



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2012

9. seminář

Pivovarství a kvasné technologie 2012

3. seminář

Environmentální biotechnologie 2012

Ústav biotechnologie

(dříve Ústav kvasné chemie a bioinženýrství)

29. a 30. března 2012



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE

Sborník souhrnů a plných textů příspěvků

Konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2012

9. seminář

Pivovarství a kvasné technologie 2012

3. seminář

Environmentální biotechnologie 2012

Ústav biotechnologie

(dříve Ústav kvasné chemie a bioinženýrství)

29. a 30. března 2012

Pořádající instituce:

Ústav biotechnologie

(dříve Ústav kvasné chemie a bioinženýrství)

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

Odborná skupina Kvasná chemie a biotechnologie

Česká společnost chemická

Sponzoři a spolupracující společnosti:

ROCHE, s.r.o.

dekonta

Dekonta, a.s.

Budějovický Budvar, n.p.
Měšťanský pivovar v Poličce, a.s.
Pivovar Svijany, a.s.
Pivovary Staropramen, a.s.
Plzeňský Prazdroj, a.s.

Přípravný a organizační výbor:

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

Členové: Nikol Krmenčíková, e-mail: nikol.krmencikova@vscht.cz

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

Ing. Olga Schreiberová, e-mail: olga.schreiberova@vscht.cz

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

Editor: Jaromír Fiala

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

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2012

ISBN 978-80-7080-828-3



DEKONTA, a.s.

Remediační technologie pro sanace kontaminovaných lokalit

SPOLEČNOST DEKONTA POSKYTUJE SLUŽBY V NÁSLEDUJÍCÍCH OBLASTECH:

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

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

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

VÝZKUMNÉ PROJEKTY SPOLEČNOSTI DEKONTA JSOU ZAMĚŘENY NA NÁSLEDUJÍCÍ ENVIRONMENTÁLNÍ TECHNOLOGIE:

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

dekonta

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

www.dekonta.cz

tel.: +420 312 292 969

email: zidkova@dekonta.cz



Program konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2012

Čtvrtek 29. března 2012

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



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

8:00 – 9:00 Registrace účastníků

Přednášková sekce – plenární zasedání *sál B+C*

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

9:10 – 9:30 Basařová G.: **Rozvoj restauračních pivovarů v České republice**

9:30 – 9:50 Rychtera M.: **Muzeum cukrovarnictví, lihovarství a řepářství**

9:50 – 10:05 Kolouchová I.: **Piju, piješ, pijeme.**

10:05 – 10:20 Paulová L.: **Produkce rekombinantních farmaceutických proteinů mikrobiálními buňkami**

10:20 – 10:30 Procházková G., Brányik T.: **Biokatalytický potenciál jednobuněčných řas a jejich biotechnologické využití**

10:30 – 10:45 Hudcová T., Švehlová K., Dostálek P., Karabín M.:
Estrogenní účinky chmele

10:45 – 11:00 Zuzaňák V. (Plzeňský Prazdroj a.s.):
Stáže, praxe a absolventské pozice v Plzeňském Prazdroji

11:00 – 11:10 **Přestávka**

9. seminář – Pivovarství a kvasné technologie 2012

sál B+C

11:10 – 11:20	Linhart P., Baszczyński M., Brányik T.: Vliv chmelových přípravků na strukturu a stabilitu pивní pěny
11:20 – 11:30	Kačaba J., Paulová L.: Výroba bioethanolu z hydrolyzátů pšeničné slámy
11:30 – 11:40	Wiedenová L., Fiala J.: Stanovení volných aminokyselin ve vínech
11:40 – 11:50	Vykydalová P., Linhová M., Patáková P.: Vývoj metod pro sledování fyziologického stavu a sporulace u bakterií rodu <i>Clostridium</i>
11:50 – 12:00	Bittner M., Brányik T.: Adhezni vlastnosti anaerobních kontaminantů potravin
12:00 – 12:10	Macháčková J., Rychtera M.: Biosyntéza vybraných kyselin citrátového cyklu - výběr mikroorganismů
12:10 – 12:20	Pošta J., Paulová L., Melzoch K.: Selekce vhodného producenta etanolu z lignocelulózových materiálů a jeho využití v SSF procesu
12:20 – 12:30	Pražáková Š., Kvasnička F.: Separace kvasinek pomocí elektromigračních metod
12:30 – 12:40	Poštulková M., Fiala J.: Vliv surovin a technologie na prekursorů přepěňování piva
12:40 – 14:00	Přestávka na oběd

