



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2014

11. seminář

Pivovarství a kvasné technologie 2014

5. seminář

Environmentální biotechnologie 2014

Ústav biotechnologie

3. a 4. dubna 2014

věnováno památce Ing. Jana Pošty





**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Sborník souhrnů a plných textů příspěvků

Konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2014

11. seminář

Pivovarství a kvasné technologie 2014

5. seminář

Environmentální biotechnologie 2014

Ústav biotechnologie

3. a 4. dubna 2014

Pořádající instituce:

Ústav biotechnologie

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

Odborná skupina Kvasná chemie a biotechnologie
Česká společnost chemická

Sponzoři a spolupracující společnosti:

Denwel EU, s.r.o.
ROCHE, s.r.o.

Budějovický Budvar, n.p.
Heineken Česká republika, a.s.
Měšťanský pivovar v Poličce, a.s.
Pivovary Lobkowicz, a.s.
Pivovary Staropramen s.r.o.
Plzeňský Prazdroj, a.s.
PRIMÁTOR, a.s.

Přípravný a organizační výbor:

Předseda: Ing. Jaromír Fiala, Ph.D., e-mail: jaromir.fiala@vscht.cz
Členové: Ing. Olga Schreiberová, Ph.D.
Rudolf Jung
Natálie Patakiová

Editor: Jaromír Fiala

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

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014

ISBN 978-80-7080-884-9

Program konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2014

11. seminář – Pivovarství a kvasné technologie 2014

5. seminář - Environmentální biotechnologie 2014

Čtvrtek 3. dubna 2014

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 sál B+C

9:00 – 9:10 Fiala J., Schreiberová O.: **Zahájení konference**

9:10 – 9:30 Basařová G.:
Jak vznikl fenomén České pivo a jeho vlastnosti

9:30 – 9:40 Kvasničková E., Schreiberová O., Masák J.:
Vliv přírodních látek na adhezivní schopnosti mikroorganismů a eradikaci existujících biofilmů

9:40 – 9:50 Poštulková M., Růžička M., Brányik T.:
Studium základního mechanismu přepěňování piva

9:50 – 10:00 Kolek J., Patáková P.:
Genové modifikace bakterií rodu *Clostridium* vedoucí ke zvýšení produkce biobutanolu

10:00 – 10:10 Ježdík R., Masák J.:
Charakterizace rhamnolipidových směsí

10:10 – 10:20 Cejnar R., Hložková K., Kotrba P., Jelínek L., Dostálek P.:
Modifikace buněčné stěny kvasinky s cílem zvýšení koloidní stability piva

10:20 – 10:30 Pádrová K., Čejková A.:
Nanočástice a jejich schopnost stimulace buněčného růstu

10:30 – 10:40 Hudcová T., Skoupá H., Patáková P., Dostálek P.:
Biotransformační příprava estrogenně aktivního 8-prenylnaringenu

10:40 – 11:00 **Přestávka**

11:00 – 11:10	Raschmanová H., Branská B., Paulová L.: Vliv kultivačních podmínek na produkci a sekreci fúzního proteinu trypsinogen-GFP kvasinkou <i>Pichia pastoris</i>
11:10 – 11:20	Hozová G., Šusteková J., Wimmer Z.: Betulinová kyselina a její deriváty
11:20 – 11:30	Řezanina J., Poštulková M., Dostálek P.: Využití <i>Pythium oligandrum</i> jako biofungicidu ve sladařství
11:30 – 11:40	Podolová N., Bittner M., Brányik T.: Srovnání modelové predikce a skutečné adheze anaerobních bakterií kazících pivo na pevné substráty
11:40 – 11:50	Koukalová M., Ježdík R., Jirků V.: Prostředky modulace biodegradativní funkce
11:50 – 12:00	Boledovičová P., Strejc J., Kyselová L.: Izolace a povrchové vlastnosti spor termofilních bakterií vyskytujících se jako kontaminanty v potravinářském průmyslu
12:00 – 12:10	Majdáková M., Schreiberová O., Čejková A.: Přírodní látky jako nástroj regulující tvorbu biofilmu
12:10 – 12:20	Kotůčová S., Paulová L., Rychtera M.: Optimalizace kyselé předúpravy lignocelulosových materiálů pro biotechnologické využití
12:20 – 12:30	Rádllová K., Karlová P., Páca J.: Interakce fenolických polutantů v průběhu mikrobiální degradace jejich směsí
12:30 – 12:40	Sitník I., Kolek J., Patáková P.: Produkce kyseliny jantarové bakterií <i>Basfia succiniciproducens</i>
12:40 – 14:00	Přestávka na oběd

14:00 – 14:10	Kubáňová Z., Lovecká P., Spiwok V.: Biologická aktivita a struktura syntetických antimikrobiálních peptidů
14:10 – 14:20	Petrichsheva A., Novotná M., Dostálek P.: Rychlé stanovení methanolu v lihovinách
14:20 – 14:30	Chrástná J., Jelínek L., Karabín M.: Stanovení terpenických látek v pivu a pivovarských surovinách
14:30 – 14:40	Ivanišová M., Kotlíková B., Dostálek P.: Možnosti využití netradičních metod pro zvýšení stability piva
14:40 – 14:50	Bílek J., Vaněk T., Halecký M.: Biofiltrace směsi par styren/aceton v probublávaném reaktoru
14:50 – 15:00	Krmenčíková N., Poštulková M., Karabín M.: Sledování obsahu deoxynivalenolu v průběhu výroby sladu
15:00 – 15:10	Janoušková M., Papoušková T., Kvasničková E., Schreiberová O.: Vliv biologicky aktivních látek na adhezivní vlastnosti obalových vrstev mikroorganismů
15:10 – 15:20	Tůmová T., Kotlíková B., Dostálek P.: Zvýšení trvanlivosti nefiltrovaného piva
15:20 – 15:30	Zítková K., Poštulková M., Růžička M., Brányik T.: Testování nové metody kvantifikace přepěňování piva v tlakové koloně
15:30 – 15:40	Pacáková Z., Patáková P., Rychtera M.: Studium podmínek kultivace bakterie <i>Actinobacillus succinogenes</i>
15:40 – 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

Pátek 4. dubna 2014

- Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha - budova A, Technická 5,
Praha 6, 1. patro - č.dv. 111

Možnost návštěvy vybraných laboratoří a technologické haly ÚB
- Sraz účastníků 11:00 hodin před knihovnou ÚB

**Souhrny
a plné texty příspěvků**

Vliv přírodních látek na adhezivní schopnosti mikroorganismů a eradikaci existujících biofilmů

Kvasničková E., Schreiberová O., Masák J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

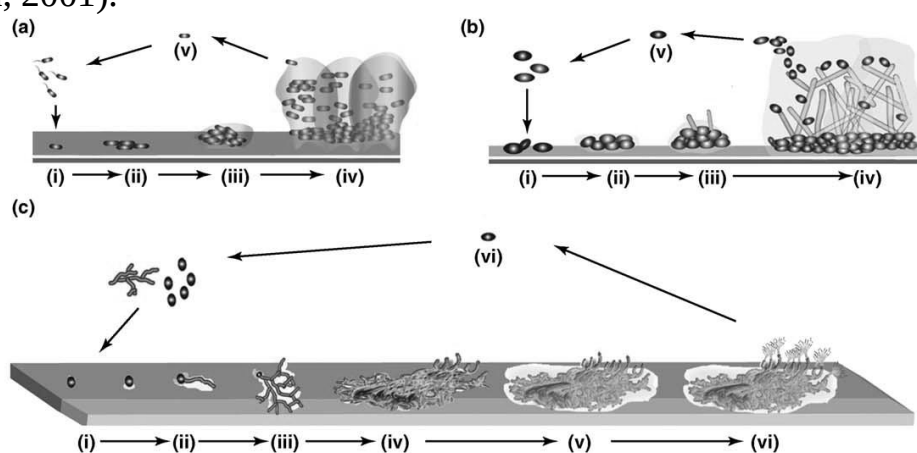
Úvod

V roce 1978 se doktor R. J. Gibbons poprvé zmínil ve své publikaci, týkající se tvorby glykokalyxu na zubní sklovině mutantními kmeny z rodu *Streptococcus*, o klinickém významu uskupení, které dnes považujeme za biofilm (Gibbons, Qureshi, 1978). Zájem o studium tvorby a významu bakteriálního biofilmu díky tomuto příspěvku prudce vzrostl. Přestože se poměrně záhy podařilo objasnit mechanismy vzniku této přisedlé formy mikroorganismů, mnoho zásadních otázek zůstává doposud nezodpovězeno (Jefferson, 2004).

Biofilm

Obecně je za biofilm považováno společenství mikroorganismů nevratně přichycené k cizímu povrchu, rozhraní či k sobě navzájem, které je obaleno v extracelulární polymerní matrix (Stoodley a kol., 1997). Přichycení k povrchu je účinným prostředkem k přetrvání v příznivém prostředí, oproti volně žijícím buňkám, které mohou být snadno odplaveny do míst s horšími okolními podmínkami (Watnick, Kolter, 2000). Struktura biofilmu je heterogenní v prostoru i v čase. Neustále se mění, protože ji ovlivňují interní procesy i změna podmínek v okolí samotného biofilmu. Obsahuje mikrokolonie bakteriálních buněk zapouzdřené v EPS matrix, oddělené od ostatních mikrokolonií intersticiálními (vmezeřenými) vodními kanálky. Tyto kanálky umožňují difuzi živin, kyslíku a dokonce i antimikrobiálních látek k buňkám v celém společenství. Struktura biofilmu může být značně ovlivněna mikroorganismem či skupinou několika mikroorganismů, které jej tvoří. Čisté kultury vytvářejí biofilm tenčí, zatímco polymikrobiální biofilmy vytváří na povrchu silnější vrstvu. Může to být způsobeno například vzájemným zvyšováním stability mikroorganismů mezi sebou, a následně vznikem pevnější a komplexnější struktury biofilmu (Donlan, 2002). Genetické studie jednodruhových biofilmů ukázaly, že jsou tvořeny sledem několika po sobě následujících kroků (Obr. 1), během nichž dochází k intenzivní mezibuněčné komunikaci. Na úrovni genové transkripce byly mezi buňkami vázanými v biofilmu a volně žijícími buňkami zjištěny výrazné rozdíly. Z tohoto důvodu může být tvorba biofilmu chápána jako postupně se vyvíjející evoluční proces (Watnick, Kolter, 2000). Prvním krokem při tvorbě biofilmu je přichycení planktonní buňky k povrchu. Pro správné pochopení tohoto kroku je nutné dobře znát povrch buňky i materiál, na který bude buňka adherovat. Obecně lze říct, že hrubé hydrofobní povrchy vytváří nejlepší podmínky pro vznik biofilmu

(přestože existují výjimky). V případě, že k tvorbě biofilmu dochází v tekutém prostředí, může složení dané kapaliny výrazně ovlivnit vlastnosti povrchu, na který se buňky adherují. Na povrchu buňky je v ohledu zvýšení přilnavosti zajímavá především přítomnost bičíků, pilusů, fimrií nebo glykokalyxu (ochranný plášť tvořený oligosacharidy, přítomný pouze u některých buněk). Tyto orgány umožňují buňkám snáze překonat odpudivost jednotlivých materiálů a tak lépe přisednou k danému povrchu. Po přichycení buněk na povrch se buňky začnou množit a tím vznikají tzv. mikrokolonie. Produktem tohoto uskupení jsou extracelulární polymerní látky (EPS), které jsou primárně složeny z polysacharidů (lze je detekovat mikroskopicky či chemickou analýzou). EPS poskytnou okolní matrix a vytváří strukturu biofilmu, obsahují až 98% vody a jsou pevně vázány k podkladu, na kterém je biofilm vytvořen (Donlan, 2001).



TRENDS in Microbiology

Obr. 1 Vývoj bakteriálního, kvasinkového biofilmu a biofilmu tvořeného vláknitými houbami (Hardigan a kol., 2009); tvorba (a) bakteriálního biofilmu a (b) biofilmu *Candida albicans* sestává z pěti základních kroků: i – adsorpce, ii – adheze, iii – tvorba mikrokolonie, iv – zralý biofilm, v – disperze buněk, oproti tomu (c) biofilm vláknitých hub vzniká následujícími kroky: i – adsorpce, ii – aktivní přichycení, iii – mikrokolonie I (jednovrstvá), iv – mikrokolonie II (vývoj mycelia, růst a splétání hyf), v – vývoj zralého biofilmu, vi – disperzní nebo planktonická fáze

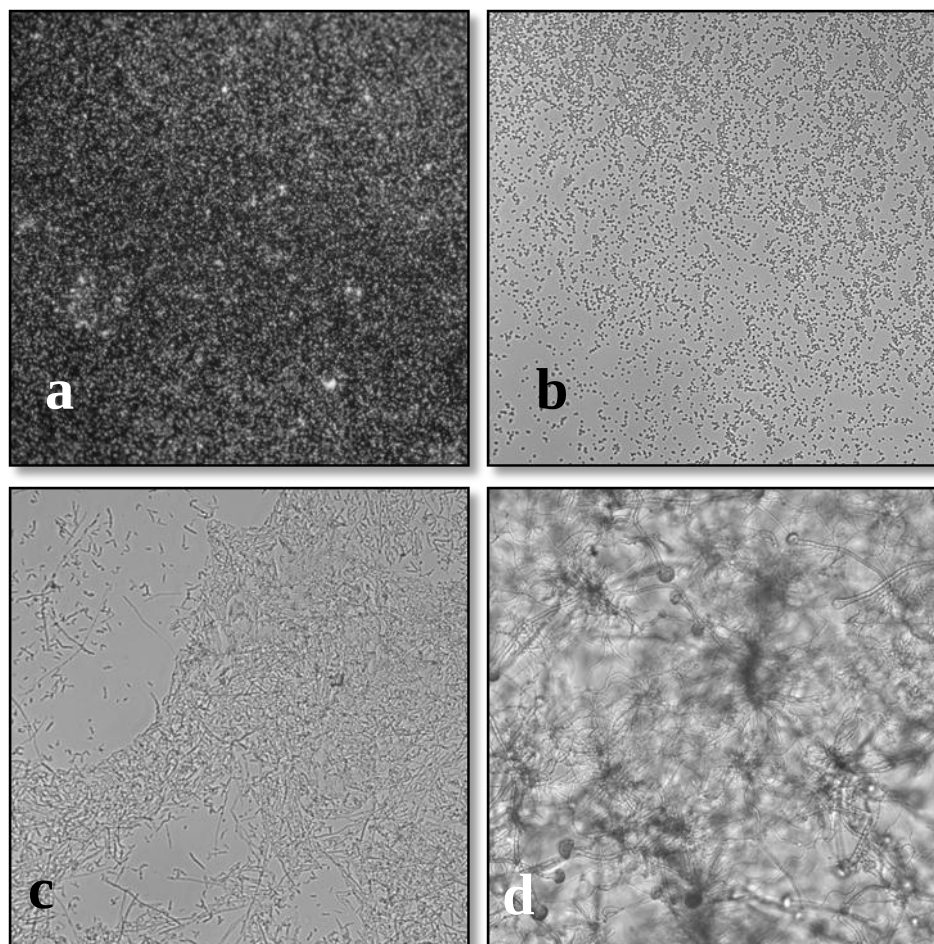
Mikroorganismy žijící ve volné přírodě velmi často přežívají ve formě biofilmu. Přichyceny k povrchu vytváří společenství, které přináší lepší podmínky pro snazší průběh jejich životního cyklu. V přirozeném prostředí je biofilm téměř vždy tvořen více mikrobiálními druhy s propracovanou organizační strukturou (Watnick, Kolter, 2000). Mikrobiální biofilmy jsou schopny kolonizovat například fermentory v potravinářském průmyslu, potrubí ropných vrtů, vodní potrubí, trupy lodí, lékařské nástroje, kloubní implantáty a mnoho dalších. Jejich přítomnost se obvykle rozděluje na pozitivní a negativní (Reid, 1999). Pozitivní úlohu má biofilm, pokud je využíván pro přirozenou imobilizaci produkčních mikroorganismů pro produkci primárních a sekundárních metabolitů nebo při

čištění odpadních vod a bioremediacích. Naopak negativních vlivy jsou zdrojem mnoha nepříjemných komplikací, především v oblasti medicíny. Mikroorganismy ve formě biofilmů často kontaminují biomedicínská a průmyslová zařízení a způsobují okolo 60 % nozokomiálních infekcí (vzniklých v souvislosti s hospitalizací pacienta), jako jsou například infekce protéz či katetrů (Thebault a kol., 2013). Existují dvě možnosti boje proti biofilmu. První z nich je preventivní - zabránění mikrobiální adheze na příslušný materiál a tím i předejití tvorby samotného biofilmu. Druhou možností je eradikace již vytvořeného mikrobiálního biofilmu. Prevence tvorby biofilmu na příslušném materiálu spočívá buď v totálním předejití či redukci jeho vzniku použitím antiadhezivního či antimikrobiálního povrchu. Tím se buď zabrání ulpívání bakterií na povrchu, nebo jsou zničeny veškeré buňky, které vstoupí do kontaktu s povrchem. V případě přípravy antiadhezivních materiálů lze upravovat drsnost povrchu pomocí fyzikální modifikace, změnou povrchové energie nebo imobilizací antiadhezivních látek jako jsou poly(ethylenglykol) nebo polysacharidy. Pro tvorbu biocidního povrchu lze použít imobilizaci antibiotik inkorporací či kovalentní vazbou přímo k povrchu. Často je také používán kvartérní dusík či stříbro. Dobrou prevencí je poctivé a pravidelné čištění pracovních nástrojů, rukou a veškerého vybavení, ovšem dezinfekční prostředky mohou být toxické a navíc jejich velká spotřeba značně zvyšuje náklady celého procesu. Bylo prokázáno, že použití měděných nástrojů snižuje mnohonásobně riziko kontaminace. Měď je všeobecně známa svými antibakteriálními vlastnostmi. Eradikace biofilmu je obtížná, protože přisedlé mikroorganismy jsou výrazně odolnější vůči antibiotikům (oproti planktonickým buňkám až 1000x), biocidům a hydrodynamickým střízným silám. Zvyšováním koncentrace antibiotik dochází postupně k multirezistenci mikroorganismů a neprospívá to životnímu prostředí. Je možné odstraňovat biofilm mechanicky třením nebo enzymaticky například použitím enzymu dispersinu B. Celkově je ale lepší rozvíjet preventivní techniky, než odstraňovat již vzniklou infekci (Thebault a kol., 2013).

Příklady mikrobiálních biofilmů

Mezi oportunně pathogenní mikroorganismy, způsobují onemocnění především u imunodeficientních pacientů patří vybraní zástupci: 1) gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* - způsobuje závažné nozokomiální infekce, folikulitidu či syndrom „horkých nohou“, septickou artritidu, zánět vnějšího ucha, infekce popálenin a další (Kerr a Snelling, 2009), 2) kvasinka *Candida parapsilosis* - lidský patogen, jedná se o typického komenzála lidské kůže, který je častou příčinou například vzniku kandidémie (Gácsér a kol., 2007), 3) kvasinka vytvářející pseudomycelium *Trichosporon cutaneum* - může způsobovat šíření životu nebezpečných infekcí, které souvisejí s lékařskými implantáty zavedenými do těla včetně katetrů, prsních implantátů a srdečních transplantátů (Ramage a kol., 2009) a 4) plíseň *Aspergillus fumigatus* - negativní

působení této houby bylo prokázáno v případě osídlení různých biomateriálů související s infekcí například kloubních náhrad, katetrů, srdečních chlopní, srdečních kardiostimulátorů nebo prsních implantátů (Maiorana a kol., 2013).



Obr. 2 Příklady mikrobiálních biofilmů; **a** – biofilm *Pseudomonas aeruginosa* na titanovém žetonu, fluoresceční barvení SYTO13, zvětšeno 400x, **b** – biofilm *Candida parapsilosis* na polystyrenovém povrchu, foceno Cellavista, objektiv zvětšení 20x, **c** – biofilm *Trichosporon cutaneum* na polystyrenovém povrchu, foceno Cellavista, objektiv zvětšení 20x, **d** – biofilm *Aspergillus fumigatus* na polystyrenovém povrchu, foceno Cellavista, objektiv zvětšení 20x

Vliv přírodních látek

Přírodní produkty jsou také velmi slibné pro působení proti biofilmu, protože vykazují širokou škálu antimikrobního působení při nízkých koncentracích a nepodporují vznik bakteriální rezistence (Thebault a kol., 2013). Mohou mít vliv na různé fyziologické a morfologické vlastnosti buněk a na fyzikálně chemické vlastnosti buněčných struktur včetně EPS matrix. Díky tomu mohou ovlivňovat vznik nebo zničení již vytvořeného biofilmu. Vhodné přírodní produkty byly nalezeny především u mikroorganismů a rostlin. Byla

publikována řada látek izolovaných z rostlin (polyfenoly, terpenické látky a další), které potlačují mikrobiální adhezi. Mnoho polyfenolů izolovaných ze zeleného čaje nebo ovoce, jako jsou brusinky, maliny, ostružiny a jahody jsou antagonisty acetylovaných homoserinových laktonů (třída signálních molekul zapojených do bakteriálních quorum sensing) v mikroorganismech. Také kofein byl zjištěn jako inhibitor quorum sensing. Dalšími látkami potlačujícími biofilmové infekce jsou některé flavonoidy (například naringenin, kaempferol, kvercetin nebo apigenin), běžně používané koření (vanilin, kurkumin, kapsaicin), terpenové sloučeniny (například boswelová kyselina), ursany (pentacyklické triterpeny) a mnoho dalších (Řezanka a kol., 2012).

