenciál buněk a nosičů, průměr buněk, iontová síla prostředí.

Předpoklad adheze podle rozšířené DLVO teorie

Rozšířená DLVO teorie spojuje termodynamický přístup a DLVO teorii. Zahrnuje v sobě interakce na krátké vzdálenosti i interakce na „delší“ vzdálenosti. Obsahuje kromě klasických van der Waalsových a elektrostatických interakcí i interakce acidobazické, které popisují hydrofobitu/hydrofylitu.

Výsledky a diskuze**Ověření předpokladů adhezními testy**

Matematické modely použité k předpovědi adheze buněk řas na pevné nosiče předpovídají vzájemné ovlivňování povrchů těchto systému, které je založené na fyzikálněchemických vlastnostech interagujících povrchů. Jelikož všechny matematické modely vycházejí ze zjednodušujících předpokladů, jejich platnost lze ověřit pouze experimentálně a to adhezním testem. Testy použité v této práci ukázaly, že buňky řas kolonizují v největší míře sklo modifikované 3-aminopropyltriethoxysilanem (APTES sklo) a v nejmenší míře plexisklo a to v případě všech testovaných médií.

Tab. I. Hodnoty procentuálního osídlení plochy jednotlivých nosičů buňkami řas pěstovaných za různých podmínek.

osídlená plocha %	Materiál			
médium	hydrosklo	APTES	plexisklo	polykarbonát
kompletní	0,14%	0,33%	0,18%	0,09%
bez Ca	0,07%	4,10%	0,01%	2,38%
bez Fe	2,19%	5,36%	0,04%	1,02%
bez mikroel.	0,62%	1,96%	0,42%	1,24%

Předpověď adheze mikroorganismů na základě termodynamického modelu

Soudržnost interagujícího systému buňka-nosič ve vodním prostředí z hlediska volné energie je výhodná, když rozdíl Gibbsovy energie adheze (ΔG_{TOT}) je záporný a naopak (Bos a kol., 1999). Výsledky této práce naznačují, že z energetického hlediska nejstabilnější adhezi lze

očekávat v případě interakce polykarbonátu a buněk kultivovaných na médiu bez mikroelementů (Tab. II). Na základě termodynamického přístupu (průměrné hodnoty ΔG_{TOT}) lze seřadit nosiče podle jejich ochoty poskytovat stabilní adhezi buněk následovně: polykarbonát > plexisko > APTES > hydrosklo.

Při srovnání výsledků volných mezifázových energií jsme zjistili, že u všech typů nosičů složení jednotlivých médií s výjimkou média bez mikroelementů, nemá vliv na výslednou volnou Gibbsovu energii interakcí. Termodynamický model předpovídá u buněk kultivovaných v médiu bez mikroelementů nejsilnější vazbu na všechny typy nosičů.

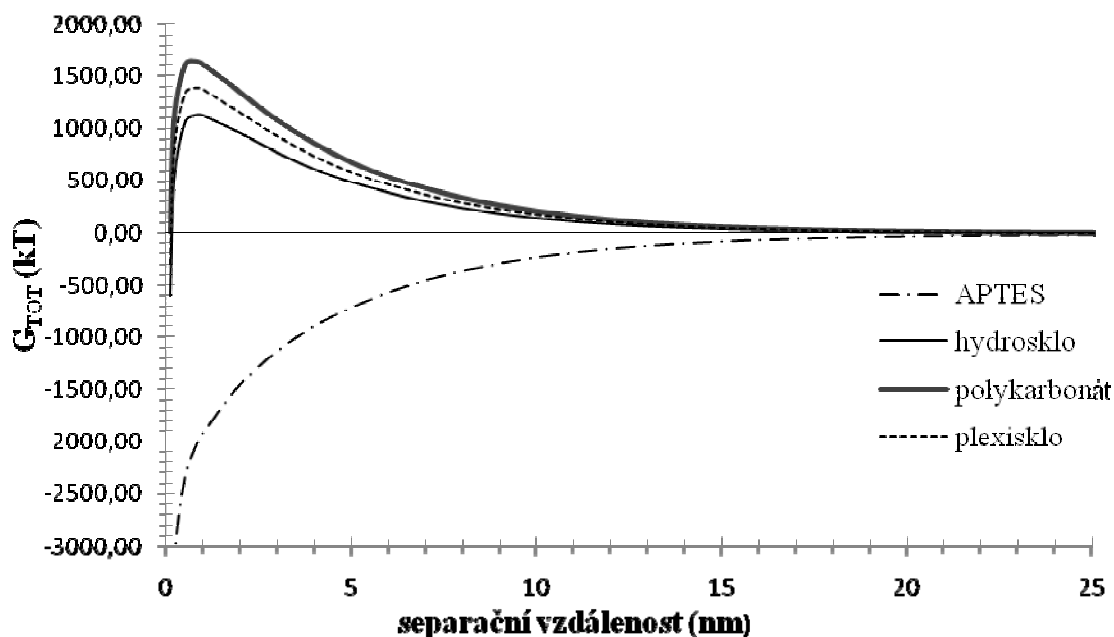
Tab. II. Hodnoty volné interakční energie mezi řasami a nosičem (polykarbonát) ve vodě (Chlorella-voda-nosič) vypočítané z termodynamického modelu.