14:00 – 14:10	Pokorný T., Lipovský J., Patáková P.: Kontinuální produkce 1-butanolu
14:10 – 14:20	Maroufou T., Rychtera M., Melzoch K.: Použití manioku pro výrobu rozpouštědel
14:20 – 14:30	Kociánová P., Štěrbá K., Dostálek P., Karabín M.: Využití SPME pro stanovení senzoricky významných těkavých látek piva
14:30 – 14:40	Strejc J., Bittner M., Brányik T.: Fyziologická a genetická modifikace pivovarských kvasinek ve výrobě nealkoholického piva
14:40 – 14:50	Halama Š., Jelínek L., Karabín M.: Studium vlivu sladování na obsahy vybraných polyfenolových látek ječmene
14:50 – 15:00	Jaisamut K., Patáková P., Paulová L., Rychtera M.: Effect of alkali pretreatment on removal of lignin from wheat straw
15:00 – 15:10	Ženíšek V., Jelínek L., Dostálek P.: Aplikace polyamidových sorbentů pro zvýšení koloidní stability piva
15:10 – 15:20	Kotlíková B., Jelínek L., Dostálek P.: Netradiční způsoby stabilizace piva

3. seminář - Environmentální biotechnologie 2012

sál A

11:10 – 11:20	Pospíšilová D., Masák J.: Mikroskopické techniky sledování adheze buněk a tvorby biofilmu
11:20 – 11:30	Holfeldová J., Pospíšilová D., Masák J.: Studium vlivu antibiotik na tvorbu a stabilitu biofilmu
11:30 – 11:40	Ježdík R., Hošková M., Masák J.: Modulace podmínek vnějšího prostředí umožňující posílení produkce rhamnolipidů u vybraných bakteriálních kmenů
11:40 – 11:50	Hudcová T. (Dekonta, a.s.): Kořenové čistíny odpadních vod
11:50 – 12:00	Pádrová K., Schreiberová O., Čejková A.: Interakce nanočástic železa s prokaryotní a eukaryotní buňkou
12:00 – 12:10	Zídková L. (Dekonta, a.s.): Využití síran-redukujících bakterií při bioremediacích
12:10 – 12:20	Karlová P., Halecký M., Páca J.: Stanovení metabolických intermediátů mikrobiální degradace dinitrofenolů
12:20 – 12:30	Podolová N., Procházková G., Brányik T.: Separace mikroskopických řas pomocí magnetických kuliček
12:30 – 12:40	Křenková J., Kolouchová I.: Vliv resveratrolu a jeho analogů na adhezivní schopnosti bakteriálních buněk
12:40 – 12:50	Vaněk T., Halecký M., Páca J.: Biologická degradace acetonu a styrenu v probublávaném submersním reaktoru

12:50 – 14:00 **Přestávka na oběd**

15:20 – 16:00 **Přestávka**

Prezentace sponzorujících společností – sál B+C

16:00 – 17:00 **Presentace sponzorujících společností**

17:00 – 17:30 **Diskuse**

17:30 **Zakončení 1. dne konference**

Pátek 30. března 2012

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

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

13:00 – 14:00 VŠCHT Praha – budova B, posluchárna BIII

1. Seminář o vědě a výzkumu na FPBT

Masák J.: **Současná věda a výzkum na Ústavu kvasné chemie a bioinženýrství**

Program:

1. Obecnější představení výzkumné činnosti jednotlivých pracovních skupin
2. Tvorba a vlastnosti biofilmu, látky s anti-biofilmovou aktivitou
3. Průmyslové aplikace biofilmových procesů
4. Fyzikálně-chemické parametry ovlivňující adhezi mikrobiálních buněk
5. Kultivace jednobuněčných řas a jejich biotechnologický potenciál
6. Diskuse