Literatura

Donlan R. M. (2001) Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process, *Helthcare Epidemiology* 33, 1387-1392.

Donlan R. M. (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces, *Emerging Infectious Diseases* 8, 881-890.

Gácsér A., Schäfer W., Nosanchuk J. S., Salomon S., Nosanchuk J. D. (2007): Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genetics and Biology* 44, 1339-1341.

Gibbons R. J., Qureshi J. V. (1978) Selective Binding of Blood Group-Reactive Salivary Mucins by *Streptococcus mutans* and Other Oral Organisms, *Infection and Immunity* 22, 665-671.

Hardigan, M. W.; Lyriam, L. R. M.; Ronald, J. H.; Merle, O. J. (2009) Can filamentous fungi form biofilms?, *Trends Microbiol* 17, 475–480.

Jefferson K. K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236, 163-173.

Kerr K. G., Snelling A. M. (2009) *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary, *Journal of Hospital Infection* 73, 338-344.

Maiorana A., Papi M., Bugli F., Torelli R., Maulucci G., Cacaci M., Posteraro B., Sanguinetti M., De Spirito M. (2013) A fast and quantitative evaluation of the *Aspergillus fumigatus* biofilm adhesion properties by means of digital pulsed force mode, *Applied Surface Science* 279, 409-415.

Ramage G., Mowat E., Jones B., Williams C., Lopez-Ribot J. (2009): Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 340-355.

Reid G. (1999) Biofilms in infectious disease and on medical devices, *International Journal of Antimicrobial Agents* 11, 223-226.

Řezanka T., Čejková A., Masák J. (2012) Natural Products: Strategic Tools for Modulation of Biofilm Formation, In *Studies in Natural Products Chemistry*, 1. vydání, Elsevier, Pákistán 38, 269-298.

Stoodley P., Boyle J. D., Dioda I., Lappin-Scott H. M. (1997) Consensus Model Of Biofilm Structure, University of Southampton, 1-9. (online)

Thebault P., Lequeux I., Jouenne T. (2013) Antibiofilm strategies, *Journal of Wound Technology* 21, 36-39.

Watnick, Kolter (2000) Biofilm, City of Microbes, *Journal of Bacteriology* 182, 2675-2679.

Genové modifikace bakterií rodu *Clostridium* vedoucí ke zvýšení produkce biobutanolu

Kolek J., Patáková P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

1. Úvod

Butanol je čtyřuhlíkatý alkohol, využitelný například jako rozpouštědlo, základní surovina pro výrobu bioplastů a dalších chemikálií či jako potenciální palivo nebo příměs pohonných hmot. Použití butanolu do pohonných hmot nabízí několik zásadních výhod oproti dnes běžně používanému bezvodému ethanolu. Je to především jeho vyšší energetická hustota, menší korozivní působení na kovové součásti, menší těkavost a výrazně nižší schopnost vázat vodu, která je často hlavním problémem užití ethanolu.

Prakticky veškerý butanol je v současnosti připravován hydratací butanu získaného z ropy. Možnou alternativou tohoto postupu je fermentační výroba biobutanolu. Ten je produkován během aceton-butanol-ethanolového (ABE) kvašení, které je typickou vlastností některých bakterií rodu *Clostridium*. Přesto, že v minulosti byl tento proces k výrobě butanolu a acetonu běžně používán, dnes se jedná, v porovnání s výrobou z ropy, o proces absolutně nerentabilní.

Největším problémem fermentační výroby je vysoká toxicita samotného butanolu pro bakteriální buňky, se kterou souvisí nízká dosažitelná konečná koncentrace biobutanolu v produkčním médiu, a tudíž i vysoká ekonomická náročnost celého procesu. Tento problém by mohli pomoci řešit současné a neustále rozvíjející se metody genového inženýrství.

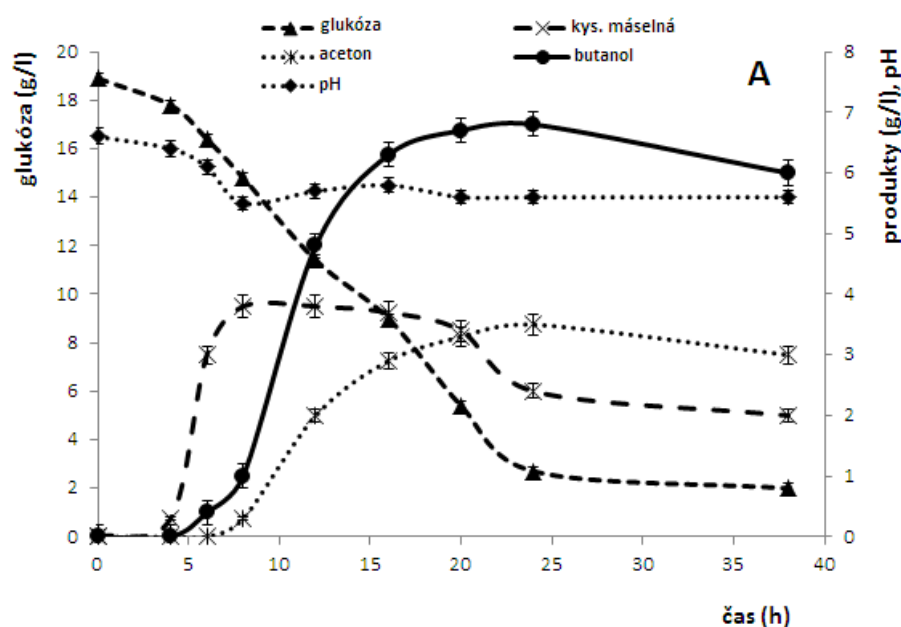
V současné době jsou již možnosti genových úprav bakterií rodu *Clostridium* poměrně rozsáhle rozpracovány. Cílené manipulace producentů biobutanolu by mohli vést v budoucnu ke zvýšení odolnosti bakteriálních buněk vůči organickým rozpouštědlům a ke zvýšení celkové výtěžnosti organických rozpouštědel. V současnosti se výzkum s cílem zlevnit a zefektivnit výrobu biobutanolu rozčleňuje do několika výrazných směrů. Mezi ně patří snaha o zlevnění vstupní suroviny, modifikace producentů za účelem zvýšení jejich odolnosti vůči butanolu a modifikace za účelem zvýšení produkce samotného biobutanolu.

2. ABE fermentace

ABE fermentace je proces známý již více než sto let, který kolem roku 1912 popsal poprvé Chaim Weizmann. Aceton-butanol-ethanolové kvašení (ABE-fermentace) je životní strategií některých bakterií rodu *Clostridium*. Jedná se o striktně anaerobní, gram-pozitivní, tyčinkovité bakterie procházející během svého životního cyklu významnou diferenciací zahrnující tvorbu mimořádně odolných endospor. Konkrétní skupina klostridií využívající ABE fermentaci

(tvoří během fermentace organická rozpouštědla) je označována, jako skupina solventogenní. Trojice nejznámějších a nejlépe popsanych zástupců této skupiny jsou bakterie druhu *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* a *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Solventogenních klostridií však bylo popsáno v průběhu let mnohem více. Dalšími známými druhy jsou např. *Clostridium pasteurianum*, *Cl. roseum*, *Cl. butylicum*, atd.

Klasický průběh ABE fermentace je rozdělen na dvě fáze. Během acidogenní fáze dochází k přeměně zdroje uhlíku na organické kyseliny (octová, máselná, mléčná). V solventogenní fázi jsou tyto kyseliny částečně přeměňovány na rozpouštědla při současné spotřebě sacharidického zdroje uhlíku, čímž dochází k částečnému vyrovnávání snižujícího se pH v médiu, které je způsobeno tvorbou kyselin. Konec fermentace je charakterizován vytvořením spor, zastavením růstu biomasy i tvorby produktů (Obr. 1).



Obr. 1: Příklad průběhu ABE fermentace: *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598, TYA médium – glukóza 20 g/l, 37 °C.

3. Genové manipulace klostridií

Metody pro genové manipulace bakterií rodu *Clostridium* jsou v současné době již poměrně dobře rozpracovány. Stejně tak je v genových databázích k dispozici poměrně velké množství sekvenčních dat pro tyto organismy (Pyne *et al.* 2014). Kompletně osekvenován byl genom 51 klostridií (k datu 1.3.2014), z toho asi z jedné pětiny se jedná o klostridia solventogenní (zdroj: databáze GOLD, <http://www.genomesonline.org>).

Pro modelové bakterie rodu *Clostridium* bylo také vytvořeno několik speciálních systémů používaných v současnosti i pro genové úpravy jiných organismů. Příkladem je např. systém pro rychlý genový „knock-out“ založený

na specificky zacílených intronech skupiny II a retro-transpozičně aktivovaném markeru pro selektivní vložení do přesně definovaných míst v genomu (Heap *et al.* 2007; Heap *et al.* 2010), systém specifického „knock-downu“ pomocí „antisense-RNA“ interference s cílovou mRNA (Desai and Papoutsakis 1999) nebo systém modulárních kyvadlových plasmidů (Heap *et al.* 2009).

4. Využití alternativních zdrojů uhlíku

Typickým zdrojem uhlíku a energie pro ABE fermentaci jsou sacharidy. V závislosti na používaném solventogenním druhu a dalším složení kultivačního média lze jako zdroj energie a uhlíku použít monosacharidy (např. glukóza, fruktóza, galaktóza, atd.), oligosacharidy (sacharóza, laktóza, maltóza, atd.) i některé polysacharidy, jako škrob nebo pektiny (Jones and Woods 1986). Vesměs se jedná bohužel o velmi drahé substráty, které tak tvoří největší položkou v celkové ceně fermentační výroby biobutanolu. Pokud by tedy bylo uvažováno o jeho průmyslové produkci fermentační cestou, je nutné nejprve snížit náklady na zdroj uhlíku, jako na vstupní materiál.

Jedním z možných řešení, jak podstatně snížit cenu vstupního substrátu je využití odpadních substrátů (typicky z potravin nebo zemědělství) obsahující zbytkové sacharidy (zpravidla škrob).

Dalším, v současnosti velmi diskutovaným řešením je produkce butanolu za použití nesacharolytického zdroje. Jediným takovým substrátem, který byl prozatím úspěšně použit pro ABE fermentaci, je glycerol. Bylo ukázáno, že tento trojsytný alkohol může být velmi efektivně využíván některými solventogenními druhy, především producenty spadajícími do druhu *Clostridium pasteurianum* (Almeida *et al.* 2012). Glycerol vzniká např. jako vedlejší produkt při výrobě bionafty nebo je odpadem při výrobě kosmetických přípravků a je tak zároveň i odpadním substrátem, který by mohl být touto cestou zpětně zhodnocen. Bohužel i s použitím v porovnání se sacharidy mnohem levnějšího glycerolu je proces stále zdaleka mnohem dražší než tradiční výroba ropného butanolu. Problémem také je, že většina solventogenních druhů, které vykazují nejvyšší známé výtěžnosti butanolu, není schopna glycerol využít.

Velmi nadějnou cestou v produkci butanolu může být jeho produkce s využitím celulózy, jako zdroje uhlíku a energie. Celulóza je nejběžnějším polysacharidem na zemi (je základním stavebním kamenem buněčných stěn rostlin). Je zároveň jedním z nejčastějších a nejlevnějších, především zemědělských odpadů (sláma, listové opady, energetické plodiny, atd.). Bakterie rodu *Clostridium* patří obecně mezi nejběžnější rozkladače celulózy v přírodních ekosystémech v oblastech bez výskytu kyslíku, jako jsou např. vodní sedimenty, komposty, trávící traktory býložravců nebo anoxické vrstvy půdy. Prozatím bohužel nebyl popsán žádný druh klostridia, který by byl schopen využít celulózu a zároveň produkovat butanol. Zajímavé je, že díky sekvenčním projektům byly v mnoha solventogenních klostridiích objeveny geny nebo i kompletní dráhy pro využití celulózy, které však nejsou u žádného producenta z prozatím neznámého

důvodu funkční (Nolling *et al.* 2001; Kovacs *et al.* 2013; Thomas *et al.* 2014). Tato problematika je v současnosti jednou ze základních cest výzkumu ke zlepšení a zlevnění produkce biobutanolu.

Jednou z nabízejících se možností je „oživení“ nefunkčních či kryptických celulolytických drah, kterou obsahuje např. genom modelové bakterie *Clostridium acetobutylicum* ATCC 823 (Nolling *et al.* 2001). Dalším možným přístupem je přenos kompletní funkční celulolytické dráhy do solventogenního klostridia nebo naopak přenos všech genů potřebných pro produkci butanolu do jiného celulolytického (Nolling *et al.* 2001; Thomas *et al.* 2014). Přestože je tato problematika řešena již dlouhá léta, prozatím žádná z těchto možností nebyla úspěšně provedena.

Další možností je ko-kultivace celulolytického druhu, jehož úkolem je ve fermentačním médiu rozkládat celulózu na monosacharidy a solventogenního druhu, který je schopen využívat okamžité produkce glukózových jednotek v okolí celulolytické bakterie a využívat je pro svůj vlastní metabolismus. Takto byla úspěšně provedena např. kultivace bakterií *Clostridium thermocellum* a *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* s použitím mikrokrytalické celulózy, jako zdroje uhlíku (Nakayama *et al.* 2011).

5. Zvýšení odolnosti vůči butanolu

Často studovanou vlastností solventogenních bakterií rodu *Clostridium* je také jejich odolnost vůči butanolu. Vznikající butanol (a další případná rozpouštědla) působí na buňku během kultivace silně toxicky. Dochází především k destabilizaci cytoplazmatické membrány a inhibici buněčných enzymatických aktivit, které jsou esenciální pro růst a metabolismus. Maximální dosažitelná finální koncentrace butanolu ve fermentačním médiu se pohybuje zpravidla mezi 5-15 g/l (Jones and Woods 1986). Odolnost buněk k butanolu byla popsána zhruba v rozmezí 10-22 g/l. Bakteriální buňka je schopna se působení butanolu do určité koncentrace efektivně bránit. Během ABE fermentace dochází k výrazným změnám genové exprese, které vedou např. k remodelaci membrán, úpravám aktivit enzymů, produkci DNA vazebných proteinů, atd.

Jedním ze základních přístupů zvýšení odolnosti k butanolu je právě zvýšení exprese genů, které zprostředkovávají tyto stresové obranné mechanismy a navýšit tak celkový obranný potenciál buňky vedoucí k přežití i ve vyšších koncentracích butanolu. Rozvoj celogenomové sekvenace a nástup nových metod, především potom metod využívajících DNA čipy („DNA microarray“) umožnil rychlou a komplexní analýzu změn genové exprese napříč celým genomem. Takto byla genová exprese během ABE fermentace zkoumána např. v modelové bakterii *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 (Shi and Blaschek 2008). Analýzou bylo zjištěno, že odpověď na butanolvý stres je mnohem složitější než se původně předpokládalo. Dochází během ní k velmi rozsáhlým změnám exprese a to ve více než 200 oblastech napříč celým genomem. Tímto zjištěním bylo bohužel vyvráceno očekávání, že změnou několika ochranných

genů bude možné jednoduše docílit značného zvýšení odolnosti buňky. I přes složitost systému bylo vytipováno několik hlavních genů, které mohou určitou měrou ke zvýšení odolnosti přispět. Jedná se především o buněčné proteiny teplotního šoku (tzv. HTS proteiny) či geny pro produkci plasmalogenů a cyklopropanových mastných kyselin. Jejich overexprese v produkčním organismu *Clostridium acetobutylicum* vedla ke značnému zvýšení odolnosti vůči butanolu (Mann *et al.* 2012). Přes značné zvýšení odolnosti kupodivu nedošlo k žádnému zvýšení produkce butanolu. Bylo tak ukázáno, že produkce není limitována malou odolností buněk a že i při zvýšení odolnosti nedochází k navýšení produkce butanolu.

Dalším přístupem, jak zvýšit odolnost proti organickým rozpouštědlům, byly pokusy o heterologní expresi genů *sol* dráhy (obsahuje enzymy pro butanolové kvašení) v jiném, k rozpouštědlům více odolném organismu, jako je např. kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* nebo bakterie *Pseudomonas putida*. Tyto pokusy však prozatím nebyly úspěšné, a pokud bylo docíleno produkce butanolu, tak pouze ve stopovém množství. To souvisí patrně s rozdílným vnitřním prostředím v rozdílných bakteriálních druzích či nepřítomností nutných, prozatím nepopsaných kofaktorů.

6. Zvýšení produkce butanolu

Metody pro zvýšení produkce butanolu podléhají již od začátku značnému omezení. K tomu, aby bylo možno zvýšit uměle produkci butanolu, je také nutné zvýšit výrazně odolnost produkčního organismu, jelikož bez tohoto kroku by se produkce opět nutně zastavila na koncentraci, která začíná být pro buňky letální. Přístupem k samotnému zvýšení produkce butanolu může být typicky zvýšení dóze biosyntetických genů. A to jak samotných genů *sol* operonu, tak některých dalších, které *sol* dráze předchází (např. hexokináza a některé další enzymy glykolýzy). Možností je také klonování nových genů pro transportní proteiny, zajišťující opět rychlejší metabolismus glukózy a tím i rychlejší a celkově vyšší produkci butanolu.

Velmi důležitým nástrojem pro vývoj průmyslových produkčních kmenů jsou vždy regulační zásahy do metabolických drah. Takovým zásahem může být u solventogenních klostridií např. narušení drah pro syntézu některých organických kyselin nebo odklonění drah vedoucích k ostatním rozpouštědlům. Tím lze docílit stavu, kdy je takřka veškerý metabolizovaný uhlík, který není použit pro nutnou údržbu buňky, zpracován právě na butanol. Podobně působícím zásahem může být také např. odstranění regulačních genů spouštějících sporulaci, jelikož sporulace sama o sobě spotřebovává velmi podstatnou část veškeré buněčné energie.

7. Závěr

Přestože byl učiněn značný pokrok ve výzkumu solventogenních klostridií, stále není fermentační výroba biobutanolu ve fázi, kdy by ji bylo možné efektivně

využívat např. k produkci pohonných hmot. Hlavním problémem zůstává malá odolnost bakteriálních buněk vůči butanolu, nízký celkový výtěžek fermentace a tudíž vysoká cena výsledného produktu.

Rozvoj genových modifikací bakterií druhu *Clostridium* zaznamenal v posledních patnácti letech velmi rychlý vývoj a bylo vyvinuto mnoho metodik pro jejich provedení. Nové metody umožnily zásadně urychlit a usnadnit výzkum v této oblasti. S pokračujícím výzkumem se bohužel ukazuje, že problematika produkce butanolu a buněčné odolnosti k němu není vůbec snadná a není možné ji vyřešit jednoduchými genetickými zásahy, jak bylo v minulosti někdy uváděno.

S velkou pravděpodobností lze očekávat, že v dalších letech bude fermentační výroba biobutanolu díky pokračujícímu intenzivnímu výzkumu a zároveň neustálému zdražování ropných produktů stále více vyhledávanou technologií, která by si mohla v budoucnosti najít své platné místo v průmyslové sféře.

Poděkování:

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014)

Použitá literatura

Almeida, J.R., Favaro, L.C. and Quirino, B.F. (2012) Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for biofuels* **5**, 48.

Desai, R.P. and Papoutsakis, E.T. (1999) Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology* **65**, 936-945.

Heap, J.T., Cartman, S.T., Kuehne, S.A., Cooksley, C. and Minton, N.P. (2010) ClosTron-targeted mutagenesis. *Methods in molecular biology* **646**, 165-182.

Heap, J.T., Pennington, O.J., Cartman, S.T., Carter, G.P. and Minton, N.P. (2007) The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *Journal of microbiological methods* **70**, 452-464.

Heap, J.T., Pennington, O.J., Cartman, S.T. and Minton, N.P. (2009) A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *Journal of microbiological methods* **78**, 79-85.

Jones, D.T. and Woods, D.R. (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews* **50**, 484-524.

Kovacs, K., Willson, B.J., Schwarz, K., Heap, J.T., Jackson, A., Bolam, D.N., Winzer, K. and Minton, N.P. (2013) Secretion and assembly of functional mini-

cellulosomes from synthetic chromosomal operons in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnology for biofuels* **6**, 117.

Mann, M.S., Dragovic, Z., Schirmacher, G. and Lutke-Eversloh, T. (2012) Over-expression of stress protein-encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress. *Biotechnology letters* **34**, 1643-1649.

Nakayama, S., Kiyoshi, K., Kadokura, T. and Nakazato, A. (2011) Butanol production from crystalline cellulose by cocultured *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. *Applied and environmental microbiology* **77**, 6470-6475.

Nolling, J., Breton, G., Omelchenko, M.V., Makarova, K.S., Zeng, Q., Gibson, R., Lee, H.M., Dubois, J., Qiu, D., Hitti, J., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Sabathe, F., Doucette-Stamm, L., Soucaille, P., Daly, M.J., Bennett, G.N., Koonin, E.V. and Smith, D.R. (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of bacteriology* **183**, 4823-4838.