Polykarbonát	Gibbsova volná interakční energie (mJ m^{-2}) cws			
	médium	ΔG_{TOT}	ΔG_{LW}	ΔG_{AB}
nosič-voda-buňka	komplet	-4,42	-4,31	-0,11
	bez Ca	-4,87	-4,35	-0,52
	bez Fe	-5,27	-4,70	-0,56
	bez mikroel.	-25,08	-6,09	-18,99

Předpověď adheze buněk mikroskopických řas na základě DLVO teorie

Výsledky předpovědi adheze pomocí DLVO teorie ukazují, že za podmínek kultivace v kompletním médiu (iontová síla 5mM) nelze očekávat adhezi buněk na hydrolyzované sklo, polykarbonát a plexisklo (Obr. 1). Tento jev je způsoben vysokou energetickou bariérou (pozitivní hodnoty G_{TOT}) v separační vzdálenosti nižší než 15 nm. To znamená, že za reálných kultivačních podmínek bude blízký kontakt buňky a hydrofilního skla, polykarbonátu popř. plexiskla (např. stěna fotobioreaktoru) nepravděpodobný kvůli odpudivým elektrostatickým silám. Naopak v případě skla modifikovaného APTES (3-aminopropyltriethoxysilan) a buněk řas je DLVO teorií předpovídan volný kontakt buněk s nosičem, bez přítomnosti omezujících odpudivých sil, díky záporným hodnotám G_{TOT} (Obr. 1). Tato záporná interakční energie mezi APTES sklem (pozitivní povrchový náboj) a mikrobiální řasou (negativní povrchový náboj) vzniká zejména z důvodů opačného povrchového náboje a tím generované elektrostatické přitažlivosti.

Klasická DLVO teorie sice není schopna predikovat, nakolik bude adheze buněk k povrchům stabilní, ale její výsledky naznačují, že buňkám narostlým na kompletním médiu nebudou odpudivé elektrostatické síly bránit v kolizi s nosičem APTES. Stejných výsledků (absence energetické bariéry pouze v případě APTES skla) bylo dosaženo i v případě buněk kultivovaných na médiích s absencí některé jiné složky (bez Ca^{2+} a Fe^{3+}).



Obr. 1: Závislost celkové interakční energie na separační vzdálenosti mezi buňkou (populace řas pěstovaných v kompletním médiu) a nosičem (APTES sklo, hydrolyzované sklo, polykarbonát, plexisklo) vypočítaná na základě DLVO teorie.

V této práci bylo použito médium s nízkou iontovou silou a proto shoda mezi předpovědí DLVO teorie o nejochoťnější adhezi buněk na APTES sklo (Obr. 1) a výsledky adhezních testů (Tab. I) je potvrzením platnosti tohoto matematického modelu za podmínek experimentu. Nesoulad mezi teorií a experimenty v případě dalších povrchů lze vysvětlit zejména menší reprodukovatelností adhezních testů, nebo zanedbáním acidobazických interakcí v klasické DLVO teorii (van Oss, 1995).

Předpověď adheze buněk mikroskopických řas na základě rozšířené DLVO teorie

Rozšířenou DLVO (XDLVO) teorii lze považovat za kombinaci termodynamického přístupu k adhezi a klasické DLVO teorie.

Výsledky modelování pomocí XDLVO teorie poskytují, stejně jako DLVO teorie, závislost celkové interakční energie (G_{TOT}) na separační vzdálenosti mezi povrchy, jež se zúčastňují vzájemné interakce. Jedním z povrchů je buněčný, druhým je inertní povrch pevného nosiče.