**Souhrny
a plné texty příspěvků**

Biokatalytický potenciál jednobuněčných řas a jejich biotechnologické využití

Procházková G., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Jednobuněčné řasy představují velmi širokou skupinu mikroorganismů s významným biotechnologickým využitím v oblasti potravinářského, krmivářského a farmaceutického průmyslu, které se neustále rozrůstá. Jelikož jsou tyto eukaryotní mikroorganismy evolučně velmi blízké vyšším rostlinám a jsou de facto považovány za jejich předchůdce, lze u jednobuněčných řas předpokládat minimálně stejně bohatý biokatalytický potenciál v oblastech syntézy sekundárních metabolitů, biodegradací a biotransformací široké skupiny látek. V případě rostlinných tkáňových buněk byly prokázány biokatalýzy organických sloučenin zahrnující převážně oxidační, redukční, hydroxylační a glykozylační reakce. Poslední dva uvedené reakční typy jsou pro biotransformační procesy charakteristické, jelikož příslušné enzymové aparáty jsou v rostlinách široce rozšířeny. Biokatalytický potenciál jednobuněčných řas je stále z velké části neprozkoumaný jak teoreticky, tak i prakticky. V současné době byla popsána jen hrstka příkladů aplikací jednobuněčných řas v této biotechnologické oblasti, kdy jednotlivý zástupci účinně přispěly k vyčištění odpadních vod a byla u nich prokázána vysoká biotransformační aktivita např. ve vztahu k steroidním látkám, nízkomolekulárním fenolům, naftalenu, halogenovaným benzolům či polyfenolům, ilustrující velký význam biotransformací prostřednictvím řas z hlediska získání cenných látek z levných, přírodních prekurzorů. Stále ale zůstává mnoho zajímavých enzymových aktivit neobjevených, vyžadující tedy další intenzivní výzkumnou činnost.

Estrogenní účinky chmele

Hudcová T., Švehlová K., Dostálek P., Karabín M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Chmelové hlávky, používané v různě upravené podobě jako jedna ze základních surovin pro výrobu piva, obsahují kromě technologicky cenných látek (silice, hořké kyseliny) i řadu dalších biologicky aktivních sekundárních metabolitů s prokázanými pozitivními účinky na lidské zdraví.

Do popředí zájmu farmaceutického průmyslu se dostávají zejména prenylované flavonoidy. Mezi tyto látky patří 8-prenylnaringenin, který je považován za jeden z nejúčinnějších dosud izolovaných fytoestrogenů.

Fytoestrogeny mohou sehrát důležitou roli v léčbě onemocnění souvisejícími s regulačními schopnostmi hormonů v organismu (například menopauzální symptomy, karcinomy prsu, dělohy, vaječníku, prostaty atd.) a nahrazovat tak substituční hormonální terapii, která je spojována s rizikem vzniku nádorových onemocnění.

Lze předpokládat, že se díky zmíněným vlastnostem, stanou v budoucnu prenylované flavonoidy součástí funkčních potravin se zvýšeným obsahem těchto sloučenin, potravinových doplňků či léčiv.

Vliv chmelových přípravků na strukturu a stabilitu pивní pěny

Linhart P., Baszczyński M., Novák P., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Úvod

Pивní pěna patří mezi kvalitativní i kvantitativní znaky, které charakterizují pivo. Bohatá, hustá a dlouhotrvající pěna je jedním z prvních vjemů, které jako spotřebitelé vizuálně vnímáme a mnohdy nám její vzhled může chuť na tento nápoj umocnit nebo také samozřejmě pokazit. Její vzhled také závisí na způsobu natočení piva či stavu výčepního zařízení.