Pyne, M.E., Bruder, M., Moo-Young, M., Chung, D.A. and Chou, C.P. (2014) Technical guide for genetic advancement of underdeveloped and intractable *Clostridium*. *Biotechnology advances* **32**, 623-641.

Shi, Z. and Blaschek, H.P. (2008) Transcriptional analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the hyper-butanol-producing mutant BA101 during the shift from acidogenesis to solventogenesis. *Applied and environmental microbiology* **74**, 7709-7714.

Thomas, L., Joseph, A. and Gottumukkala, L.D. (2014) Xylanase and cellulase systems of *Clostridium* sp.: an insight on molecular approaches for strain improvement. *Bioresource technology* **158**, 343-350.

Charakterizace rhamnolipidových směsí

Ježdík R., Masák J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Kontaminace životního prostředí organickými polutanty je v dnešní době jedním z největších problémů ekologického rázu. Mezi nejodolnější organické polutanty patří polyaromatické uhlovodíky (Kim a kol., 2001). Biologická degradace těchto látek je velice problematická, což je zapříčiněno jejich nízkou rozpustností ve vodě a vysokou sorpcí na půdní částice. Pro biologickou degradaci je rozpustnost kontaminantu ve vodě hlavním limitním faktorem (Zhang a kol., 1997). Rozpustnost těchto látek lze zlepšit aplikací surfaktantů. Tyto amfifilní povrchově aktivní látky jsou schopny snižovat povrchové a mezifázové napětí fází a jsou schopny tvořit mikroemulze. Tento jev má za následek zvýšení zdánlivé rozpustnosti polutantu ve vodě a tím je usnadněna biologická dostupnost pro degradující mikroorganismy.

Použití chemických surfaktantů přináší značné nevýhody, jelikož tyto látky jsou většinou toxické a nejsou biodegradovatelné, tudíž sekundárně zatěžují životní prostředí. Tyto látky lze nahradit biosurfaktanty, které v posledních letech nabývají značné obliby, protože jsou zcela biodegradovatelné tudíž jejich aplikace nezatěžuje životní prostředí (Sarkar a kol., 1989). Biosurfaktanty jsou povrchově aktivní látky produkované mikroorganismy mající různorodou strukturu. Mezi nejznámější biosurfaktany patří zástupci glykolipidů, zejména rhamnolipidy, které jsou složeny z jedné nebo dvou molekul rhamnosy spojené přes esterovou vazbu s jednou či dvěma molekulami β -hydroxy mastnými kyselinami (Soberon-Chavez a kol., 2005). Produkce rhamnolipidů je známa u mnoha bakteriálních druhů mezi nejvýznamnější však patří bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, u které byla produkce rhamnolipidu objevena. Avšak v dnešní době je známo mnoho dalších a vhodnějších producentů rhamnolipidů jako například *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormachei*, *Nocardioides* sp., a *Pseudoxanthomonas* sp., které jsou v porovnání s *P. aeruginosa* méně patogenní (Santos a kol., 2002).

Tato práce je zaměřena charakterizaci rhamnolipidových směsí produkovaných třemi bakteriálními kmeny (*Pseudomonas aeruginosa* B59-188 *Acinetobacter calcoaceticus* B59-190, *Enterobacter asburiae* B59-189, které byly již dříve označeny za vhodné producenty rhamnolipidu.

Materiály a metody

Použité mikroorganismy

Při sledování produkce rhamnolipidu a jejich fyzikálně chemických vlastností byly použity kmeny *Acinetobacter calcoaceticus* B-59190, *Enterobacter*

asburiae B-59189 a *Pseudomonas aeruginosa* B59188, získané ze sbírky: ARS Culture Collection, Bacterial Foodborne Pathogens and Mycology Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, USA.

Použitá média

Média byla sterilována v autoklávu po dobu 20 minut při teplotě 121° C a tlaku cca 0,1 MPa.

V případě úpravy hodnoty pH medií byly použity roztoky 1 M NaOH a 1 M H₂SO₄.

Kapalná média

L-Broth médium: 10 g/l Trypton, 5 g/l kvasinkový extrakt, 10 g/l NaCl

Médium pro produkci rhamnolipidů pro následné stanovení fyzikálně-chemických vlastností.

KH ₂ PO ₄	0,17 g/l
K ₂ HPO ₄	0,13 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,71 g/l
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	0,34 g/l
1 ml/l roztoku stopových prvků:	
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂	0,196 g/l
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,6 g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	2,0 g/l

Výsledná hodnota pH média byla upravena na hodnotu 7,0. Jako zdroj uhlíku byl použit citrát sodný (20 g/l).

Použité metody

Příprava inokula

200 ml sterilního komplexního média (živný bujón, L-B médium) bylo inukolováno buněčnou populací z povrchu agarové vrstvy a kultivováno na třepačce 100 ot/min, 48 hodin při teplotě 30 °C. Získaná buněčná populace byla separována centrifugací (10000 g, teplota 10 °C, 10 min.) promyta sterilním minimálním médiem. Následně byla tato buněčná suspenze použita k zaočkování média pro produkci rhamnolipidů.

Baňkové kultivace pro produkci buisurfaktantu

Kultivace v Erlenmayerových baňkách (500 ml) probíhala za aerobních podmínek na třepačce (100 ot/min) ve sterilním minimálním médiu o objemu 200 ml při konstantní teplotě (30 °C). K inokulaci byla použita promytá buněčná suspenze. Baňky byly zaočkovány, tak aby hodnota optické density (OD₄₀₀) byla 0,2±0,02.

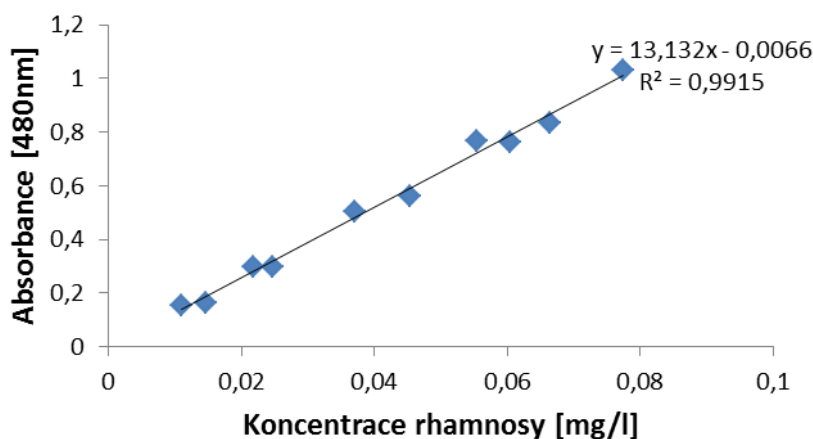
Stanovení rhamnosy (Dubois, 1956)

Množství rhamnolipidu bylo stanoveno nepřímo stanovením obsahu rhamnosy. Množství rhamnolipidu je přímo úměrné množství rhamnosy, koeficient pro přepočet mezi oběma látkami se liší dle zastoupení jednotlivých složek ve směsi v závislosti na poměru jejich molárních hmotností ku molární hmotnosti rhamnosy.

Rhamnosa byla stanovena fenol-sírovou metodou pro stanovení sacharidů, která je založena na barevné kondenzaci sacharidů s fenolem za přítomnosti koncentrované kyseliny sírové. Výsledné zabarvení směsi bylo měřeno pomocí spektrofotometru, závislost hodnoty absorbance je lineární v rozmezí 0 - 80 mg/l sacharidu.

K 1 ml roztoku rhamnosy/ odstředěného vzorku buněčné suspenze byl přidán 1 ml 5 % roztoku fenolu a následně 5 ml koncentrované H_2SO_4 . Směs byla promíchána a ponechána 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byla promíchána a vložena do termostatu na 20 minut při teplotě 30 °C. Byla měřena absorbance směsi při 480 nm proti referenčnímu vzorku, který byl připraven stejným způsobem, místo roztoku rhamnosy byl použit stejný objem destilované vody.

Kalibrační přímka pro stanovení rhamnosy je uvedena na obr. 1. Uvedené hodnoty absorbance jsou aritmetickým průměrem hodnot 2 paralelních stanovení.



Obr. 1 Kalibrační křivka stanovení rhamnosy

Izolace rhamnolipidu

Směs rhamnolipidů byla izolována srážením v kyselém prostředí pH 2 – rhamnolipidy se stávají nerozpustnými (Abdel-Mawgoud a kol., 2009). Po ukončení kultivace byla buněčná suspenze odstředěna. Supernatant byl po separaci ochlazen na 4 °C a následně okyselen kyselinou chlorovodíkovou na pH 2, při kterém se vysrážela směs produkovaných rhamnolipidů. Okyselený roztok se ponechal v klidu a chladu 12 hodin, poté byl odstředěn. Sedlina, která obsahovala směs rhamnolipidů, byla lyofilizována. Z lyofilizátu byly

ramnolipidy získány extrakcí organickými rozpouštědly Methanol:chloroform 1:1. Rozpouštědlo bylo následně odpařeno.

Tenkvrstvá chromatografie

Tenkvrstvá chromatografie (TLC) byla použita pro částečnou preparaci jednotlivých ramnolipidů. Jako vzorek pro TLC byl použit hrubý izolát ramnolipidů. Použitá tenká vrstva: Silikagel 60, sklo, 20 x 20 cm (Merck), mobilní fáze chloroform:metanol:kyselina octová v poměru 65:15:2. Detekce ramnolipidů byla provedena opálením silikagelu, který byl namočen v 10 % H_2SO_4 .

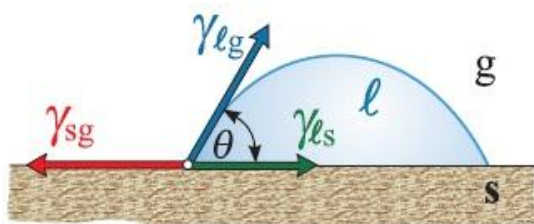
Jednotlivé ramnolipidy byly z preparativní TLC desky získány po seškrábání příslušných oblastí silikagelu a eluovány směsí (15 ml) chloroform:ethanol v poměru 2:1. Rozpouštědla byla odpařena za pokojové teploty. Ramnolipidy (odpovídající mastné kyseliny) byly v odparku stanoveny pomocí GC/MS.

Stanovení kritické micelární koncentrace

Ramnolipidy snižují povrchové napětí. V oblasti koncentrací pod KMK je pokles povrchového napětí nepřímo úměrný koncentraci ramnolipidu v roztoku. Pokud ramnolipid dosáhne KMK, nastane zlom, začnou se tvořit micely a povrchové napětí přestane klesat, respektive se sníží trend poklesu. Kontaktní úhel kapaliny s podložkou je úměrný povrchovému napětí.

Kritická micelární koncentrace (KMK) byla stanovena z grafického vyjádření, závislosti kontaktního úhlu na koncentraci ramnosy. Pro toto stanovení byla použita metoda stanovení kontaktního úhlu roztoku ramnolipidu s povrchem teflonové destičky. Pro odhad kritické micelární koncentrace byly použity údaje z literatury (Abdel-Mawgoud a kol., 2009). Preparáty ramnolipidu byly rozpuštěny v destilované vodě. Ředěním bylo vytvořeno více různých koncentrací, část roztoků v koncentraci pod KMK a část roztoků nad KMK.

Jednotlivé roztoky ramnolipidu byly kapány na termostatovanou teflonovou destičku (30 °C). Kapka roztoku na povrchu destičky byla vyfotografována a získaný obraz následně vyhodnocen v programu FTA 32. Z naměřených hodnot kontaktního úhlu (Obr. 2) jednotlivých roztoků byl sestaven graf, mající dvě části, oblast pod KMK a nad KMK, obě části byly proloženy s využitím lineární regrese a v průsečíku přímek byla odečtena KMK.



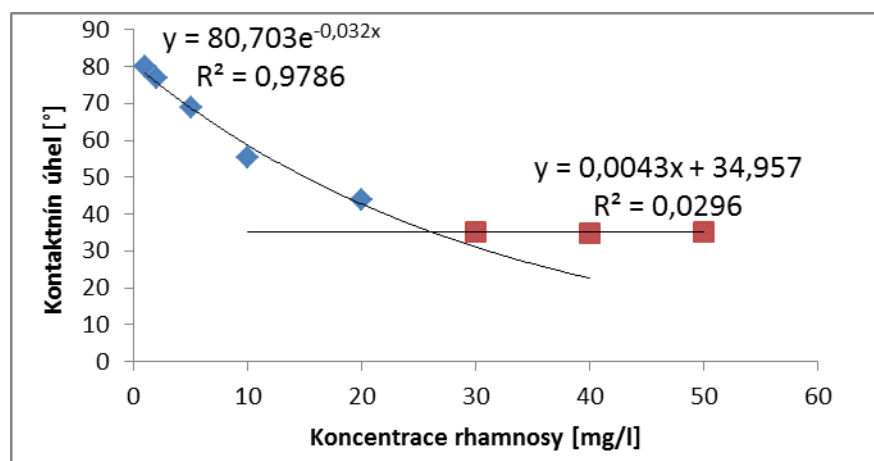
Obr. 2. Měření kontaktního úhlu (převzato z: Novák a kol., 2011)

s - pevná látka, l – kapalina, g – plyn, θ - kontaktní úhel kapaliny a povrchu pevné látky, γ_{sg} – povrchové napětí plyn pevná látka, γ_{ls} – povrchové napětí kapalina pevná látka, γ_{lg} – povrchové napětí kapalina plyn,

Výsledky a diskuze

Složení rhamnolipidových směsí se liší v závislosti na produkčním mikroorganismu. Zastoupení jednotlivých typů rhamnolipidů ovlivňuje vlastnosti směsi jako například kritickou micelární koncentraci (KMK). Kritická micelární koncentrace je důležitou vlastností povrchově aktivních látek a je jakousi mírou účinnosti této látky. Pro dosažení maximálního snížení povrchového napětí je dostačující nižší koncentrace rhamnolipidu, která odpovídá kritické micelární koncentraci (Benincasa a kol., 2010).

Měření KMK rhamnolipidových směsí



Obr. 3 Stanovení KMK rhamnolipidové směsi *Pseudomonas aeruginosa* B-59188 metodou kontaktního úhlu

Obr. 3 zobrazuje průběh změny hodnoty kontaktního úhlu v závislosti na koncentraci rhamnolipidu produkovaného *Pseudomonas aeruginosa* B-59188. Z proložení lineární (exponenciální) regrese jednotlivými částmi grafu byla odečtena hodnota KMK. Takto stanovené KMK všech izolovaných rhamnolipidů z testovaných mikrobiálních kmenů jsou souhrnně uvedeny v tab. I.

Tab. I Kritické micelární koncentrace směsí rhamnolipidů testovaných mikroorganismů.

Produkční mikroorganismus	KMK [mg/l]
<i>Acinetobacter calcooaceticus</i> B-59190	15
<i>Enterobacter asburiae</i> B-59189	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-59188	60

Složení rhamnolipidových směsí

Složení rhamnolipidových směsí bylo stanoveno pomocí GC-MS (centrální laboratoře VŠCHT). Zastoupení RL kongenerů se v produkovaných rhamnolipidových směsích významně neliší (viz tab II.), rozdíly jsou zde pouze v rámci jednotek procent, vyjma několika případů. Z těchto dat je patrné, že sledované rhamnolipidové směsi obsahují především kongenery s 10 uhlíky v molekule mastné kyseliny. Z porovnání dat z měření kritických micelárních koncentrací a složení rhamnolipidových směsí, lze předpokládat, že kritická micelární koncentrace se zvyšuje se stoupajícím zastoupením rhamnolipidových kongenerů obsahujících nenasycené mastné kyseliny.

Tab. II Procentuální obsah rhamnolipidových kongenerů v produkované směsi. Rozděleny dle typů rhamnolipidů. Rha- rhamnosa, MK příslušná mastná kyselina. C8-C12 označení konkrétních mastných kyselin dle délky uhlíkového řetězce. A.c.- rhamnolipidová směs bakterie *Acinetobacter calcoaceticus*, E.a. - rhamnolipidová směs bakterie *Enterobacter asburiae*, P.a. - rhamnolipidová směs bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

Typ rhamnolipidu	Obsah rhamnolipidu v %		
RhaRhaMK	A.c.	E.a.	P.a.
RhaRhaC10	11,2	18,6	10,0
RhaRhaC12:1	2,7	1,0	0,8
RhaRhaC8	2,3	1,4	0,6
RhaRhaC12	1,6	0,8	0,7
RhaRhaC10:1	0,0	0,0	1,6
RhaRhaMKMK	A.c.	E.a.	P.a.
RhaRhaC10C10	28,0	20,3	19,5
RhaRhaC10C12:1	6,2	1,6	0,8
RhaRhaC8C10	4,2	3,0	7,7
RhaRhaC10C12	3,5	2,2	6,5
RhaRhaC12C10	1,9	1,2	2,8
RhaRhaC12:1C10	1,7	0,1	0,2
RhaRhaC10C8	1,5	0,9	0,9
RhaRhaC8C8	1,1	0,4	1,4
RhaRhaC12C12:1	0,4	0,0	0,6
RhaRhaC10C10:1	0,0	0,0	3,1
RhaRhaC10:1C10	0,0	0,0	0,8
RhaMK	A.c.	E.a.	P.a.
RhaC10	9,6	14,9	5,4
RhaC8	1,7	1,3	0,4
RhaC12	1,5	0,7	0,4
RhaC12:1	0,1	0,2	0,2
RhaC10:1	0,0	0,0	0,7
RhaMKMK	A.c.	E.a.	P.a.
RhaC10C10	9,8	22,1	16,5
RhaC8C10	5,5	3,7	5,5
RhaC10C12:1	1,5	2,1	2,4
RhaC10C12	1,4	0,9	0,8
RhaC12:1C10	1,1	0,5	0,3
RhaC10C8	0,6	1,5	1,0
RhaC10C10:1	0,4	0,0	4,0
RhaC12C10	0,2	0,3	0,2
RhaC8C8	0,1	0,1	0,3
RhaC12C12	0,1	0,1	0,3
RhaC10:1C10	0,0	0,1	3,4

Závěr

Byla provedena analýza složení rhamnolipidových směsí tří bakteriálních producentů a bylo ověřeno, že jejich složení se liší pouze v jednotách procent, ale tato malá změna ve složení má velký vliv na celkové chování směsi, jak je zde prezentováno stanovením kritických micelárních koncentrací. Ze získaných daných dat lze předpokládat, že změna obsahu rhamnolipidových kongenerů s nenasycenými mastnými kyselinami v produkované směsi rhamnolipidů má významný vliv na výslednou kritickou micelární koncentraci směsi.

Použitá literatura

Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. H. (2009). Characterization of Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 329-345.

Benincasa, M; Marqués, A; Pinazo, A; Manresa, A. *Rhamnolipid surfactants: alternative substrates, new strategies*. (Biosurfactants, Sen R) Springer Science + Business Media, LLC, New York, 2010

Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smit, F. (1956). Colorimetric method for determinativ of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 6.

Kim, I. S., Park, J. S., & Kim, K. W. (2001). Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. *Applied Geochemistry*, 16(11-12), 1419-1428.

Novák, J.; et al. Fyzikální chemie bakalářský a magisterský kurz; VŠCHT Praha: Praha, 2011.

Santos, A. S., Sampaio, A. P. W., Vasquez, G. S., Santa Anna, L. M., Pereira, N., & Freire, D. M. G. (2002). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98, 1025-1035.

Sarkar, A. K., Goursaud, J. C., Sharma, M. M., & Georgiou, G. (1989). A Critical-Evaluation of Meor Processes. *In Situ*, 13(4), 207-238.

Soberon-Chavez, G., Lepine, F., & Deziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68(6), 718-725.

Zhang, Y. M., Maier, W. J., & Miller, R. M. (1997). Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene. *Environmental Science & Technology*, 31(8), 2211-2217.

Nanočástice a jejich schopnost stimulace buněčného růstu

Pádrová K., Čejková A.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Úvod

Vzhledem k poměrně rychlému rozvoji nanotechnologií povstávají otázky týkající se vlivu nanomateriálů na životní prostředí. Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic jsou determinovány jejich rozměry a jsou příčinou odlišné biologické aktivity, než kterou disponují jejich makroskopické analogy. Přestože je současný výzkum zaměřen především na problematiku cytotoxicity, mechanismu působení a možnostmi modulace toxických účinků těchto látek, byly již popsány studie diskutující možný pozitivní (stimulační) efekt některých typů nanočástic na růst a metabolickou aktivitu exponovaných buněk. Hong a kol. (2005) ve své práci popisují výrazné posílení růstu špenátových semínek vlivem přítomnosti 0.25% roztoku nanočástic TiO_2 . Mahajan a kol. (2011) popsali stimulační efekt nanočástic ZnO na růst *Vigna radiate* a *Cicer arietinum*. Kadar a kol. (2012) uvádí jako příčinu zvýšené bio-dostupnosti nanočástic právě jejich velikost. Rovněž schopnost absorpce nanočásti na buněčný povrch (Lee a kol., 2008) může přispívat ke lepší bio-dostupnosti látek v porovnání s běžně se vyskytujícími sloučeninami.