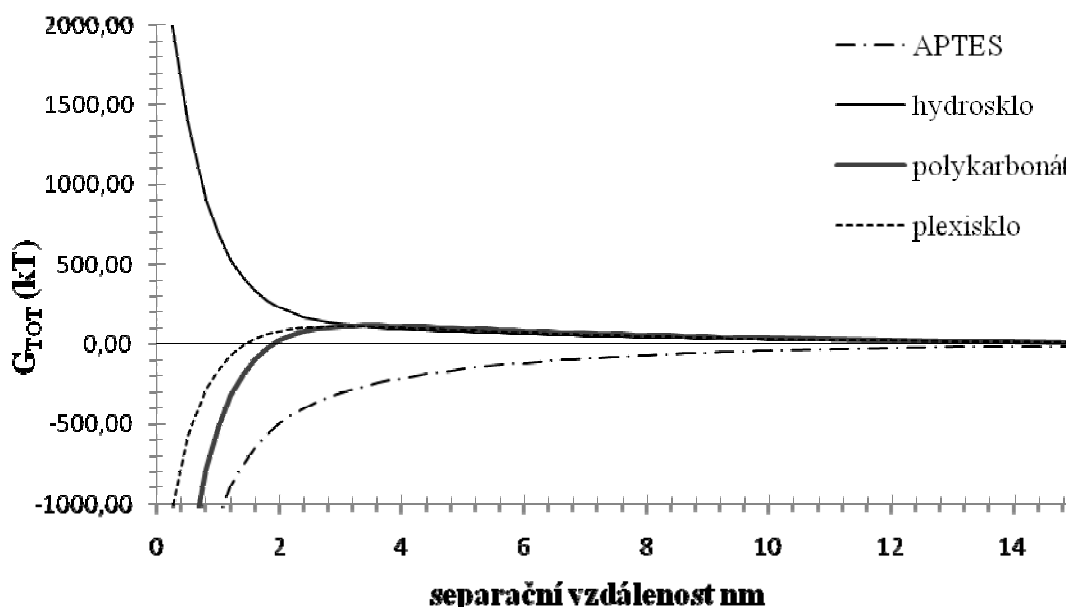
Srovnáním vlivu kultivačního média na předpověď buněčné adheze podle XDLVO teorie zjistíme, že nejvýraznější vliv má nepřítomnost mikroelementů v průběhu růstu jednobuněčných řas (Obr. 2). Stejný výsledek se zrcadlí i v hodnotách volné interakční energie (ΔG_{TOT}) termodynamických výpočtů pro buňky narostlé bez mikroelementů (Tab. II). Vliv přítomnosti, nebo absence vápenatých a železitých iontů na povrchové vlastnosti resp. předpověď interakce buněk z těchto kultur je nepatrný.

Vliv charakteru nosiče na předpověď adheze pomocí XDLVO teorie je markantnější. Povrchové vlastnosti čtyř studovaných materiálů se výrazně liší: hydrolyzované sklo (hydrosklo) je hydrofilní a má negativní povrchový náboj, sklo modifikované 3-aminopropyltriethoxysilanem (APTES) má pozitivní náboj a je hydrofobnější, polykarbonát a plexisklo jsou hodně hydrofobní a mají značně negativní povrchový náboj. Tato variabilita se zrcadlí i v předpovědi jejich interakce s buňkou ve vodním prostředí. Co se týče skla s pozitivním povrchovým nábojem (APTES) je podle XDLVO teorie adheze všech kultivovaných buněk na něj vysoce pravděpodobná (negativní G_{TOT} , Obr. 2). Opačným

extrémem je hydrofilní sklo (negativní zeta potenciál), které by podle XDLVO teorie nemělo být kolonizované jednobuněčnými řasami (pozitivní G_{TOT} , Obr. 2). Adheze buněk na polymerní materiály (polykarbonát a plexisklo) také není podle XDLVO teorie příliš pravděpodobná, jelikož v rozmezí separačních vzdáleností 2 až 4 nm se u všech růstových médií nachází energetická bariéra s maximem přibližně 100 kT. K přímé kolizi buňky s takovým povrchem může dojít po překonání energetické bariéry.

Z výsledků je patrné, že materiál (zejména povrchový náboj) má výrazně větší vliv na průběh interakce podle XDLVO teorie, než má složení kultivačního média v testovaném rozsahu.

Konfrontací předpovědí z matematického modelu XDLVO (Obr. 2) s reálnými experimenty buněčné adheze (Tab I.) lze stejně jako v případě DLVO teorie říct, že model správně předpověděl nejvyšší míru adheze buněk z jednotlivých typů média na APTES sklo. Rovněž nízký stupeň kolonizace plexiskla (s nejvyšší hodnotou pro buňky narostlé bez mikroelementů) byl očekáván na základě XDLVO modelu. V případě hydrolyzovaného skla (hydrosklo) i polykarbonátu jsou výsledky některých adhezních testů (hydrosklo vs. buňky bez Fe, polykarbonát vs. buňky bez Ca, Tab I.) nečekané a odporují teoretické předpovědi, ale jsou nejspíš výsledkem experimentální chyby. Adhezní testy budou muset být opakovány za optimalizovaných podmínek.