Pěna je definována jako disperze plynu v kapalině, kde dispergovanou fází je vždy plyn. K nejdůležitějším pojmům popisujících pивní pěnu patří především stabilita, pěnivost, přilnavost, barva, objem a hustota. Pěnivost vyjadřuje schopnost kapalin vytvářet pěnu. Stabilita pěny je dána časem mezi vytvořením pěny a jejím rozpadem. Za hlavní pěnotvorné látky v pivu jsou považovány především bílkoviny, respektive bílkoviny s hydrofóbním charakterem, hořké chmelové látky, zvláště iso- α -hořké kyseliny, v jejichž přítomnosti hrají pozitivní roli i kovové ionty (železo, kobalt, nikl aj.).

Chmel a přípravky z něj vyrobené, jakožto jedny ze základních surovin pro výrobu piva, mají stále ještě nezastupitelnou roli v jeho výrobě. Udělují pivu typickou chmelovou hořkost, díky které je pivo naprosto jedinečný nápoj. Chmel obsahuje mimo jiné hořké chmelové pryskyřice, které jsou hlavním nositelem hořkosti. Jedná se pak především o isomerované produkty α -hořkých kyselin, které pivu udělují typickou hořkost. Celosvětově byl zaznamenán, za posledních pár desetiletí, postupný pokles obsahu α -hořkých kyselin během výroby piva. Česká piva se ale stále v tomto hledisku pohybují nad celosvětovým průměrem (Basařová a kol., 2010). Složité posklizňové úpravy a vysoké nároky na skladování surového chmele, jakožto prevence před stárnutím chmele, byly jedním z prvních impulsů k vývoji tzv. chmelových produktů. Dalšími důvody jsou neefektivita chmelení při použití hlávkového chmele, rezidua postřikových látek, nehomogenní obsah pivovarsky cenných látek. Všechny tyto negativní aspekty chemické produkty snižují a v některých případech naprosto eliminují. Prokázány jsou i prospěšné účinky a to na stabilitu pивní pěny, nejvíce u redukovaných chmelových výrobků tetrahydro-iso- α -hořkých kyselin a hexahydro-iso- α -hořkých kyselin. Redukované chmelové výrobky mají další velice příznivý vliv na pivo, tím je fotostabilita. Částečně tak zabraňují vzniku sluneční, nebo-li letinkové příchuti, která je v pivu nežádoucí. Chmelové produkty však nejsou jednoznačným zlepšením pro pivovarství. Nehodí se pro výrobu všech druhů piv a především ovlivňují organoleptické i kvalitativní znaky piva. Používání některých chmelových produktů je v mnoha

zemích dokonce legislativně zakázáno. Je tedy na každém sládkovi či vedení pivovaru, aby dobře promysleli použití těchto specifických surovin pro výrobu piva.

Řešená problematika

Pěnovost piva je jednou ze základních vlastností, kterou spotřebitel využívá k posouzení kvality piva. Pěna má především vizuální vliv na konzumenta, ale do jisté míry ho ovlivňuje také vnímání aroma a plnosti chuti piva. Pro spodně i svrchně kvašená piva je charakteristické, že se při nalití do sklenice, vlivem uvolňování bublinek oxidu uhličitého, vytváří hustá stabilní pěna. Faktory, které jsou zejména zkoumány, jsou například množství pěny, přilnavost ke stěně sklenice, hustota, pevnost, barva, stabilita pěny aj.

Pivní pěna je disperzní soustava složená z plynné fáze a disperzního kapalného prostředí. Disperzní fáze pivní pěny je tvořena nejčastěji oxidem uhličitým, případně s příměsí vzduchu, nebo dusíku. K vytvoření pěny je potřeba skupina látek, které jsou označovány jako pěnotvorné, lze k nim řadit veškeré sloučeniny, které podporují tvorbu pěny a zabraňují jejímu rozpadu. Mezi tyto experimentálně prokázané látky řadíme především určité bílkoviny a polypeptidy, hořké látky pocházející z chmele a na ně navazující se kovové ionty. Další složky, které pozitivně ovlivňují tvorbu a stabilitu pivní pěny, jsou melanoidiny, polysacharidy, pentosany, β -glukany a gumovité látky. Tyto látky difundují do mezifázového rozhraní a dále do stěny bublin, což vede ke zpevnění povrchové blanky bublin. Jedná se o látky amfifilní povahy, kdy jejich hydrofobní části směřují do plynu a hydrofilní části naopak do kapaliny. Na ně se navazují také jiné složky snižující povrchové napětí nebo zvyšující viskozitu, dohromady tak tvoří kostru pěny (Bamforth, 1998).