Cílem naší práce bylo prozkoumat stimulační účinek nanočástic železa nulové valence (nZVI) u vybraných zástupců zelených řas. Námi vybrané mikroorganismy patří do skupiny organismů se schopností akumulace lipidů v cytosolu. Tyto mikroorganismy jsou zajímavé především z hlediska výroby biopaliv a představují slibnou alternativu k tradiční rostlinné produkci (Ratledge, 2004). Železo je velice významným esenciálním prvkem. Jeho ionty jsou důležité pro správnou funkci mnoha buněčných pochodů, mezi které patří respirace, fotosyntéza, transport kyslíku nebo buněčná proliferace (Dlouhy a kol., 2013). Vliv koncentrace železa (železitých iontů) na růst zelených řas byl publikován Huang a kol. (2013). nZVI jsou v současné době používány především v oblasti remediací. Díky jejich vysoké reaktivitě, mohou katalyzovat širokou škálu chemických reakcí a napomáhat tak k odbourání polutantů. Tyto nanočástice jsou však ve vyšší koncentraci toxické pro buňky. Přítomnost nZVI indukuje vznik oxidativního stresu, který může vést až k letálním poškozením buňky (Ševců a kol., 2011). Naproti této skutečnosti Kadar a kol. (2012) ve své studii prokázali pozitivní vliv řádově miligramových koncentrací nZVI na růst zástupců zelených řas *Tetraselmis suecica*, *Pavlova lutheri* a *Isochrysis galbana*. Porovnal koncentrace nZVI s zdrojem železa Fe-EDTA a prokázal, že nZVI představují vhodnější zdroj tohoto prvku.

Aplikace nanočástic jako zdroje některých esenciálních prvků k modifikaci kultivačního prostředí by mohlo být novým pohledem na uplatnění nanotechnologií. Pokračování v tomto výzkumu může přispět nejen k objasňování mechanismu působení nanočástic na buňku, ale také k optimalizaci kultivačních podmínek a v některých případech k získání ekonomicky výhodnějších produktů.

Materiál a metody

Nanočástice nulmocného železa

Byl sledován účinek dvou různých typů nZVI, které jsou distribuovány firmou Nanoiron, s.r.o. (Česká republika). Preparát Nanofer 25 je tvořen vodnou disperzí nanočástic železa. Nanofer 25 S představuje jeho povrchově stabilizovaný analog. Stabilizace je zajištěna Na-akrylovými kopolymery, jejichž přítomnost zvyšuje stabilitu preparátu v prostředí.

Kultivace zelených řas

Zelené řasy *Parachlorella kessleri* (LARG/1) and *Trachydiscus minutus* (Lukavský a Pribyl 2005/1) byly kultivovány v živném mediu Z8 podle Zehnder (1961). Screeningové experimenty byly prováděny kultivací vybraných mikroorganismů v serologických destičkách (Costar, FB), které byly inokulovány na koncentraci buněk $100\,000\text{ ml}^{-1}$. Kultivace probíhala na třepačce (30 W.m^{-2}) při teplotě $26\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1% CO_2 a intenzitě světelného záření 70 W.m^{-2} .

Analýza lipidů

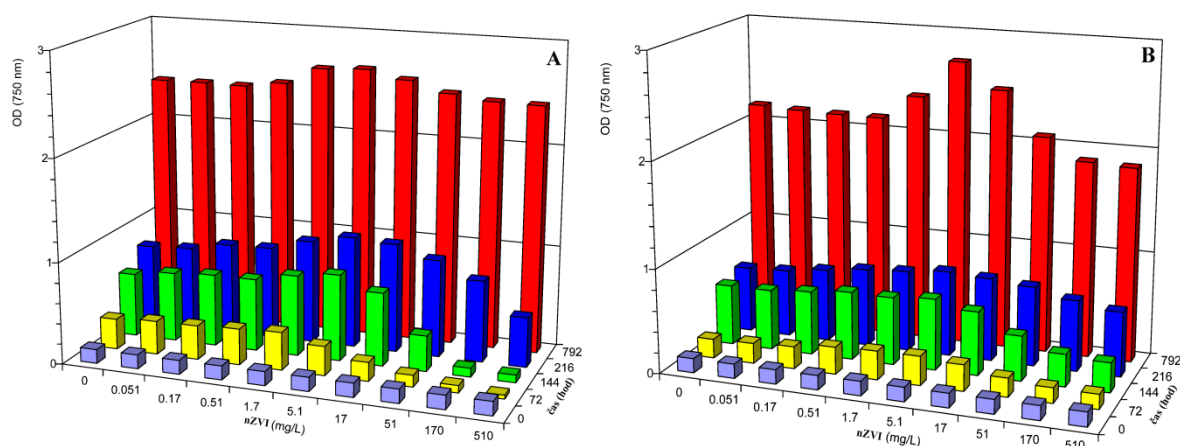
Extrakce lipidů probíhala podle metodiky popsané Bligh a kol. (1959). Lipidy byly izolovány do chloroformové fáze. Vzorek byl následně za sníženého tlaku odpařen do sucha. Lipidy ($\sim 5\text{ mg}$) byly přes noc saponifikovány v 10% KOH-MeOH za pokojové teploty. Následně byla provedena metylace mastných kyselin pomocí CH_2N_2 . Jednotlivé mastné kyseliny byly stanoveny pomocí GC-MS.

Výsledky a diskuze

Vliv nanočástic na růst vybraných mikroorganismů

Studium stimulačního účinku nZVI byl sledován u dvou odlišných typů nanočástic. Pro screeningové experimenty byla vybrána exponenciálně vzrůstající škála koncentrací nZVI. Obrázek 1 ilustruje závislost růstu zelené řasy *P. kessleri* na koncentraci preparátu Nanofer 25 (Obr. 1 A), respektive Nanofer 25 S (Obr. 1 B). Závislost růstu zelené řasy *T. minutus* za stejných kultivačních podmínek prokázala analogický charakter. Růst obou studovaných mikroorganismů byl v případě aplikace obou typů nZVI posílen v rozmezí koncentrací od $0,51 - 5,1\text{ mg l}^{-1}$. Expozice buněk koncentraci nZVI vyšší než 17 mg l^{-1} vyvolala inhibici buněčného růstu. Stejně poznatky byly popsány v publikaci Keller a kol. (2012). Růst řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* byl stimulován v rozmezí koncentrací $1-8\text{ mg l}^{-1}$ preparátu Nanofer 25 S. Inhibice

růstu byla pozorována při expozice koncentraci vyšší než 10 mg l^{-1} Nanofer 25 S (Keller a kol., 2012).



Obr. 1. Růst *Prachlorella kessleri* v přítomnosti různých koncentrací Nanofer 25 (A), Nanofer 25 S (B).

Inhibiční účinek vyšších koncentrací nZVI byl patrný po 216 hodinách kultivace (Obr. 1). Následný výrazný nárůst biomasy mezi 216 a 792 hodinou může být způsoben ztrátou reaktivity nZVI v médiu v důsledku jejich oxidace a aglomerace (Adeleye a kol., 2013).

Na základě úvodních experimentů byly pro baňkové kultivace vybrány stimulační koncentrace 1,7 a $5,1 \text{ mg l}^{-1}$ a kultivační doba stanovena na 216. Vzhledem k vyšším nárůstům biomasy u vybraných stimulačních koncentrací byl vybrán pro další experimenty nestabilizovaný preparát Nanofer 25.

Stimulace růstu a akumulace lipidů

Baňkové kultivace byly provedeny v 1 litru kultivačního média a ve všech sledovaných experimentech byl potvrzen stimulační účinek Nanofer 25 na buněčný růst a akumulaci lipidů. Tabulka 1 shrnuje hodnoty popisující množství sušiny, celkový obsah lipidů a profil mastných kyselin za studovaných podmínek. Nejvyšší nárůst biomasy byl u obou mikroorganismů dosažen při kultivaci v médiu obohaceném o koncentraci $5,1 \text{ mg l}^{-1}$ Nanofer 25. Množství biomasy populace *P. kessleri* bylo navýšeno o 42% a *T. minutus* o 32%.

Významné bylo také posílení akumulace lipidů u obou mikroorganismů. Vzrůst obsahu celkových lipidů může souviset s mechanismem působením tohoto typu nanočástic, se vznikem oxidativního stresu (Keenan a kol., 2009). Lipidy, které jsou některými mikroorganismy akumulovány v cytosolu, slouží jako zásobní látky a jejich syntéza může být stimulována právě stresovým prostředím (Rodolfi a kol., 2009). Celkový obsah lipidů u *P. kessleri* byl zvýšen o 66% a u *T. minutus* o 76%.

Přítomnost nZVI měla rovněž vliv na profil mastných kyselin. Se zvyšující se koncentrací nZVI docházelo ke zvýšení zastoupení polynenasycených mastných

kyselin oproti kontrolní populaci. Naopak zastoupení nasycených a mononesycených mastných kyselin se s koncentrací nZVI snižovalo. Tento jev může opět souviset s přítomností nZVI a jejich schopností indukovat vznik stresového prostředí. Zvýšení zastoupení polynenasycených mastných kyselin popsal Kang a kol. (2014) u zelené řasy *Chlorella vulgaris* UTEX 265, která byla kultivována v přítomnosti nanočástic TiO_2 . Tyto nanočástic mají rovněž schopnost indukovat vznik oxidativního stresu. Polynenasycené mastné kyseliny mohou díky přítomnosti dvojných vazeb sloužit jako zhášecí volných radikálů a napomáhat k obraně buňky před oxidativním stresem (Adarme-Vega a kol., 2014).

Závěr

Fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic jsou determinovány jejich rozměry a jsou příčinou jejich odlišné biologické aktivity, než kterou disponují makroskopické analogy. Expozice buněk řádově miligramovým koncentracím některých typů nanočástic (př. nZVI, ZnO) se projevila výraznou stimulací růstu. Přítomnost nZVI rovněž ovlivnila metabolismus lipidů u studovaných zástupců zelených řas. Byla zaznamenána nejen zvýšená akumulace lipidů v cytosolu, ale také změna profilu mastných kyselin ve prospěch množství polynenasycených mastných kyselin.

Tabulka 1. Profil mastných kyselin (% w w⁻¹), sušina a celkový obsah lipidů studovaných mikroorganismů za podmínek kultivace v přítomnosti různých koncentrací Nanofer 25.

		<i>P.</i> <i>kessleri</i> kontrola	<i>P.</i> <i>kessleri</i> 1.7 mg l ⁻¹	<i>P.</i> <i>kessleri</i> 5.1 mg l ⁻¹	<i>T.</i> <i>minutus</i> kontrola	<i>T.</i> <i>minutus</i> 1.7 mg l ⁻¹	<i>T.</i> <i>minutus</i> 5.1 mg l ⁻¹
Obsah lipidů [g l⁻¹]		5,26	6,77	8,72	2,72	3,61	4,78
Mastné kyseliny	14:0	2,2	2,0	1,0	22,8	22,5	20,0
	16:0	34,3	32,2	20,5	22,4	21,7	13,2
	16:1	3,3	3,0	1,3	6,9	4,9	3,8
	16:2	5,5	5,9	6,5	-	-	-
	16:3	6,4	6,7	7,1	-	-	-
	18:0	18,1	17,3	14,2	3,6	1,4	1,1
	18:1 n-9	16,6	14,5	13,7	1,8	1,3	0,9
	18:2 n-6	7,1	10,5	21,4	4,4	5,6	9,4
	18:3 n-6	0,1	0,1	0,1	-	-	-
	18:3 n-3	6,4	7,8	14,2	-	-	-
	20:4 n-6	-	-	-	0,1	0,2	0,7
	20:5 n-3	-	-	-	38,0	42,4	50,9
Sušina [g l⁻¹]		19,4	23,1	27,5	10,4	12,1	13,7

Výše diskutovaná práce by realizovaná za podpory grantů GACR 14-00227S, Ministerstvo průmyslu a obchodu ČR projekt :FR-TI1/456 a projektu IGA: A2 FPBT 2014 022, VŠCHT.

Literatura

Adarme-Vega, T. C., Thomas-Hall, S. R. a Schenk, P. M.: Curr. Opin. Biotechnol., 26, (2014).

Adeleye, Adeyemi S., Keller, Arturo A., Miller, Robert J. a Lenihan, Hunter S.: J. Nanopart. Res., 15, (2013).

Bligh, E. G. a Dyer, W. J.: Can. J. Biochem. Physiol., 37, (1959).

Dlouhy, A. C. a Outten, C. E. (2013). The Iron Metallome in Eukaryotic Organisms. In L. Banci (Ed.), *Metallomics and the cell* (Vol. 12, pp. 241-278). Netherland: Springer.

Hong, F., Yang, F., Liu, Ch., Gao, Q., Wan, Z., Gu, F., Wu, Ch., Ma, Z., Zhou, J. a Yang, P.: *Biol. Trace Elem. Res.*, 104, (2005).

Huang, Xuxiong, Wei, Likun, Huang, Zhengzheng a Yan, Jiaqi. *J. Appl. Phycol.*, (2013).

Kadar, E., Rooks, P., Lakey, C. a White, D. A.: *Sci. Total. Environ.*, 439, (2012).

Kang, Nam Kyu, Lee, Bongsoo, Choi, Gang Guk, Moon, Myounghoon, Park, Min S., Lim, JitKang a Yang, Ji-Won. *Korean J. Chem. Eng.*, (2014).

Keenan, C. R., Goth-Goldstein, R., Lucas, D. a Sedlak, D. L.: *Environ. Sci. Technol.*, 43, (2009).

Keller, A. A., Garner, K., Miller, R. J. a Lenihan, H. S. (2012). Toxicity of nano-zero valent iron to freshwater and marine organisms. *PloS ONE*, 7.

Lee, Ch., Kim, J.Y., Lee, W.L., Nelson, K.L., Yoon, J. a Sedlak, D.L.: *Environ. Sci. Technol.*, 42, (2008).

Mahajan, Pramod, Dhoke, S. K. a Khanna, A. S.: *J. Nanotechnol.*, 2011, (2011).

Ratledge, C.: *Biochemie*, 86, (2004).

Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. a Tredici, M. R.: *Biotechnol. Bioeng.*, 102, (2009).

Ševců, A., El-Temsah, Y. S., Joner, E. J. a Černík, M.: *Microbes. Environ.*, 26, (2011).

Zehnder, A. Z. *Hydrol.*, 23, (1961).

Biotransformační příprava estrogeně aktivního 8-prenylnaringenin

Hudcová T., Skoupá H., Patáková P., Dostálek P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Úvod

Chmel otáčivý (*Humulus lupulus* L.) z čeledi konopovitých (*Cannabaceae*) se v současnosti pěstuje jako kulturní rostlina, zejména jako surovina pro výrobu piva. Jeho divoká forma byla však využívána již od nepaměti i jako léčivá rostlina. Farmaceuticky významnými látkami chmele jsou zejména prenylované flavonoidy, které se řadí do skupiny polyfenolů, nicméně díky své prenylované skupině mají na rozdíl od ostatních polyfenolů více nepolární charakter a hromadí se společně s hořkými kyselinami v lupulinových žlázkách chmele (Stevens a Page, 2004). Mezi majoritní prenylflavonoidy chmele patří xanthohumol (0,2-1,1 %hm. v sušině chmelových hlávek) a desmethylxanthohumol (0,04-0,36 %hm. v sušině chmelových hlávek) (Karabín a kol., 2012; Nikolić a Van Breemen, 2013).

Prenylflavonoidy vykazují antioxidační účinky, čímž chrání před účinky škodlivých volných radikálů, a chrání tak před kardiovaskulárními onemocněními jako je například ateroskleróza. Pozornost je v posledních letech zaměřena rovněž na výzkum antikarcinogenních účinků prenylflavonoidů. Mnohé studie již potvrdily, že prenylflavonoidy účinně inhibují proliferaci nádorových buněk a zabraňují tak růstu karcinomu a vzniku metastáz. Tyto sloučeniny se aktivně podílejí na inhibici karcinogeneze, a to v počáteční, v propagační i v pozdní fázi bujení (Gerhäuser C., 2005). *Antiproliferační aktivita prenylflavonoidů in vitro na lidské nádorové buněčné linie byla prokázána například na rakovinné buňky prsu (MCF7), vaječníků (A2780) a tlustého střeva (HT29) (Miranda a kol, 1999).* Dalším významným účinkem chmelových látek je jejich fytoestrogení aktivita, již vykazuje zejména 8-prenylnaringenin.

Díky prokázaným pozitivním účinkům na lidské zdraví lze očekávat, že by preparáty na bázi chmelových prenylflavonoidů mohly hrát v budoucnu významnou roli v boji proti nádorovým onemocněním či jako doplňky stravy pro překonání negativních symptomů klimakteria.

Estrogení účinky prenylflavonoidů

V poslední době je pozornost věnována chmelu jako bohatému zdroji fytoestrogenů, což jsou látky se schopností napodobovat aktivitu samičích pohlavních hormonů, jejichž produkce rapidně klesá, a to především v období klimakteria. Estrogení aktivita se projevuje především schopností komunikovat s estrogeními receptory (ER α a ER β). Nedostatečná produkce estradiolu

v tomto období má dopad na úbytek kostní hmoty (osteoporóza). Na zmírnění těchto potíží se používá především substituční hormonální terapie, která má ale na druhou stranu řadu negativních dopadů, v řadě případů zvyšuje pravděpodobnost výskytu karcinomu prsu či dělohy. Využití chmelových prenylflavonoidů se může stát alternativním řešením těchto obtíží. Estrogenní vlastnosti prenylflavonoidů mohou být vedeny v zásadě dvojím způsobem. První možností je jejich vazba na specifické estrogenní receptory, druhou cestou je pak schopnost fytoestrogenů působit jako enzymové efekторы (Lapčík a Sosvorová, 2011).

Majoritní prenylované flavonoidy chmele (xanthohumol, desmethylxanthohumol) nedisponují významnou estrogenní aktivitou, nicméně jednoduchou isomerační přeměnou za zvýšené teploty vznikají estrogenně aktivní prenylované flavanony. Jednou z nejdůležitějších isomeračních reakcí této skupiny látek je přeměna estrogenně neaktivního desmethylxanthohumolu na směs aktivních estrogenů 6-prenylnaringenin a 8-prenylnaringenin. Jejich isomerační poměr je obvykle udáván v poměru 3:2 ve prospěch 6-prenylnaringenin (Chadwick a kol., 2004). 8-prenylnaringenin je považován za jeden z nejúčinnějších dosud izolovaných fytoestrogenů, vykazující stokrát vyšší aktivitu než fytoestrogen genistein. Slabé estrogenní účinky byly taktéž prokázány u isoxanthohumolu, který navíc podléhá v trávicím traktu demethylaci na 8-prenylnaringenin, což významně zvyšuje estrogenní potenciál chmele (Possemiers a kol., 2005, 2006, 2008).

Zdroje 8-prenylnaringenin

Pivo je jediným zdrojem chmelových prenylflavonoidů v potravě, ovšem vzhledem k již nízkým obsahům 8-prenylnaringenin ve chmelu (~0,0016 %hm.), není překvapivé, že obsah 8-prenylnaringenin v pivu je téměř zanedbatelný. Bylo zjištěno, že koncentrace 8-prenylnaringenin v pivu odpovídá 10-20 %rel. množství této látky ve chmelu (Tekel' a kol., 1999).

Pro konzumenta tedy množství 8-prenylnaringenin přijaté z piva představuje jen bezvýznamný účinek na zdraví. Lidská mikroflóra tenkého střeva je však schopna přeměnit isoxanthohumol, jehož obsah v pivu je relativně vysoký (až 2 mg/l), na 8-prenylnaringenin, a to až s 80 % účinností. V účinné míře však této biotransformační přeměny je schopna pouze jedna třetina testovaných jedinců. Míra přeměny je však zcela individuální a je závislá na faktorech jako jsou věk, genetické vybavení a zdravotní stav jedince (Bolca a kol., 2007; Krofta, 2010; Possemiers a kol., 2006; Stevens a Page, 2004).

Biotransformační přeměna isoxanthohumolu na 8-prenylnaringenin

Významnou metabolickou přeměnou, jež byla zaznamenána, je transformace isoxanthohumolu na fytoestrogenní 8-prenylnaringenin (Obr. 1.) pomocí střevních bakterií, při níž dochází na 5' uhlíku k O-demethylaci isoxanthohumolu. Konečná koncentrace 8-prenylnaringenin v krevní plazmě

Tato práce byla podpořena TA ČR - Centrum pro inovativní využití a posílení konkurenceschopnosti českých pivovarských surovin a výrobků - TE02000177.

Literatura

Bolca S., Possemiers S., Maervoet V., Huybrechts I., Heyerick A., Vervarcke S., Depypere H., De Keukeleire D., Bracke M., De Henauw S., Verstraete W., Van de Wiele T. (2007) Microbial and dietary factors associated with the 8-prenylnaringenin producer phenotype: A dietary intervention trial with fifty healthy post-menopausal caucasian women. *British Journal of Nutrition*, 98, str. 950-9.

Gerhäuser C. (2005) Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49, str. 827-831.

Chadwick, L.R., Pauli, G.F., Farnsworth, N.R. (2004) The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine*, 13, str. 119-131.