Obr. 18: Závislost celkové interakční energie na separační vzdálenosti mezi buňkou (populace řas pěstovaných v médiu bez mikroelementů) a nosičem (APTES sklo, hydrolyzované sklo, polykarbonát, plexisklo) vypočítaná na základě XDLVO teorie.

Dalším možným zdrojem nesouladu mezi teorií a experimenty může být skutečnost, že klasická i rozšířená DLVO teorie pro koloidní systémy vychází z předpokladu, že k interakcím dochází mezi dokonale hladkými, rigidními a co do povrchových vlastností homogenními částicemi. V reálném světě, a zejména v případě adheze buněk, ovšem tyto počáteční podmínky neplatí, což v mnoha případech omezuje platnost těchto modelů.

Závěr

Ke zhodnocení fyzikálně-chemické povahy adheze mikroskopické zelené řasy *Chlorella vulgaris*, pěstované v různých typech médií (kompletní, bez Ca, bez Fe a bez mikroelementů) k pevným nosičům (hydrolyzované sklo, sklo modifikované 3-aminopropyltriethoxysilanem

(APTES), polykarbonát a plexisklo) byly využity tři přístupy výpočtu interakčních energií. Termodynamický model, DLVO teorie a XDLVO teorie.

Obecně lze říci, že soulad resp. nesoulad mezi předpovědí buněčné adheze na základě modelů, majících různě zjednodušující předpoklady, a reálnou adhezí pomáhá pochopit řídicí děje buněčné interakce s pevnými substráty. Správnou identifikací nejdůležitějších faktorů adheze mikroorganismů, v našem případě řas, můžeme tomuto jevu správným zásahem předejít (stěny fotobioreaktorů), nebo ho naopak vyvolat (imobilizace, separace flokulací atd.).

Při posuzování teoretických přístupů k předpovědi adheze mikroorganismů je nezbytné si uvědomit, že tyto teorie pracují s řadou zjednodušujících předpokladů, přesto tyto modely pomáhají pochopit řídicí děje buněčné interakce s pevnými substráty. Tento fakt nám může být nápomocen v řízení adheze zkoumaného mikroorganismu na různé nosiče.

Reference

Bos R., van der Mei H.C., Busscher H.J. (1999) Physico-chemistry of Initial Microbial Adhesive Interaction – its Mechanism and Methods for Study, FEMS Microbiology Reviews, 23, str. 179-230.

Širmerová M, Lopes F, Doušková I, Brányik T. (2009) Adhesion of microalgae to glass – optimization of cell surface tension measurement, 36th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, 195:1-5, CD-ROM.

Van Oss C.J. (1995) Hydrophobicity of Biosurfaces – Origin, Quantitative Determination and Interaction Energies, Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 5, 91-110.

Mikrobiální degradace nitrofenolových sloučenin

Vaněk T., Hudcová T., Páca J., Halecký M.

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Práce se zabývá aerobní biodegradací mononitrofenolů (MNF), 2,4-dinitrofenolu (2,4-DNF) a fenolu a jejich směsí ve vodném prostředí v submersním batch uspořádání a v náplňových kontinuálních reaktorech, směsnou mikrobiální populací původně adaptovanou k degradaci 2,4-DNT, která byla v průběhu prací identifikována. Během experimentů v kontinuálních reaktorech byly sledovány účinnosti (RE) a rychlosti degradace (q) jednotlivých NF a fenolu v závislosti na celkové zátěži a na způsobu provedení změny zátěže. Současně bylo sledováno uvolňování NO_2^- iontů do média během degradace NF a vliv kosubstrátů na degradaci NF a fenolu. Reaktor A1 byl zatěžován 2,4-DNF snižováním HRT v reaktoru. Reaktor A2 byl zatěžován změnou vstupní koncentrace 2,4-DNF. V reaktoru A3 byl sledován vliv jednotlivých MNF, 2,4-DNF a fenolu na RE a q ve směsi. Byl testován vliv 2,4-DNF v médiu na degradaci MNF. Následně byl v reaktoru A3 sledován vliv 4-NF na účinnost degradace fenolu změnou vstupních koncentrací polutantů.