Jurková M., Čejka P., Houška M., Mikyška A. (2013) Simultánní stanovení prenylflavonoidů a isoflavonoidů ve chmelu a pivu metodou HPLC-DAD: Studie aplikace homogenátu zeleného chmele v pivovarském procesu. *Kvasný průmysl*, 59, str. 41-49.

Karabín M., Hudcová T., Jelínek L., Dostálek P. (2012) Význam chmelových prenylflavonoidů pro lidské zdraví. *Chemické listy*, 106, str. 1095–1103.

Krofta K. (2010) Obsah prenylovaných flavonoidů chmele v českých a zahraničních pivech. *Kvasný Průmysl* 56, str. 2-9.

Lapčík, O., Sosvorová, L. (2011) Fytoestrogeny a jejich využití v menopauze. *Interní Medicína pro Praxi*, 13, 1, str. 38 – 42.

Miranda C. L., Stevens J. F., Helmrich A., Henderson M. C., Rodriguez R. J., Yang Y.-H., Deinzer M. L., Barnes D. W., Buhler D. R. (1999) Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 37, str. 271-285.

Nikolić, D., Van Breemen, R. B (2013) Analytical methods for quantification of prenylated flavonoids from hops. *Current analytical chemistry*, 9, str. 71 – 85.

Possemiers S., Bolca S., Grootaert Ch., Heyerick A., Decroos K., Dhooge W., De Keukeleire D., Rabot S., Verstraete W., Van de Wiele T. (2006) The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated

into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. *Journal of Nutrition*, 136, str. 1862-1867.

Possemiers S., Heyerick, A. Robbens V., De Keukeleire D., Verstraete W. (2005) Activation of proestrogens from hops (*Humulus lupulus L.*) by intestinal microbiota; Conversion of isoxanthohumol into 8-prenylnaringenin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, str. 6281-6288.

Possemiers S., Rabot S, Espin J. C., Bruneau A., Philippe C., Gonzalez-Sarrias A., Heyerick A., Tomas-Barberan F. A., De Keukeleire D., Verstraete W. (2008) *Eubacterium limosum* activates isoxanthohumol from hops (*Humulus Lupulus L.*) into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in rat intestine. *Journal of Nutrition*, 138, str. 1310-1316.

Stevens J.F., Page J.E. (2004) Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*, 65, str. 1317-1330.

Tekel' J., De Keukeleire D., Rong H., Daeseleire E., Van Peteghem, C. (1999) Determination of the hop-derived phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, in beer by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 12, str. 5059-5063.

Vliv kultivačních podmínek na produkci a sekreci fúzního proteinu trypsinogen-GFP kvasinkou *Pichia pastoris*

Raschmanová H., Branská B., Paulová L.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Předmětem práce bylo sledování vlivu kultivačních podmínek (pH, specifické růstové rychlosti, způsobu přítokování média) na produkci a sekreci fúzního proteinu vepřový trypsinogen-fluorescenční protein EGFP, jenž byl naklonován pod kontrolu methanolem indukovatelného alkoholoxidasového promotoru kvasinky *Pichia pastoris*. Byl izolován čistý EGFP, jenž byl následně využit jako standard při analýze produkce fúzního proteinu, a byl připraven protokol umožňující současné stanovení viability produkčního kmene a intracelulárního obsahu EGFP metodou průtokové cytometrie. Ve vsádkových kultivacích byly určeny maximální specifické růstové rychlosti produkčního kmene na glycerolu ($\mu_{\max} = (0,210 \pm 0,024) \text{ h}^{-1}$) a methanolu ($\mu_{\max} = (0,076 \pm 0,005) \text{ h}^{-1}$) a byly provedeny přítokované kultivace s konstantní nebo exponenciální rychlostí přítokování substrátu při dvou hodnotách pH (5,0 a 5,9). Bylo zjištěno, že při obou hodnotách pH bylo dosaženo stejného nárůstu biomasy, ale při pH 5,9 bylo produkováno 1,7krát více proteinu. Nejvyšší koncentrace trypsinogenu v médiu (82 mg.l^{-1}) bylo dosaženo při pH 5,9 a exponenciálním schématu přítokování se specifickou růstovou rychlostí na methanolu $0,013 \text{ h}^{-1}$.

Betulinová kyselina a její deriváty

Hozová G., Šusteková J., Wimmer Z.

Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Předmětem této práce byla příprava derivátů betulinové kyseliny v pozicích C(28) a C(3). Prvním krokem, při přípravě amidů v pozici C(28), byla aktivace karboxylové skupiny přeměnou na chlorid kyseliny, který je dostatečně reaktivní. Tento chlorid byl připraven reakcí 3-*O*-acetylbetulinové kyseliny s oxalylchloridem v dichlormethanu. Následovaly konjugační reakce s příslušnými methylestery aminokyselin, chráněným i nechráněným ethylendiaminem, kde byl použit dichlormethan jako rozpouštědlo a diisopropylethylamin jako promotor. Při přípravě esterů v pozici C(3) reagoval benzyl-(3 β)-3-hydroxylup-20(29)-en-28-oát s příslušnými anhydridy (sukcinanhydrid a glutaranhydrid) v přítomnosti 4-dimethylaminopyridinu, jako rozpouštědlo byl použit suchý pyridin. Struktura připravených látek byla potvrzena analýzou pomocí NMR. U 2 vybraných sloučenin byly změřeny UV spektra.

Využití *Pythium oligandrum* jako biofungicidu ve sladařství

Řezanina J., Poštulková M., Dostálek P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Rozvoj plísňové kontaminace během sladařského procesu může být eliminován kromě chemických a fyzikálních metod rovněž metodami biologickými.

Cílem této práce bylo porovnat biofungicidní účinek mykoparazitické oomycety *Pythium oligandrum*, která zatím nachází využití zejména v zemědělství, a vláknité houby *Geotrichum candidum*, jež se již běžně využívá ve sladovnách. Experiment probíhal na ječmeni sladovaném v mikrokultivačním zařízení, kde byl sledován rozvoj plísni *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* a *Fusarium graminearum* v závislosti na použitém biofungicidu. Pro kvantifikaci těchto plísni v jednotlivých fázích sladovacího procesu bylo využito polymerázové řetězové reakce v reálném čase, která umožňuje přesné stanovení počtu molekul DNA daného taxonu. Během experimentální práce byla potvrzena vyšší biofungicidní účinnost oomycety *Pythium oligandrum* ve srovnání s biofungicidem *Geotrichum candidum*. Dále byla provedena optimalizace aplikace *Pythium oligandrum* a bylo zjištěno, že po sprejování suspenze spor na začátku klíčení je tento biofungicid účinnější než při nalití této suspenze do máčecí vody.

Srovnání modelové predikce a skutečné adheze anaerobních bakterií kazících pivo na pevné substráty

Podolová N., Bittner M., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Striktně anaerobní bakterie rodu *Pectinatus* a *Megasphaera* se staly problémovými pivovarskými kontaminanty, což bylo zapříčiněno snižováním obsahu kyslíku v pivu za účelem zajištění jeho dlouhodobé senzorké a koloidní stability. Výskyt anaerobních bakterií v aerobních částech provozů je umožněn jejich inkorporací do mikrobiálních biofilmů. Cílem předložené práce bylo vytvořit predikci adheze bakterií *Pectinatus frisingensis* DMS 20465 a *Megasphaera cerevisiae* DMS 20461 podle teorie XDLVO na modelové nosiče a schopnost adheze následně ověřit experimentálně adhezními testy (10 mM a 100 mM roztok KCl, pH 6,15). Povrch modelových nosičů byl upraven tak, aby svými povrchovými vlastnostmi simulovaly materiály běžně používané v pivovarském průmyslu. Vyhodnocením adhezních testů obrazovou analýzou byly získány hodnoty osídlené plochy modelových nosičů. Predikce adheze bakterie *M. cerevisiae* na modelové nosiče podle teorie XDLVO se do značné míry shodovala s výsledky adhezních testů. Buňky v prostředí o iontové síle 10 i 100 mM nejnadhěji adherovaly na nosič s povrchovou úpravou APTES (hydrofobní povrch s pozitivním povrchovým nábojem), která simuluje opotřebovanou nerezavějící ocel, typ podlah používaných v potravinářském průmyslu či povrch exopolymerních substancí. Dále adheze buňky se záporným povrchovým nábojem (*M. cerevisiae*) na nosič s kladným povrchovým nábojem (APTES sklo) poukazuje na význam elektrostatických interakcí během adheze. Predikce adheze bakterie *P. frisingensis* na modelové nosiče podle teorie XDLVO se s adhezními testy neshodovala, což je zřejmě způsobeno odlišností buňky studovaného mikroorganismu od ideální částice, pro kterou byl model XDLVO sestaven (rozdílný tvar, velikost bakterie, přítomnost bičíků na jedné straně buňky). Bakterie *P. frisingensis* v prostředí o iontové síle 10 i 100 mM nejnadhěji adherovala na nosič s povrchovou úpravou PTES (mírně hydrofobní povrch s negativním povrchovým nábojem), která simuluje povrchy některých plastů a lubrikantů. Vyšší adheze bylo ve všech adhezních testech pro obě anaerobní bakterie dosaženo v prostředí o vyšší iontové síle.

Prostředky modulace biodegradativní funkce

Koukalová M., Ježdík R., Jirků V.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Kontaminace půdy a spodních vod hydrofobními sloučeninami přináší velmi důležité otázky týkající se možnosti jejich odstranění co nejšetrnějším způsobem. Biodegradace hydrofobních látek se navrhuje jako efektivní, ekonomická a ekologická technologie, ačkoli jejich biologická dostupnost mikroorganismům bývá limitujícím faktorem během procesu biodegradace. Hledání možností zlepšení bioremediace polutantů v životním prostředí je motivováno jejich velkou distribucí, nízkou biologickou dostupností, vysokou perzistencí v půdě a jejich potenciálně nepříznivým účinkem na lidské zdraví (Cameotra a Makkar, 2010; Whang a kol., 2008).

Biologickou dostupnost je možné vyřešit přidáním povrchově aktivních látek (surfaktantů), které sníží mezifázové napětí a zvýší biodostupnost hydrofobních polutantů. Použití biosurfaktantů místo chemických surfaktantů přináší mnohé výhody, například nízkou toxicitu a biologickou degradabilitu. Zároveň biosurfaktanty vynikají použitelností v prostředí s větším rozmezím pH a salinity (Bognolo, 1999). Tyto výhody dělají z biosurfaktantů vhodný prostředek ke zlepšení biodegradace. Použití biosurfaktantu je však zatím spíše prozkoumáno u čistých chemických látek, jako například tetradekan, pentadekan, hexadekan, oktadekan nebo naftalen. Co se týče účinků na biodegradace směsí, jsou zatím informace velice omezené (Whang a kol., 2008). Tato práce je zaměřena na možnosti modulace podmínek biodegradace hydrofobních látek přidavkem rhamnolipidů. Pro biodegradace byly použity bakteriální kmeny izolované z vysoce kontaminované oblasti v Rakousku. Jako modelové hydrofobní látky byly použity MEŘO, LIO C18, HC 68 a CITRÁT. Pro modulaci biodegradace byly přidány rhamnolipidy produkované *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter asburiae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, u kterých byla již dříve sledována produkce rhamnolipidů a byly stanoveny vlastnosti produkovaných rhamnolipidových směsí.

Materiál a metody

Použité mikroorganismy

Pro degradace bylo použito 7 bakteriálních kmenů izolovaných z půdy vysoce kontaminované oblasti – biodegradační plocha společnosti ABR, Schwadorf, Rakousko.

Použité biosurfaktanty

Rhamnolipid produkovaný bakterií *Pseudomonas aeruginosa*, připravovaný v laboratoři. Kritická micelární koncentrace 26 mg/l (rhamnosy).

Modelové substráty degradace

CITRÁT – tri-(2-ethylhexyl) citrát, syntetické ekologické mazivo, hydroskopická látka.

LIO C18 – směs lineárních interních olefinů s počtem osmnácti uhlíků v molekule, výroba katalytickou izomerací alfaolefinů.

MEŘO – methylestery řepkového oleje.

HC 68 – minerální základový olej používaný pro přípravu motorových olejů, obsahuje monocykloalkany s dlouhými řetězci.

Kapalná média

médium pro degradaci olejů

KH_2PO_4 0,17 g/l

K_2HPO_4 0,13 g/l

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,71 g/l

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,34 g/l

1 ml roztoku stopových prvků:

$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 1 g/l

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,26 g/l

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,6 g/l

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 2 g/l

Použité metody

Monokoloniová izolace degradérů

Vzorky půdy byly suspendovány v živném bujónu a kultivována na třepačce s frekvencí otáček 100 min^{-1} , 48 hodin při teplotě 30°C . Buněčná populace byla použita k přípravě ředící řady a takto naředěná populace byla nanesena na živný agar. Získané kolonie byly použity jako monokoloniové izoláty, které byly dále konzervovány

Příprava inokula

100 ml sterilního komplexního média (živný bujón, L-B médium) bylo inukolováno buněčnou populací z povrchu agarové vrstvy a kultivováno na třepačce s frekvencí otáček 100 min^{-1} , 24 hodin při teplotě 30°C . Získaná buněčná populace byla separována centrifugací (9660 g, teplota 10°C , 10 min.) a promyta sterilním minimálním médiem. Tato buněčná suspenze byla použita k zaočkování minimálních médií pro degradace olejů.

Baňkové kultivace (degradace olejů)

Kultivace v Erlenmayerových baňkách (250 ml) probíhala za aerobních podmínek na třepačce (100 min^{-1}) ve sterilním minimálním médiu BSM o objemu 100 ml, do kterého byl přidán jeden z olejů (CITRÁT, MEŘO, HC 68, LIO C18) o koncentraci 1% obj., případně pro modulaci biodegradace jeden z rhamnolipidů (od producentů *Acinetobacter calcoaceticus* B-59190, *Enterobacter asburiae* B-59189 a *Pseudomonas aeruginosa* B-59188, dále označovány jako RL-A.c., RL-E.a. a RL-P.a.) v koncentraci odpovídající KMK nebo v koncentraci, která odpovídala 70% hodnoty KMK. Kultivace probíhala při konstantní teplotě 30°C . K inokulaci byla použita odstředěná a promytá

buněčná suspenze. Baňky byly zaočkovány tak, aby hodnota optické density při 400 nm byla $0,2 \pm 0,02$.

Výsledky a diskuze

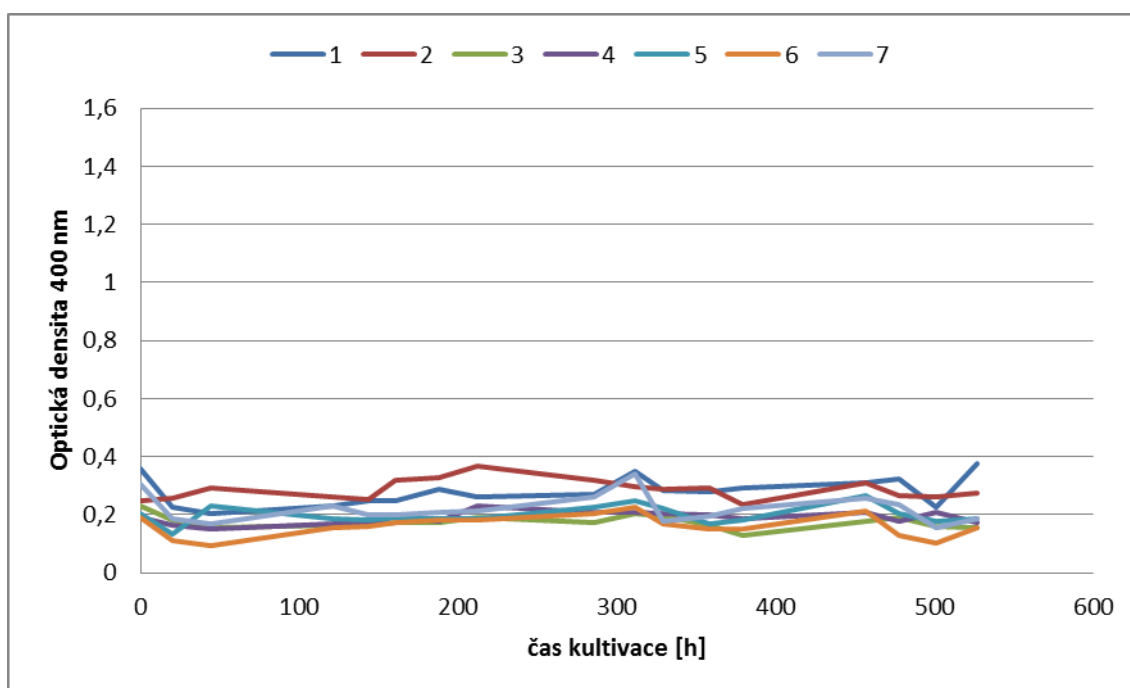
Izolace degradérů

Izolace bakteriálních kmenů, které byly použity pro degradace, byla provedena podle výše zmíněného postupu (viz výše). Volba primárních monokoloniových izolátů vycházela z odlišné morfologie kolonie. Tyto izoláty byly základem sedmi dále vedených agarových konzerv buněčné populace (opakované pasážování). Tyto izoláty nebyly taxonomicky identifikovány a jsou v této práci dále označeny jako izoláty 1 – 7.

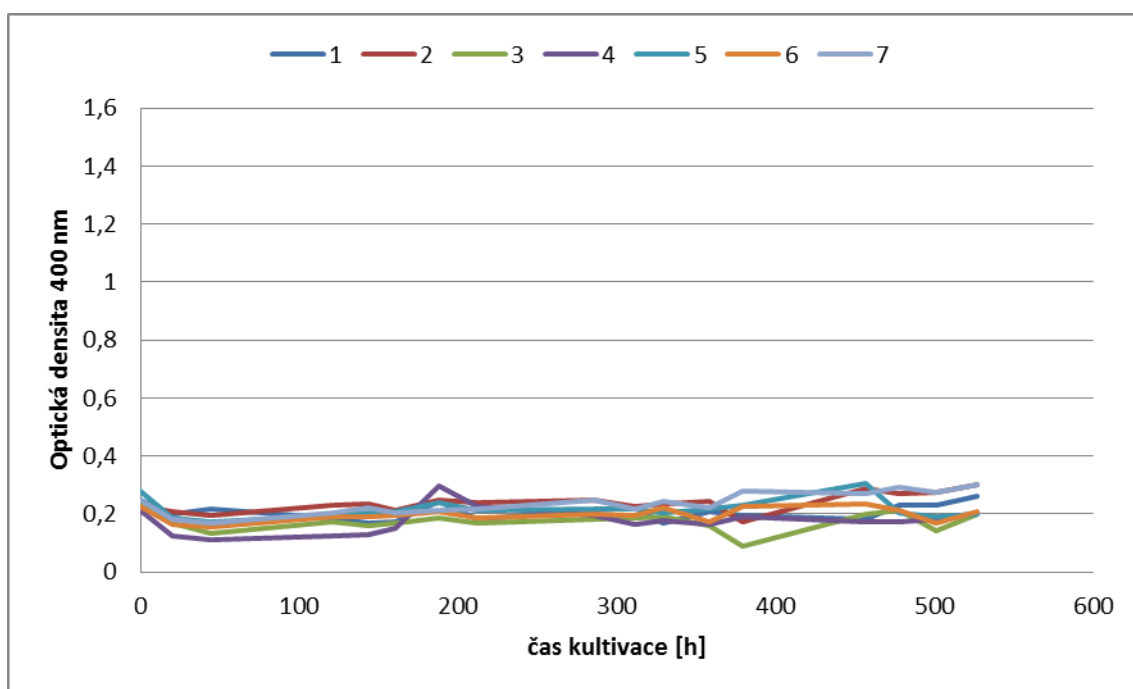
Degradace hydrofobních substrátů

U všech izolovaných kmenů byl předpoklad schopnosti utilizace (biodegradace) hydrofobních polutantů, vzhledem k jejich původu. Proto u nich byla sledována schopnost utilizace (biodegradace) přidaných olejů (postup viz výše). Jelikož zvolené hydrofobní substráty byly použity jako jediný zdroj uhlíku a energie, lze předpokládat, že nárůst biomasy je úměrný degradaci substrátu.

Obr. 1. - 4. znázorňují nárůst biomasy (vyjádřené jako optická densita) všech izolovaných kmenů na jednotlivých substrátech (olejích) v závislosti na čase.

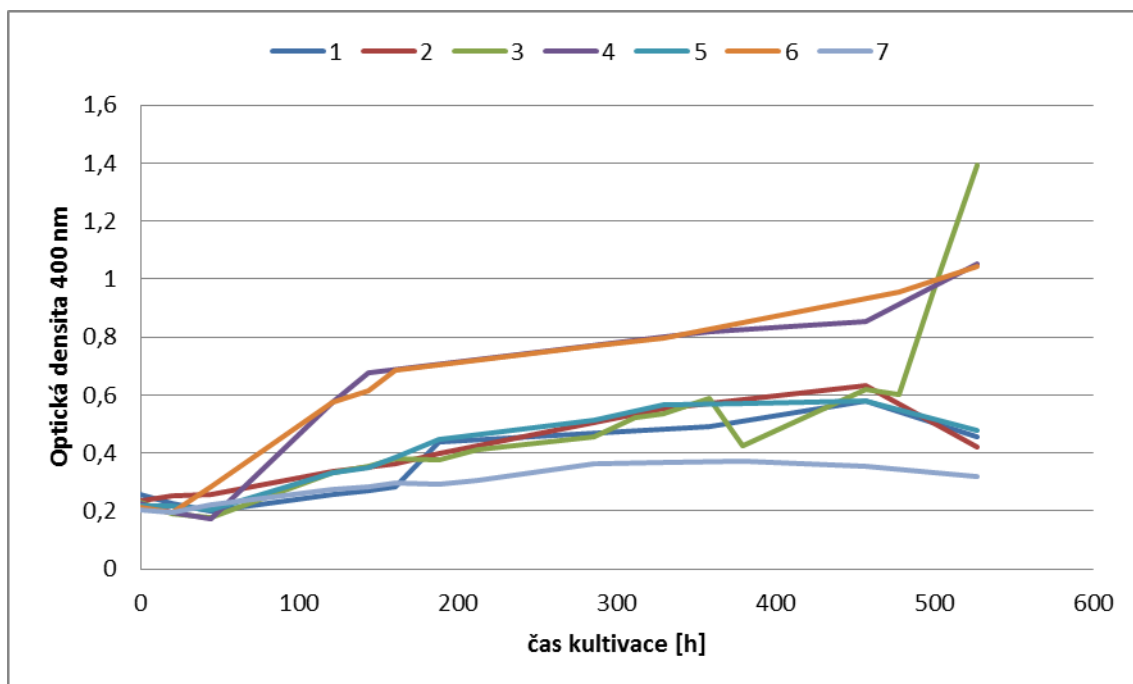


Obr. 1 Reprodukce buněčné populace v přítomnosti substrátu CITRÁT (jediný zdroj uhlíku).

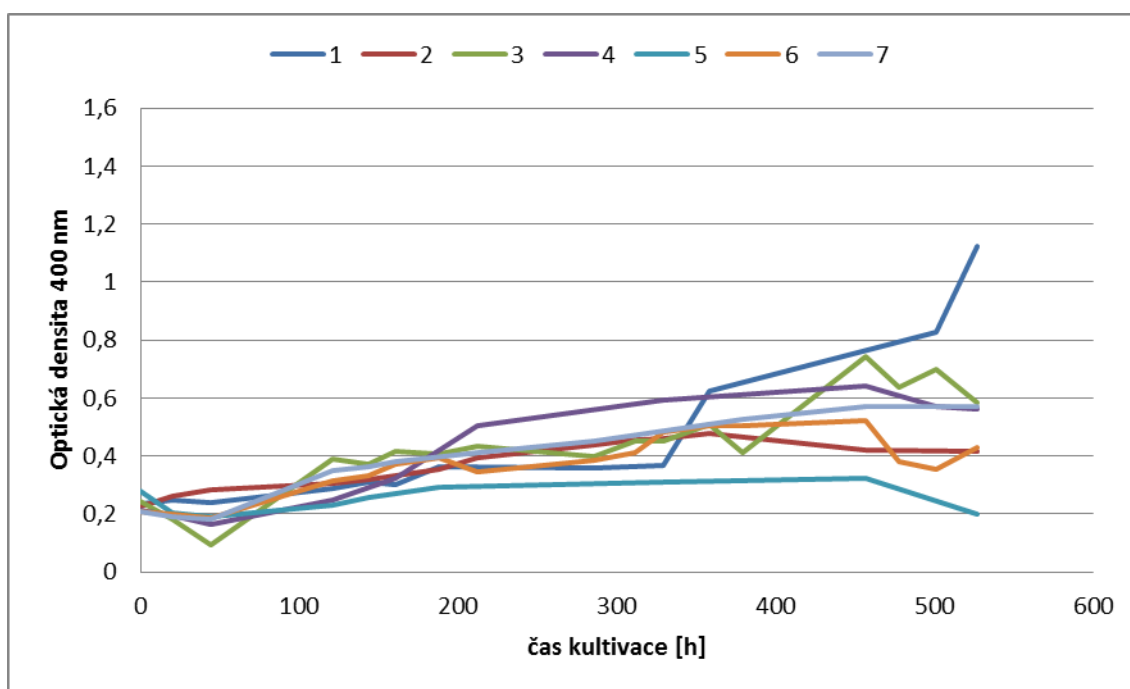


Obr. 2 Reprodukce buněčné populace v přítomnosti substrátu HC 68 (jediný zdroj uhlíku).

Při kultivaci izolovaných kmenů na substrátech HC 68 a CITRÁT nebyl zaznamenán významný rozdíl koncentrace biomasy (Obr. 1 a 2). Z těchto výsledků lze předpokládat, že bakterie nejsou schopné využít tyto substráty jako jediný zdroj uhlíku a energie v dostatečné míře a tudíž nelze tyto bakteriální kmeny považovat za vhodné degradéry těchto látek.



Obr. 3 Reprodukce buněčné populace v přítomnosti substrátu MEŘO (jediný zdroj uhlíku).



Obr. 4 Reprodukce buněčné populace v přítomnosti substrátu LIO C18 (jediný zdroj uhlíku).

V případě substrátu MEŘO (Obr. 3) byl zaznamenán znatelný nárůst biomasy především kmeny č. 3, 4, 6, které převyšovali nárůst ostatních kmenů, zatímco kmen č. 7 během kultivace nevykazoval téměř žádný nárůst. Lze tedy předpokládat, že použité kmeny (vyjma č. 7) jsou schopné využít MEŘO jako jediný zdroj uhlíku a energie.

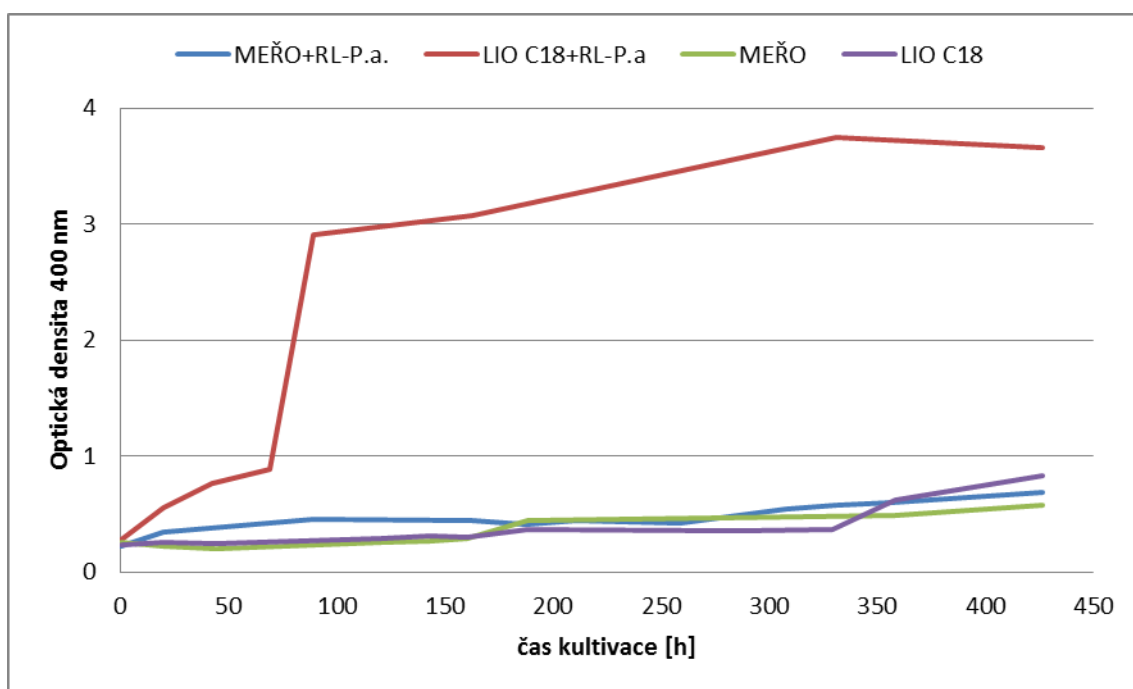
Při kultivaci bakteriálních kmenů na substrátu LIO C18 (Obr. 4) byl zaznamenán znatelný nárůst biomasy (nejvíce kmeny č. 1, 3, 4), oproti tomu kmen č. 5 nevykazoval významnou změnu v koncentraci biomasy.

Tyto experimenty popsané na Obr. 1.- 4. byly použity jako základní screening dekrativní funkce hydrofobních látek u izolovaných bakteriálních kmenů. Na základě těchto výsledků byly pro další modulace biodegradace vybrány substráty MEŘO a LIO C18.

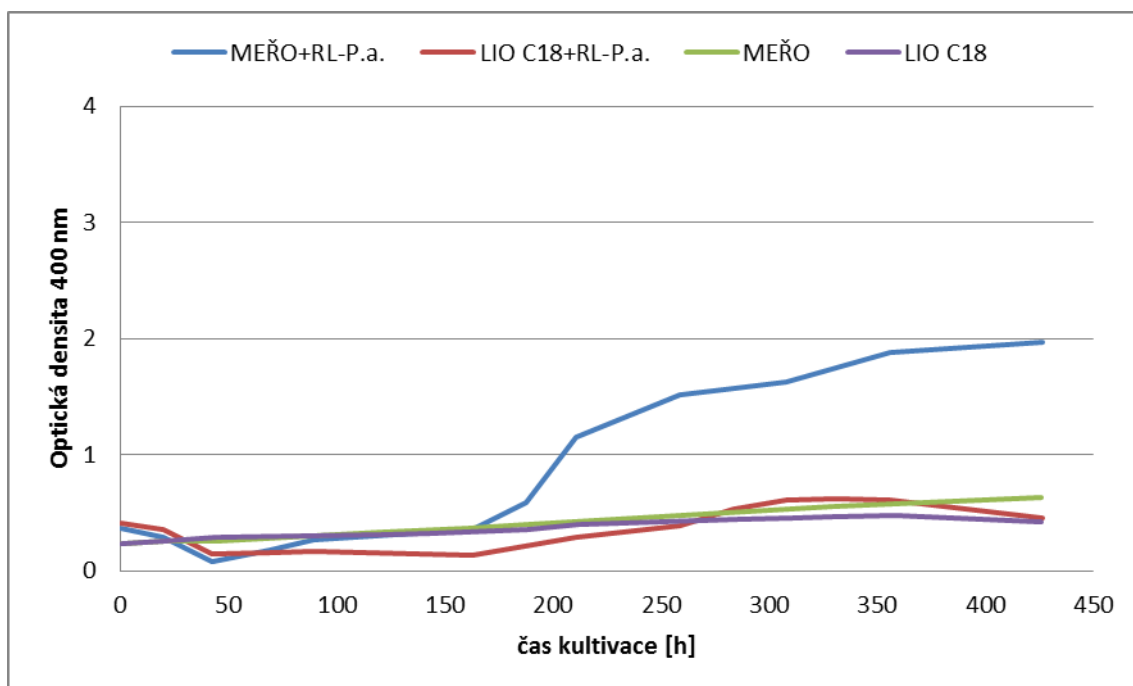
Utilizace modelových substrátů v přítomnosti rhamnolipidu v kritické micelární koncentraci

Kultivace pro modulaci biodegradace probíhala za stejných podmínek jako při degradaci olejů bez přidaného rhamnolipidu. Pro modulaci utilizace (biodegradace) olejů byl použit rhamnolipid (RL-*P.a.*) v koncentraci odpovídající KMK (26 mg/l rhamnosy).

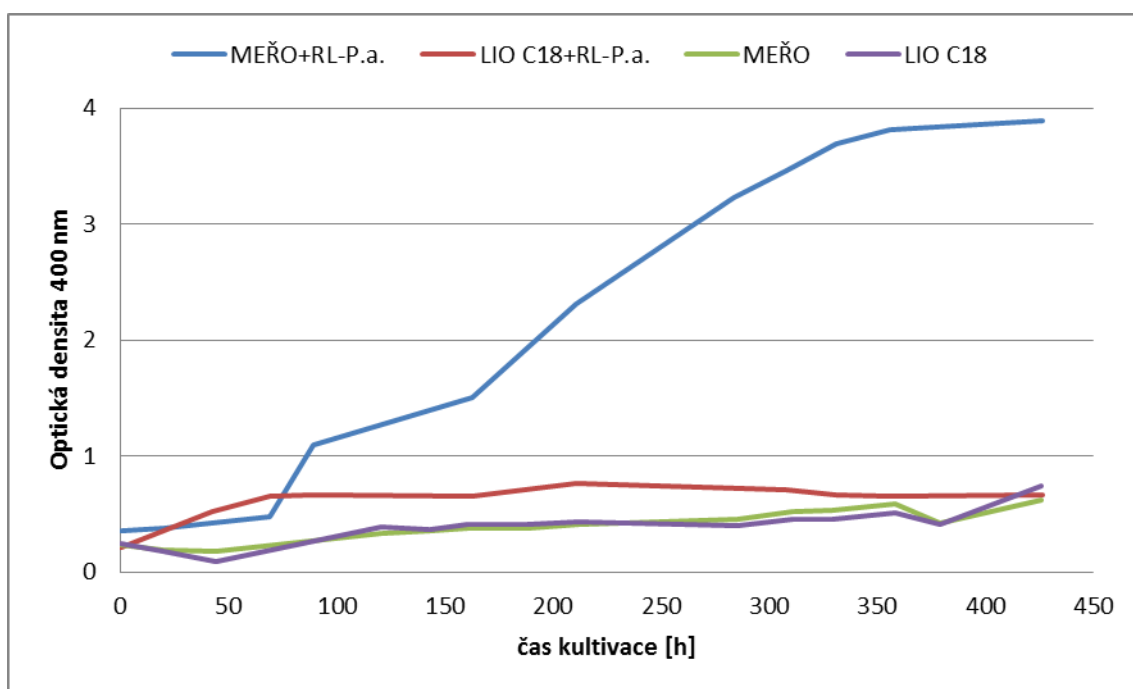
Obr. 5 – 11 znázorňují vliv přídavku rhamnolipidu do kultivačního média na nárůst biomasy (vyjádřené jako optická densita) jednotlivých bakteriálních kmenů při kultivaci na vybraných substrátech MEŘO a LIO C18.



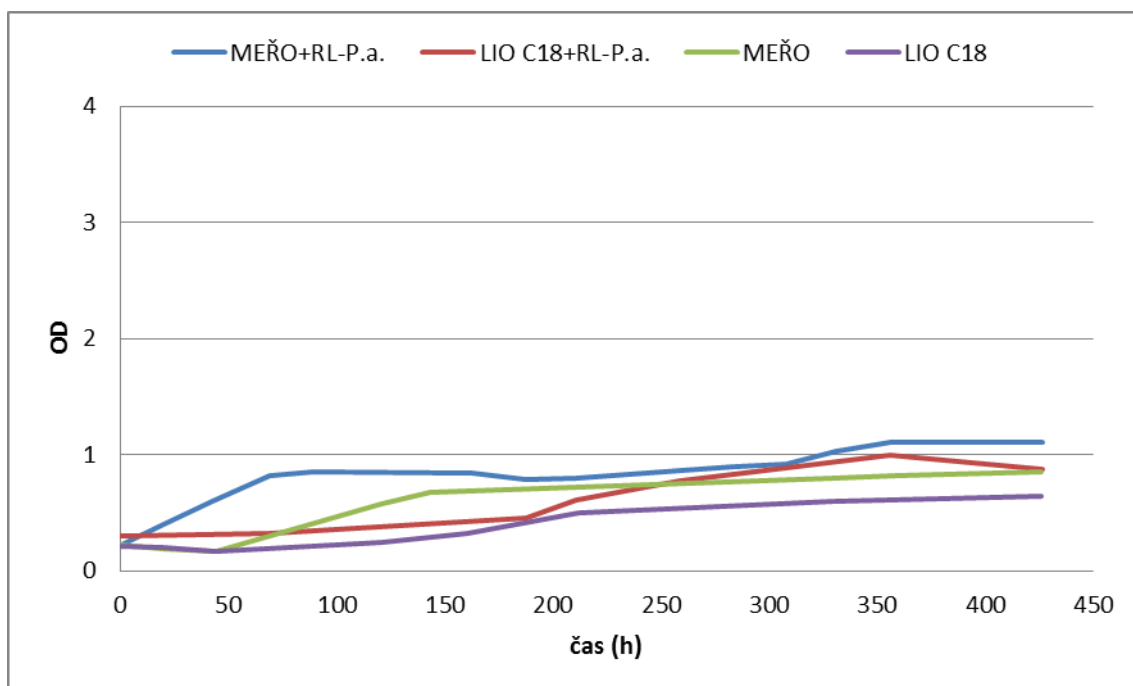
Obr. 5 Reprodukce buněčné populace kmene č. 1 v přítomnosti substrátů MEŘO a LIO C18 s RL-*P.a.* a bez RL.



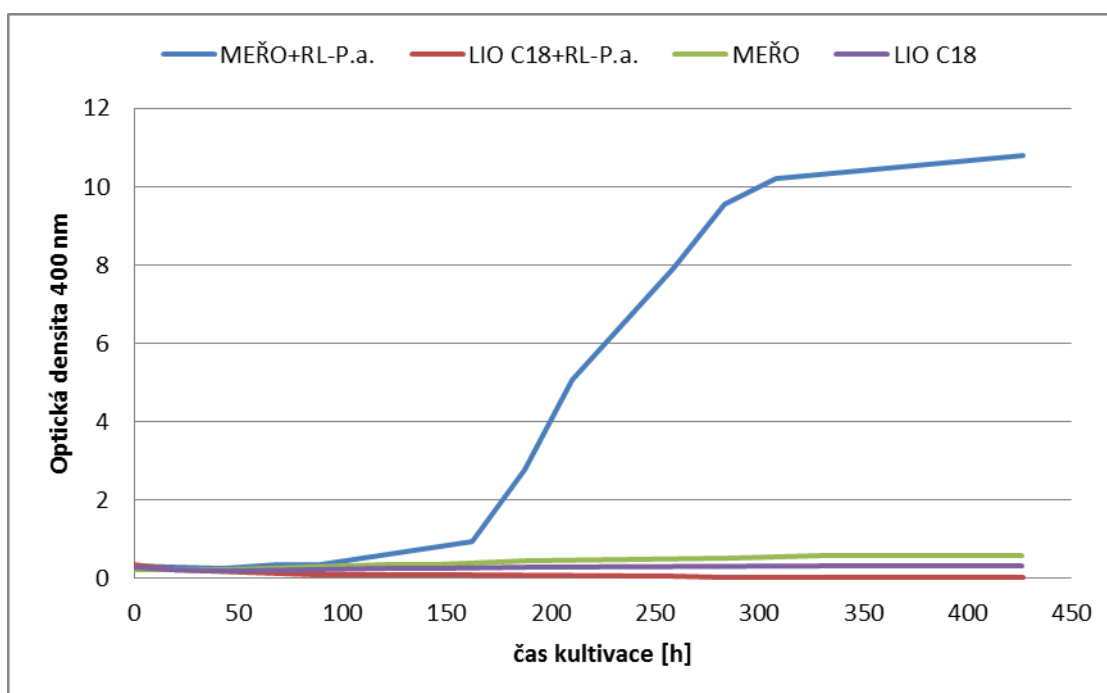
Obr. 6 Reprodukce buněčné populace kmene č. 2 v přítomnosti substrátů MEŘO a LIO C18 s RL-*P.a.* a bez RL.



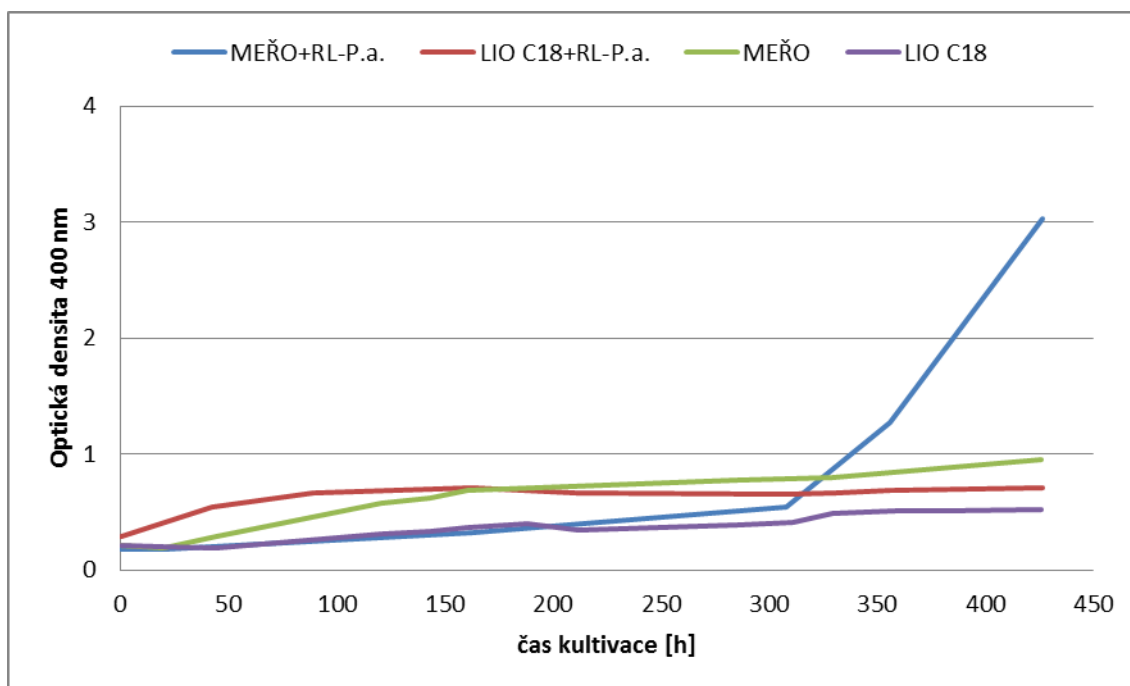
Obr. 7 Reprodukce buněčné populace kmene č. 3 v přítomnosti substrátů MEŘO a LIO C18 s RL-*P.a.* a bez RL.



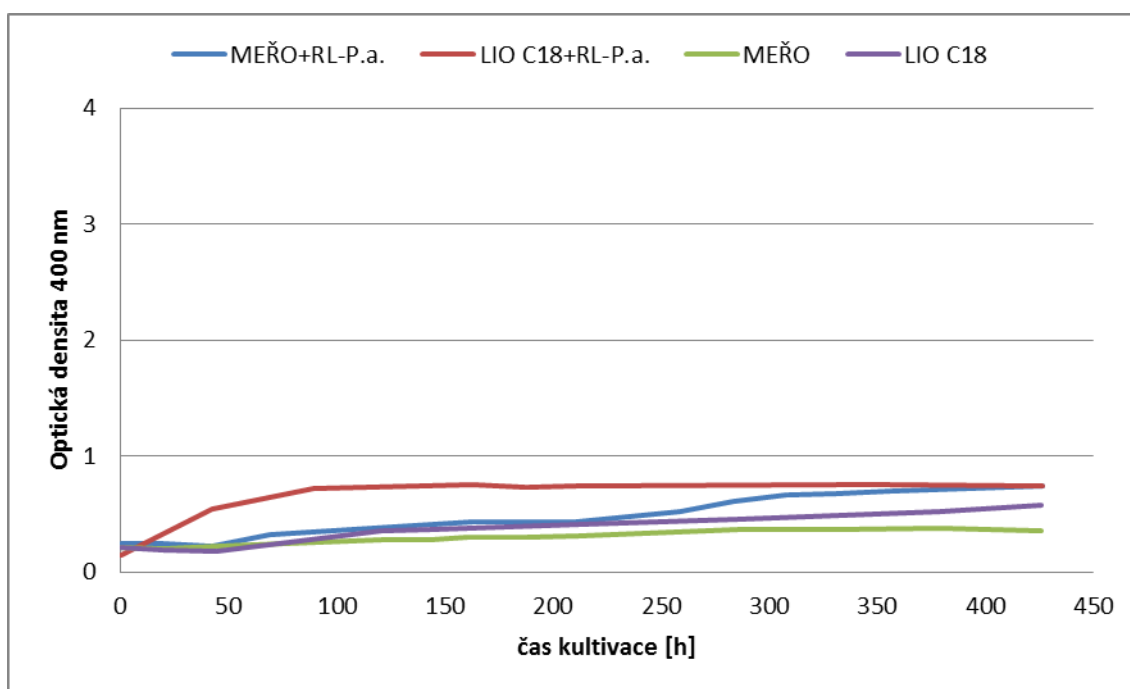
Obr. 8 Reprodukce buněčné populace kmene č. 4 v přítomnosti substrátů MEŘO a LIO C18 s RL-*P.a.* a bez RL.



Obr. 9 Reprodukce buněčné populace kmene č. 5 v přítomnosti substrátů MEŘO a LIO C18 s RL-*P.a.* a bez RL.



Obr. 10 Reprodukce buněčné populace kmene č. 6 v přítomnosti substrátů MEŘO a LIO C18 s RL-*P.a.* a bez RL.



Obr. 11 Reprodukce buněčné populace kmene č. 7 v přítomnosti substrátů MEŘO a LIO C18 s RL-*P.a.* a bez RL.

Při kultivaci kmenů č. 1, 4, 6 a 7 (Obr. 5, 8, 10, 11) na substrátu LIO C-18 bylo přidávkou rhamnolipidu dosaženo zvýšení nárůstu biomasy, zatímco u kmenů č. 2, 3, 5 (Obr. 6, 7, 9) se významný pozitivní vliv rhamnolipidu neprojevil. Při kultivacích bakteriálních kmenů na substrátu MEŘO se projevil významný vliv rhamnolipidu ve všech případech vyjma kmene č. 1 (Obr. 5). Kmeny č. 2, 3 a 6 (Obr. 6, 7, 10) vykazovaly více než dvojnásobný nárůst biomasy za přidavku rhamnolipidu. U kmene č. 5 (Obr. 9) byla zaznamenána enormní změna v nárůstu biomasy, proto má tento graf posunuté maximum osy Y oproti ostatním grafickým vyjádřením. U ostatních kmenů č. 2-7 přidavek rhamnolipidu zapříčinil znatelně vyšší nárůst biomasy (Obr. 6- 11).

Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že v případě izolovaných kmenů 1, 4, 5 a 7 měl přidavek rhamnolipidu rozdílný účinek. Kmen č. 1 měl výrazně větší nárůst biomasy na substrátu LIO C18 než na substrátu MEŘO. V případě kmenů č. 4 a 5 byl zaznamenán větší nárůst biomasy na obou substrátech. Kmen č. 5 po přidavku rhamnolipidu výrazně lépe rostl na substrátu MEŘO, zatímco na substrátu LIO C18 byl růst potlačen.

Závěr

Ze vzorku půdy kontaminované hydrofobními látkami bylo izolováno 7 bakteriálních kmenů, u kterých byla následně sledována schopnost utilizace 4 vybraných hydrofobních látek (MEŘO, LIO C18, CITRÁT, HC 68). Bakteriální izoláty vykazovaly žádnou degradativní schopnost v případě dvou hydrofobních látek (MEŘO, LIO C18). Tyto dva hydrofobní substráty byly následně použity na sledování vlivu přidavku rhamnolipidu na degradativní funkci izolovaných

bakteriálních kmenů. Bylo zjištěno, že efekt přidavku rhamnolipidu na degradaci zvolených substrátů je ovlivněn typem substrátu a druhem mikroorganismu.

Použitá literatura

Bognolo, G. (1999) Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons 152, str. 1-2

Cameotra S. S., Makkar R. S. (2010) Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants, Pure and Applied. Chemistry, 82, str. 97 – 116.

Whang L.-M., Liu P.-W. G., Ma Ch.-Ch., Cheng S.-S. (2008) Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil, Journal of hazardous materials, 151, str. 155 – 163.

Izolace a povrchové vlastnosti spor termofilních bakterií vyskytujících se jako kontaminanty v potravinářském průmyslu

Boledovičová P., Strejc J., Kyselová L.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Kontaminace potravin je závažným problémem napříč potravinářským průmyslem a to nejen z pohledu ekonomického, ale také z pohledu lidského zdraví. Termofilní bakterie jsou díky jejich charakteristickým vlastnostem (tvorba teplotně odolných spor, schopnost přežívat ve formě biofilmů) potenciálními kontaminanty řady potravinářských produktů a výrob. Cílem teoretické části této práce bylo shrnutí dosavadních poznatků spojených s výskytem termofilních bakterií, jmenovitě rodu *Alicyclobacillus*, *Bacillus* a *Geobacillus*, v potravinářském průmyslu. Experimentální část byla zaměřena na zjištění povrchových charakteristik zástupců kmenů *Alicyclobacillus* a *Geobacillus* pomocí měření kontaktních úhlů a zeta potenciálu vegetativních buněk i spor, na jejichž základě byla pomocí XDLVO teorie vyhodnocena pravděpodobnost adheze daných mikroorganismů na různé typy povrchů. Mezi studovanými modelovými nosiči byla zjištěna největší pravděpodobnost adheze mikroorganismů na silanizované sklo, tedy nosič s hydrofobním povrchem. U hydrolyzovaného skla je naopak nejnižší pravděpodobnost adheze testovaných mikroorganismů.

Přírodní látky jako nástroj regulující tvorbu biofilmu

Majdánková M., Schreiberová O., Čejková A.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Vzhledem k vzrůstající rezistenci bakterií a kvasinek vůči antibiotikům se vědci snaží nalézt jiné cesty vedoucí k léčbě perzistentních infekcí způsobených mikroorganismy žijícími v biofilmu. Rhamnolipidy jsou povrchově aktivní přírodní látky produkovány mikroorganismy, které mohou představovat nový směr v řešení problémů rezistence biofilmů vůči antibiotikům. Kombinace vhodných kombinací koncentrací antibiotika a rhamnolipidu může vést k inhibici tvorby biofilmu a eradikaci již zralého biofilmu.

Cílem práce bylo nalézt přírodní látky a jejich vhodné koncentrace, které posilují účinek antimikrobiálních látek. Stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) jak pro suspenzní populace, tak pro biofilm byla zjištěna schopnost látek inhibovat růst buněk, stanovením frakčních inhibičních koncentrací (FIC) pro suspenzní populace i biofilm pak vzájemné působení látek. Byl sledován vliv čistých látek i FIC látek na tvorbu biofilmu a zralý biofilm. Byly nalezeny kombinace koncentrací přírodní a antimikrobiální látky, které inhibovaly růst biofilmu a uvolňovaly buňky z již narostlého biofilmu.

Optimalizace kyselé předúpravy lignocelulózových materiálů pro biotechnologické využití

Kotúčová S., Paulová L., Rychtera M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Lignocelulózyvé materiály, jako jsou zemědělské odpadní materiály (v naší práci pšeničná sláma, hobliny topolu) nebo energetické rostliny (*Ozdo bnice čínská*) jsou biotechnologicky využitelné zejména na výrobu biopaliv. Optimalizací kyselé předúpravy biomasy jsme se snažili nalézt podmínky, které vedou k rozvolnění lignocelulózyvé struktury a zvýší se tak výtěžek glukózy po enzymové hydrolýze a etanolu po fermentaci. Kyselá předúprava metodou SPORL byla prováděna v přítomnosti 1 % kyseliny sírové a siřičitanu sodného a byl zkoumán vliv teploty předúpravy a přídávku siřičitanu sodného na složení hydrolyzátu. Zvýšení teploty předúpravy biomasy z 120°C na 180°C vede k delignifikaci pevné fáze biomasy a současně dojde ke zvýšení koncentrace inhibitorů v kapalně fázi. Zvýšení koncentrace siřičitanu sodného při předúpravě vede ke zvýšení stupně delignifikace a k poklesu koncentrace vznikajících inhibitorů. Enzymovou hydrolýzou pevné fáze po kyselé předúpravě při 180°C byl dosažen nejvyšší stupeň konverze celulózy na glukózu u vzorku pšeničné slámy, a sice 0,44 g.g⁻¹ a výtěžek etanolu po fermentaci bakterií *Zymomonas mobilis* 0,25 g.g⁻¹.

Interakce fenolických polutantů v průběhu mikrobiální degradace jejich směsí

Rádlová K., Karlová P., Páca J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Nitroaromatické sloučeniny jsou průmyslově důležité chemikálie využívané zejména pro výrobu farmaceutik, barviv, pesticidů nebo výbušnin. Kvůli jejich hojnému využití jsou častým zdrojem znečištění půdních a vodních ekosystémů. Mikrobiální odbourávání jednotlivých nitroaromatických látek bylo již poměrně dobře prozkoumáno, avšak dosud nejsou dostatečně popsány interakce nitroaromatických sloučenin při degradaci jejich směsí. Tato práce byla zaměřena na odbourávání 4-nitrofenolu ve směsi s jinými nitroaromatickými sloučeninami, 2-nitrotoluenem a 3-nitrotoluenem. Experimenty byly prováděny pomocí směsné bakteriální kultury imobilizované v náplňových bioreaktorech a volnými buňkami v třepaných baňkách. Nejsnáze utilizovatelným substrátem byl pro danou mikrobiální kulturu 4-nitrofenol, naopak 3-nitrotoluen byl degradován nejobtížněji. Bylo zjištěno, že degradace jednotlivých látek probíhá rychleji než látek ze směsí. Při experimentech ve vsádkovém uspořádání byl též pozorován vliv adaptace mikrobiální kultury. Kultura adaptovaná na směs obou mononitrotoluenů zpočátku degradovala ze směsi 2-nitrotoluen rychleji než 4-nitrofenol, avšak po určité době došlo k indukci degradace 4-nitrofenolu a zpomalení degradace 2-nitrotoluen. Výsledky experimentů prováděných v náplňových reaktorech byly ve shodě s experimenty v třepaných baňkách. 4-Nitrofenol byl odbouráván ze směsí s mononitrotolueny kompletně, zatímco 2-nitrotoluen a 3-nitrotoluen byly odbourány pouze částečně a účinnost odbourávání 3-nitrotolueny dokonce nepřesáhla 65 %.

Produkce kyseliny jantarové bakterií *Basfia succiniciproducens*

Sitnik I., Kolek J., Patáková P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Anaerobní, kapnofilní bakterie *Basfia succiniciproducens* DSM 22022, byla testována na schopnost produkce kyseliny jantarové. Při kultivaci v baňkách byl zkoušen vliv zdroje uhlíku, dusíku a množství neutralizačního činidla. Jako vhodná kombinace byla pro pokusy v bioreaktoru vybrána řepná melasa jako zdroj uhlíku, kukuřičný výluh („corn steep liquor“) jako komplexní zdroj dusíku a hydroxid sodný pro neutralizaci vznikající kyseliny jantarové. Oproti literárním výsledkům nebylo možné použít jako zdroj uhlíku glycerol. Nejlepším výsledkem při vsádkové kultivaci v bioreaktoru byla koncentrace kyseliny jantarové 20 g.l⁻¹, výtěžnost 58 % a produktivita tvorby kyseliny jantarové 0,72 g.l⁻¹.h⁻¹.

Biologická aktivita a struktura syntetických antimikrobiálních peptidů

Kubáňová Z., Lovecká P., Spiwok V.

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Znatelný nárůst rezistence patogenních bakterií, zaznamenaný v poslední době u všech druhů komerčně používaných antibiotik, vyústil v hledání nových přístupů k léčbě infekčních onemocnění. Jedním z možných řešení tohoto problému je využití antimikrobiálních peptidů. Tato práce se zabývá navrhováním a chemickou syntézou krátkých antimikrobiálních peptidů, testováním jejich biologické aktivity, a predikcí jejich struktury pomocí simulačních metod. Práce byla inspirována studií, ve které byly izolovány tři perspektivní rostlinné antimikrobiální peptidy z kokosového mléka. Z nich byl námi vybrán peptid Cn-AMP1, který vykazoval nejnižší MIC pro testované bakterie, a na základě tohoto vzoru byly syntetizovány dva peptidy, modifikované amidací a nebo substitucí poslední aminokyseliny. Peptidy byly připraveny metodou syntézy na pevné fázi, přečištěny pomocí RP-HPLC a potvrzeny hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. Biologická aktivita byla stanovena prostřednictvím přístroje Bioscreen C na 10 kmenech mikroorganismů (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *C. utilis*, *C. albicans* a *P. anomala*). Molekulová simulace peptidů a předpověď jejich prostorové struktury byla provedena metodami molekulové dynamiky, s využitím paralelního temperování.

Stanovení terpenických látek v pivu a pivovarských surovinách

Chrástná J., Jelínek L., Karabín M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Látky odvozené od chmelových silic jsou skupinou sloučenin, které se významně podílejí na sensorické kvalitě piva. Je proto nezbytné, aby existovala relativně jednoduchá a zároveň přesná metoda, schopná stanovit jejich obsah v pivu i meziproduktech jeho výroby. Během zpracování této práce, zaměřené na vývoj takové metody, byly navrženy vhodné parametry izolace terpenických látek z mladiny a piva založené na kombinaci destilace a moderních extrakčních (SPE) postupů. Na základě získaných poznatků byla stanovena opakovatelnost vyvíjené metody. Kromě toho byl pomocí této metody ověřen vliv chemického složení chmele na profil terpenických sloučenin obsažených v mladině a stanoven obsah terpenických látek v 7 různých světlých ležácích plzeňského typu.

Vyvinutá metoda by se měla stát základem pro nalezení souvislostí mezi použitým způsobem chmelení a charakteristickými sensorickými vlastnostmi jednotlivých druhů pív.

Aplikace netradičních metod pro zvýšení stability piva

Ivanišová M., Kotlíková B., Dostálek P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Úvod

Stabilita piva znamená schopnost udržet si po určitou dobu své senzorické a fyzikálně-chemické vlastnosti. Skládá se ze tří základních částí - biologické, senzorické a koloidní, přičemž souhrn těchto složek určuje dohromady dobu trvanlivosti. Za trvanlivost je běžně považována doba, po kterou během skladování při 20 °C nedojde ke vzniku viditelného zákalu. Ten může být jak biologického charakteru, tak fyzikálně-chemického (tvořený zákalotvornými prekurzory - bílkovinami a polyfenoly). V současné době se neustále zvyšují nároky na trvanlivost piva, zvláště pokud je určeno na export. U těchto produktů je požadována trvanlivost až jeden rok od stočení a po tuto dobu musí piva zůstat čirá a pokud možno bez chuťových změn (Karl a kol, 2005). Pro zajištění dobré biologické stability je nutné dodržovat zásady hygieny a sanitace během celé výroby tak, aby nedošlo k sekundární kontaminaci nežádoucími bakteriemi. Přírozenou koloidní stabilitu piva ovlivňují v první řadě vstupní suroviny a dále celý proces výroby, je tedy nutné dbát na výběr kvalitních surovin a dodržovat správně celý technologický postup. Neméně důležité je zajištění vhodných podmínek pro skladování piva, aby nedošlo k předčasné tvorbě zákalu (Lentini a kol., 2007).

Prvním krokem, jak zvýšit trvanlivost piva, je zpravidla filtrace. Tou jsou z roztoku odstraněny kvasinky, čímž se zvýší biologická stabilita, ovšem k dosažení dlouhodobé trvanlivosti je nutné dále použít mikrofiltraci, příp. pasteraci. Těmito metodami lze úspěšně odstranit či inaktivovat i případné bakteriální buňky a zajistit tak mikrobiologicky čisté pivo. Ke zvýšení stability fyzikálně-chemické je v praxi využívána řada metod, nejčastěji je to však adsorpce pomocí silikagelů (bílkoviny) či PVPP (polyfenoly). Tento způsob stabilizace je velmi účinný, je prováděn zároveň s filtrací a úpravou dávkování je možné dosáhnout požadované trvanlivosti. Nevýhodou těchto materiálů je jejich poměrně vysoká cena a ne příliš vysoká selektivnost. Spolu se zákalotvornými prekurzory jsou z roztoku odstraňovány i polyfenoly, které se na tvorbě zákalu příliš nepodílejí či pěnotvorné bílkoviny.

Předmětem zájmu se proto stávají fyzikální metody, kterými by bylo možno inaktivovat mikroorganismy bez tepelného zásahu či urychlit tvorbu zákalu v co nejvyšší možné míře, aby došlo k jeho vypadnutí z roztoku ještě během výroby piva. Tímto by bylo možno eliminovat předčasné stárnutí piva vlivem vysokých teplot, snížit náklady na stabilizační prostředky a především prodloužit trvanlivost piva (Bamforth 2001, Dostálek a kol., 2011).

Využití vysokofrekvenčního elektrického pole (PEF)

Jednou z možností je využití vysokofrekvenčního elektrického pole (PEF). Tato metoda má velký potenciál jako alternativní způsob prodloužení trvanlivosti potravin i nápojů z hlediska biologické stability. PEF technologie funguje na principu velmi krátkých vysokoenergetických elektrických pulzů (v řádu μs) (Gudmundsson a Hafsteisson, 2001; Vega-Mercado a kol., 1997). Dosavadní studie byly zaměřeny na mechanismus, jímž pulzní elektrické pole na vegetativní bakteriální buňky působí a na nalezení parametrů, při kterých je dosahováno nejvyšší efektivity inaktivace buněk. Bylo prokázáno, že hlavním mechanismem působení na buňky není zahřívání nebo elektrolýza (Knorr a kol., 1994), nýbrž vznik elektroporace cytoplasmatické membrány, která vede k permeabilizaci a následné destrukci mikroorganismu (Gudmundsson a Hafsteisson, 2001; Vega-Mercado a kol., 1997). Efektivita ošetření PEF za účelem inaktivace mikrobiálních buněk závisí nejvíce na faktorech jako je intenzita elektrického pole, celkový čas působení, počet aplikovaných pulzů a teplota ošetřované potraviny. V neposlední řadě je účinnost ovlivněna též typem cílového mikroorganismu (Bendicho a kol., 2002). S nárůstem intenzity elektrického pole vzrůstá velikost pórů a změny na cytoplasmatické membráně se stávají nevratnými. Pro mikroorganismy (velikost 1 – 10 μm) je kritické napětí v rozsahu 12-20 kV v závislosti na druhu buňky (Soliva-Fortuny a kol., 2009). Ke smrti mikroorganismu přispívají rovněž strukturní změny buněčných proteinů způsobené PEF. Pokud bylo na mikroorganismy působeno elektrickým polem s intenzitou vyšší, než je intenzita kritická, jsou na jejich membránách znatelné malé otvory a v důsledku toho lze pozorovat uvolnění proteinů do vnějšího prostoru buňky.

Doposud byl mechanismus působení a míra účinnosti PEF zkoumán především na mléku jako alternativa sterilace. Protože v této oblasti bylo pomocí PEF dosaženo poměrně dobrých výsledků, lze se domnívat, že by tato metoda mohla nalézt své uplatnění i v pivovarském průmyslu jako alternativa pasterace (Barsotti a kol., 2002; Soliva-Fortuny a kol., 2009; Vega-Mercado a kol., 1997). Vedou k tomu především závěry získané ze studie Bendicho a kol. z roku 2002, kde se uvádí, že přítomnost tukových micel do jisté míry chrání buňky, což by v případě použití této techniky pro stabilizaci piva nebylo překážkou. Dále byl ověřen vliv pH na efektivitu ošetření. Výsledky ukázaly, že při nižším pH (5,7) je dosahováno lepších výsledků než při pH vyšším (6,8). Z tohoto faktu plyne předpoklad, že efektivita tohoto ošetření s klesajícím pH narůstá, a proto by tato metoda při použití pro stabilizaci piva (česká piva mají pH v rozmezí 4,0 až 4,9) (Basařová a kol., 2010) mohla přinášet dobré výsledky.

Hlavní rozdíl mezi klasickou pasterací a PEF tkví v tom, že při použití elektrických pulzů nedochází k destrukci buněčných struktur, ale hlavním mechanismem inaktivace buněk je ztráta fyzikálně-chemických a biologických vlastností jejich cytoplasmatických membrán. Při elektronové mikroskopii

nebylo u buněk inaktivovaných pomocí PEF patrné poškození buněčných organel, zatímco u buněk ošetřených vysokou teplotou (66°C, 10 min) došlo v případě organel k masivní destrukci (Soliva-Fortuny a kol., 2009). Výsledky ukazují, že na usmrcení větších buněk, např. kvasničných, je zapotřebí méně intenzivní elektrické pole než na inaktivaci buněk malých, typicky bakteriální (Bendicho a kol., 2002).

Využití vysokého hydrostatického tlaku (HHP)

Další slibnou metodou se jeví využití vysokého hydrostatického tlaku. První tlakově ošetřená piva byla vyrobena v roce 1991. Vliv působení vysokého tlaku byl hodnocen jak z hlediska zvyšování stability biologické, tak i stability koloidní, přičemž efektivita použití tlaku pro inaktivaci buněk již byla potvrzena v mnoha potravinářských odvětvích. Jednou z hlavních předností aplikace tlaku za účelem zvýšení biologické stability potravin je minimální míra ovlivnění senzorických vlastností díky absenci působení vysokých teplot během ošetření. V současnosti je tento způsob stabilizace využíván zejména pro džemy a džusy (Dervisi a kol., 2001).

Působením vysokého tlaku na buňky dochází ke změnám vlastností cytoplasmatické membrány, ke kompresi vakuol, k oddělení buněčné membrány od buněčné stěny a k jejímu rozrušení (Rendueles a kol., 2011). Vysoký hydrostatický tlak také značně ovlivňuje funkčnost ribozomů, jelikož dochází k rozštěpení jejich podjednotek. Má se za to, že vliv HHP na ribozomy je hlavním faktorem způsobujícím inaktivaci mikroorganismů, protože buňky umírají, pokud počet funkčních ribosomů klesne pod určitou míru (Nivel a kol., 1999). Při vystavení buněk působení HHP dochází rovněž ke stabilizaci DNA, což má za následek zvýšení energie potřebné k disociaci dvoušroubovice a s tím spojené omezení transkripce a replikace, přičemž oba tyto pochody jsou pro přežívání a množení buněk nezbytné (Macgregor, 2002). Inaktivace ATPázy znamená ztrátu proton-motivní síly, membrána se stává propustnou pro H^+ a dochází ke změně acidobazické rovnováhy (Rendueles a kol., 2011). Gram-pozitivní buňky mají obecně vyšší odolnost proti vysokému hydrostatickému tlaku. Mechanismus inaktivace spor pomocí působení HP není dosud zcela zřejmý (Rendueles a kol., 2011).

Studie z roku 2005 (Buzrul a kol.) se zabývá porovnáním výsledků ošetření piva klasickou pasterací s efektem použití vysokého hydrostatického tlaku na míru imobilizace mikroorganismů. Piva byla ošetřena tlakem 350 MPa (doba působení 3 a 5 min, 20 °C) a teplotou 60 °C (doba 15 min) a ponechána v konstantních skladovacích podmínkách (ve tmě při 20 °C). Mikrobiologická stabilita piva ošetřeného pomocí HHP byla srovnatelná se stabilitou piva upraveného klasickou pasterací. Po 8 týdnech skladování byl u všech vzorků odebraných z tlakově či tepelně ošetřených piv konstatován nulový mikrobiální nárůst. Zároveň s vlivem HHP na biologickou stabilitu piva byl zkoumán i vliv na koloidní stabilitu. Při měření intenzity chlادového zákalu byla zjištěna větší

míra zakalení u pív, která byla ošetřena pomocí HHP, než u pív pasterovaných. Rovněž permanentní zákal byl výraznější u pív ošetřených pomocí tlaku. Hydrofobicita proteinů a tak i náchylnost k tvorbě komplexů polyfenol-polypeptid s postupující denaturací stoupá. Zvýšení hodnot zákalu po aplikaci HHP bylo proto pravděpodobně způsobeno vyšší mírou denaturace proteinů (Castellari a kol., 2000). Tato skutečnost vede k závěru, že ke zvýšené tvorbě chladového zákalu dochází již v průběhu výroby piva a tento zákal lze tedy snadno odstranit během filtrace piva. Tím dojde ke snížení zákalotvorných prekursorů v roztoku a zvýšení koloidní stability.

Využití ultrazvuku

Poslední metodou diskutovanou v tomto textu je využití ultrazvuku. Ultrazvukem rozumíme mechanické kmity o frekvenci vyšší než je frekvenční mez slyšitelnosti lidského ucha (více než 20 kHz). Princip této techniky spočívá v ultrazvukem indukované kavitaci s mžikovým vznikem a opětovným zánikem vakuových bublin, kavit. Při kolapsu jednotlivých kavit vznikají vysokotlaké šokové vlny extrémních parametrů (100 MPa), přičemž proces vzniku a zániku jednotlivých kavit je velmi rychlý (Vogel, 1952).

Aplikace ultrazvuku nachází uplatnění v rozmanitých technologických oblastech. Protože pomocí kavitace je možno destruovat buňky, mohl by ultrazvuk najít využití i v nápojovém průmyslu jako alternativa ke klasické tepelné pasteraci (Stefl, 2007, online).

Tlakové rázy vyvolané ultrazvukem jsou využitelné pro zvýšení nebiologické stability piva. Tým profesora Vogela prováděl v 50. letech měření za účelem ověření vhodnosti ultrazvuku ke zvýšení koloidní stability piva. Ověřil, že po aplikaci ultrazvuku dojde k urychlení vzniku komplexu polyfenol-polypeptid a vytvořený zákal pak může být snadno separován už před sudováním. Bylo prokázáno, že působení vibrací snížilo koncentraci zákalotvorných prekursorů a tento účinek narůstá se zvýšením počtu vibrací v čase (5-20 pulsů za min), se vzrůstající teplotou (75-101 °C) a intenzitou vibrací. K poklesu rychlosti tvorby zákalotvorných komplexů naopak docházelo se zvyšováním frekvence vibrací a nárůstem výšky kapaliny nad vibrační membránou. Sérií dalších pokusů bylo zjištěno, že nejvhodnější fáze pivovarské výroby pro adopci tohoto procesu leží mezi ukončením chmelovaru a hlavním kvašením. Tato studie však nebyla rozšířena o posuzování stability sudovaného piva, a proto nelze pouze na základě poklesu koncentrace zákalotvorných látek hovořit o zvýšení stability skladovaného piva (Vogel, 1952).

V jiné studii z roku 2012 (Balan a kol.) byl porovnáván stabilizační účinek ultrazvuku v kombinaci s přípravkem Clearfine® (silikagel a bentonit). Výsledky byly porovnány se vzorkem piva ošetřeného pouze pomocí ultrazvuku s probubláváním CO₂, se vzorkem, který byl ošetřen pouze přípravkem Clearfine®, a nakonec byla prověřena též stabilita vzorku slepého, nijak neošetřeného. Z výsledků je patrné, že piva ošetřená aplikací kombinace

silikagelu, bentonitu a ultrazvuku dosahují nejvyšší stability. Menší stabilita byla zjištěna u piv ošetřených pouze silikagelem a bentonitem. Použití pouze ultrazvuku se ve zvýšení stability hotových piv nijak neprojevovalo.

Závěr

Vývoj a zdokonalování metod použitelných pro stabilizaci piva je v současnosti stále aktuálním tématem. Vedle metod v praxi běžně používaných existují alternativní způsoby biologické a nebiologické stabilizace, jež fungují na různých principech.

Pro zvyšování biologické stability lze úspěšně použít tlakové rázy, díky nimž dochází k destrukci buněk. Pro pivovarství má velký potenciál inaktivace mikroorganismů působením vysokofrekvenčního elektrického pole (PEF). Účinnost této metody byla potvrzena v různých potravinářských odvětvích, zejména v mlékárenství. Funkčnost PEF pro zvýšení stability piva nebyla dosud potvrzena, avšak není důvod se domnívat, že by metoda v případě aplikace za účelem inaktivaci mikroorganismů v pivu byla méně efektivní. Naopak funkčnost biologické stabilizace piva využitím vysokého hydrostatického tlaku byla již mnohokrát potvrzena. Tlakovým působením dochází k mechanickému namáhání buněk a denaturaci buněčných proteinů, což spolehlivě vede k jejich destrukci. Pomocí ošetření vysokým hydrostatickým tlakem je tedy dosahováno uspokojivé biologické stability, pivo upravené tímto netepelným způsobem v téměř všech parametrech odpovídá tradičnímu způsobu ošetření pomocí vysoké teploty.

Z hlediska zvyšování koloidní stability piva byl zkoumán efekt vysokého hydrostatického tlaku, který se ukázal být nedostatečně účinný. Je však důvodné předpokládat, že by při zvýšení tlaku nebo odlišném technickém provedení stabilizace tlakem přinášela uspokojivé výsledky. Další metodou, která byla použita za účelem zvýšení nebiologické stability piva, je ultrazvuk. Získané výsledky jsou však nejednoznačné, a je proto nutné podrobit tuto metodu hlubšímu zkoumání, zejména pak najít vhodný způsob jejího provedení v provozním měřítku.

Tyto netradiční způsoby stabilizace piva mají velký potenciál, přesto dosud nejsou hojně využívány v praxi. U části z nich dosud nebyl nalezen nejefektivnější způsob provedení, proto jejich potenciálnímu zavedení do praxe musí předcházet další testy.

Použitá literatura

Bamforth C. (2001) 125th Anniversary review: The non-biological instability of beer. J. Inst. Brew., 117 (4), str. 488–497.

Barsotti L., Dumay E., Huma Mu T., Diaz D., Cheftel C. (2002) Effect of high voltage electric pulses on protein-based food constituents and structures. Food Sci. Technol. (N.Y.), 12, str. 136–144.

Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T. (2010) Fyzikálně-chemická stabilita piva, (Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva), VŠCHT Praha, Praha, str. 608-634.

Bendicho S., Barbosa-Canovas V., Martin C. (2002) Milk processing by high intensity pulsed electric fields. Food Sci. Technol. (N.Y.), 13, str. 195–204.

Buzrul S. (2005) Effect of high hydrostatic pressure on shelf life of lager beer. Eur. Food Res. Technol., 220, str. 615–518.

Castellari M., Arfelli G., Riponi C., Capri G., Amati A. (2000) High hydrostatic pressure treatments for beer stabilization. J. Food Sci., 65 (6), str. 974–977.

Dervisi P., Lamb J., Zabetakis I. (2001) High pressure processing in jam manufacture: effect on textural and colour properties. Food Chem., 73, str. 85–91.

Dostálek P., Kotlíková B., Fiala J., Jelínek L., Černý Z., Čásenský B., Mikulka J. (2011) Stabilizační prostředky pro zvýšení koloidní stability piva, Kvasný prům., 57 (7-8), str. 7-8.

Gudmundsson M., Hafsteisson H. (2001) Effect of electric field on microstructure of muscle foods and roes. Food Sci. Technol. (N.Y.), 12, str. 120–128.

Karl J., Siebert Y., Lynn P., Clark D., Hatfield G.: Polyphenols and Individual Phenolic Substances on Beer Quality and Colloidal and Sensory Stability, European Brewery Convention Proceedings. 30th Congress, Prague, 2005.

Knorr D., Geulen M., Grahl T. (1994) Food application of high electric fields pulses. Food Sci. Technol. (N.Y.), 5, str. 71–75.

Lentini A., Rogers P., Oliver T., Goldsmith M., Duan M.: The impact of current brewing processes on long term flavour stability, European Brewery Convention 31st, Venice, 2007.

Macgregor Jr. R. (2002) The interaction of nucleic acid at elevated hydrostatic pressure. Acta Biochim. Biophys., 1595 (1-2), str. 266–276.

Nivel G., Miles C., Mackey B. (1999) The effect of high hydrostatic pressure on ribosome conformation in Escherichia Coli: in vivo study using differential scanning calorimetry. Microbiology, 145 (2), str. 419–425.

Rendueles E., Omer M., Alvseike O., Alonso-Calleja C., Capita R., Prieto M. (2011) Microbiological food safety assesment of high hydrostatic pressure processing: A rewiev. Food Sci. Technol. (N.Y.), 44, str. 1251–1260.

Soliva-Fortuny R., Basala A. (2009) Effect of pulsed electric fields on bioactive compounds in food: a rewiev. Food Sci. Technol. (N.Y.), 20, str. 544–566.

Vega-Mercado, H.; Martin-Belloso, O.; Quin, B.; Chang, F.; Gongora-Nieto, M.; Barbosa-Canovas, G.; Swanson, B. (1997) Non-thermal food preservation:Pulsed electric fields. Food Sci. Technol. (N.Y.), 8, str. 151–157.

Vogel, E. (1952) Effect of ultrasonic vibrations on the nitrogenous constituents of wort. Fermentation ind., 15, str. 313–323.

ultrazvuk.cz. - Fyzikální popis vlnění [online], Stefl J., vytvořeno 2007. [citováno 18. 11. 2013] Dostupné z:<http://www.ultrazvuk.cz/index.php?zid=6>.

Biofiltrace směsi par styren/aceton v probublávaném reaktoru

Bílek J., Vaněk T., Halecký M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

V rámci této práce jsem se zabýval biodegradací par směsi aceton/styren a acetonu z kapalné fáze v probublávaném reaktoru. Vzhledem k neomezené mísitelnosti acetonu ve vodě může při vyšších organických zátěžích acetonu v plynné fázi docházet k jeho akumulaci v kapalině, což může vést až k substrátové inhibici submerzně rostoucí buněčné populace. Cílem pokusů s parami acetonu a styrenu bylo dokázat, že v určitých situacích skutečně dochází k akumulaci acetonu v kapalné fázi a následně pomocí experimentů s biodegradací acetonu z kapalné fáze zkoumat vliv několika parametrů na průběh biodegradačního procesu. Pro potvrzení správnosti naměřených výsledků byla uzavřena bilance uhlíku a získané výsledky byly porovnány s dostupnou literaturou. V práci jsem se také věnoval abiotickým pokusům sorpce acetonu a styrenu a izolaci jednotlivých mikrobiálních kmenů s následnými biodegradačními testy.

Sledování obsahu deoxynivalenolu v průběhu výroby sladu

Krmenčíková N., Poštulková M., Karabín M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Cílem práce na téma „Sledování obsahu deoxynivalenolu v průběhu výroby sladu“ bylo zkoumání vlivu kvality ječmene, způsobu jeho skladování a použité technologie na potenciál nadměrné tvorby deoxynivalenolu během čtvrtprovozního sladování. Pro tento účel byly stanoveny obsahy deoxynivalenolu v ječmenech, sladech a meziproduktech sladování pěti šarží ječmene za různých podmínek (vlhkost ječmene, kontaminace máčecích vod a teploty během klíčení a hvozdní). Bylo zjištěno, že kontaminace polními plísněmi zvyšuje riziko nadměrné produkce deoxynivalenolu výhradně v kombinaci s nevhodnými podmínkami sklizně a skladování ječmene (vysoká vlhkost). Rozhodujícími faktory ovlivňujícími nárůst obsahu deoxynivalenolu během sladování jsou vyšší teploty klíčení a délka úseku hvozdní, při které je teplota sladu nižší než 40 °C.

Vliv biologicky aktivních látek na adhezivní vlastnosti obalových vrstev mikroorganismů

Janoušková M., Papoušková T., Kvasničková E., Schreiberová O.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Tvorba biofilmu patogenními mikroorganismy je v současnosti velkým problémem v humánní medicíně, protože biofilmy se často podílejí na vzniku persistentních mikrobiálních infekcí. Eradikace zvýšenými koncentracemi antibiotik je komplikovaná schopností biofilmu odolávat i vysokým koncentracím antibiotik a dále rizikem tvorby rezistence mikroorganismů na běžně dostupná antibiotika. Jedním z možných řešení interference tvorby i eradikace již narostlého biofilmu je pomocí přírodních látek nebo kombinací přírodních látek s antibiotiky, kdy dojde k posílení aktivity antibiotika bez rizik spojených s aplikací jeho vysoké koncentrace. V této práci byl zkoumán vliv tří biologicky aktivních látek (BAL) – LMW chitosanu, kyseliny usnové a baicaleinu a jejich kombinací s dvěma antibiotiky – amfotericinem B a flukonazolem na tvorbu a stabilitu biofilmu podmíněně patogenních kvasinek *Trichosporon cutaneum* a *Candida parapsilosis*. Byl sledován vliv těchto látek a jejich kombinací na tvorbu biofilmu i stabilitu již vzniklého biofilmu. Biofilm byl charakterizován pomocí sledování obsahu biomasy biofilmu a suspenzních buněk, proteinové a sacharidové složky volných a vázaných EPS biofilmu kvasinek a hydrofobity povrchu disperzních buněk kvasinek. Dále byl sledován vliv těchto látek a jejich kombinací na počáteční adhezi *T. cutaneum* a *C. parapsilosis*. Vliv vybraných BAL a jejich kombinací na počáteční adhezi kvasinek *T. cutaneum* a *C. parapsilosis* byl sledován jako osídlená plocha na přístroji Cellavista.

Zvýšení trvanlivosti nefiltrovaného piva

Tůmová T., Kotlíková B., Dostálek P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Tato práce je věnována nalezení optimálních podmínek mikrobiologické stabilizace nefiltrovaného piva s co nejnižším vlivem na jeho senzorické vlastnosti. Cílem první části práce byla izolace a určení nejčastějších zástupců kontaminujících mikroorganismů v nefiltrovaných pivech z minipivovarů. Hlavním cílem této práce bylo otestování metod vhodných k prodloužení trvanlivosti nefiltrovaného piva a nastavení podmínek stabilizačního procesu tak, aby pivo bylo mikrobiologicky stabilní, ale zároveň byly co nejméně ovlivněny jeho senzorické vlastnosti. Byla použita pasterace a aplikace vysokého hydrostatického tlaku. Obě tyto metody poskytly mikrobiologicky stabilní pivo. Pasterované pivo bylo senzoricky hodnoceno v průběhu skladování při 8 °C a 20 °C. Na rozdíl od nepasterovaného piva se významně zvýšila mikrobiologická stabilita až na dva měsíce, přesto však v průběhu času docházelo k chuťovým změnám. Senzorickými testy bylo prokázáno, že pasterace značně ovlivnila senzorický profil nefiltrovaného piva. Aplikace vysokého hydrostatického tlaku byla k chuťovým vlastnostem piva velmi šetrná, jelikož během stabilizace nedocházelo k zahřívání piva a nedocházelo ani k uvolňování intracelulárního obsahu buněk do piva, čímž byl eliminován vznik autolyzační chuti.

Studium podmínek kultivace bakterie *Actinobacillus succinogenes*

Pacáková Z., Patáková P., Rychtera M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Jantarová kyselina je důležitým průmyslovým produktem a výchozí složkou pro syntézu řady látek v chemickém, farmaceutickém a potravinářském průmyslu. V současné době je z velké části vyráběna chemickou syntézou z ropných produktů, ale rozvoj biotechnologií otevřel prostor pro využití obnovitelných surovin k její biotechnologické výrobě. Tato práce se zabývá biosyntézou jantarové kyseliny fakultativně anaerobní, kapnofilní bakterií *Actinobacillus succinogenes*. Cílem této práce je testování schopností bakterie *Actinobacillus succinogenes*, hledání nejvhodnějších podmínek pro její kultivaci, k získání co nejvyšší koncentrace jantarové kyseliny s minimální tvorbou vedlejších produktů. Nejúspěšnější strategie kultivace vedla při provedení v laboratorním bioreaktoru ke koncentraci jantarové kyseliny 61,44 g/l při produktivitě 2,02 g/l.h a výtěžnosti 75%. Dále byly analyzovány vedlejší produkty mléčná, octová a mravenčí kyselina. Celková výtěžnost všech organických kyselin na spotřebovanou glukosu činila 95 %.