Většina přístrojů pro měření stability pivní pěny měří na základě změn fyzikálních vlastností měřeného vzorku. Jedná se především o vodivostní a optické vlastnosti pivní pěny.

Vodivostní přístroje využívají toho, že mokrá pěna obsahuje velký podíl piva a proto dobře vede elektrický proud. Přístroj NIBEM, původně sloužil pro hlídání hladiny řeky Rýn, později se však začal používat pro měření pěnovosti. Dnes již existuje několik verzí tohoto přístroje, které měří časy při poklesu pivní pěny o 10 - 30 mm. Po napěnění piva pomocí tlaku a trysky se měření zahajuje až při poklesu pěny o 10 mm pod okraj nádoby od ukončení napěňování. Poslední verze přístroje, označená jako NIBEM-TPH, je navíc doplněna o korekci změřených hodnot na barometrický tlak, teplotu a vlhkost vzduchu. Při měření stability pěny Analytickou komisí EBC (European Brewery Convention) se pěnovost piv pohybovala mezi 160 - 310 s při poklesu hladiny o 30 mm (Šavel a Brož, 2006). Velká část optických měřičů měří průchod světelného paprsku penou ve vertikálním směru. Při průchodu paprsku v dostatečné intenzitě se měření zastaví a z hodnot se určí doba rozpadu pěny. Přístroje pracující na tomto principu se liší polohou zdroje světla.

Dalším způsobem zkoumání pивní pěny je použití Obrazové analýzy (Image analysis). Ta se zabývá získáváním kvantitativních informací o různých geometrických parametrech mikrostruktury i makrostruktury materiálů. Pro tuto metodu je zapotřebí kvalitního digitalizačního přístroje a počítače se specifickým software (ACC, NIS-Elements) k provedení analýzy. Obrazová analýza umožňuje nahrazení subjektivního posuzování obrazů pomocí objektivních charakteristik. Klíčovým krokem v celém postupu je získání kvalitního digitalizovaného obrazu předlohy, tedy pивní pěny. Poté je obraz v nekomprimované podobě uložen v počítači a s pomocí výše zmíněných aplikací dále upravován a vyhodnocován.

Chmelové produkty

Chmelu se oproti jiným surovinám v pivovarské výrobě používá poměrně málo, ale jeho vliv na kvalitu a charakter piva je velký. Začal se používat spíše jako konzervační prostředek. Jak již bylo zmíněno, složení chmele a chmelových výrobků závisí na mnoha attributech, z nichž nejvýznamnějšími jsou odrůda, pěstební podmínky a oblast, co se týče surového chmele, dále způsob sklizně a další zpracování u chmelových produktů. Nakládání s chmelem po sklizni, během skladování, transportu či specifických úprav na další výrobky, toto všechno vede k tzv. stárnutí chmele. Jedná se především o degradaci pivovarských významných látek. Chmelové pryskyřice, chmelové silice a polyfenoly, všechny tyto látky jsou náchylné především na oxidaci vzdušným kyslíkem, teplotu a přístup světla. Tyto veškeré aspekty vedly již v 60. letech minulého století k průmyslové výrobě chmelových produktů, kdy si mnoho pivovarů uvědomilo, že použitím těchto výrobků se podstatně sníží náklady na dopravu a skladování chmele, dojde ke zjednodušení manipulace při chmelovaru aj. Dnes se více než 95 % chmele z celého světa zpracovává na chmelové produkty, zejména chmelové granule a chmelové extrakty (Bamforth, 2006).

Chmelové produkty lze řadit do 5 základních skupin dle (Basařová a kol., 2010):

1. Chmelové přípravky vyrobené mechanickou úpravou hlávkového chmele.
2. Chmelové přípravky vyrobené extrakcí hlávkového chmele.
3. Chmelové přípravky vyrobené chemickými úpravami.
4. Kombinované chemické přípravky.
5. Syntetické chmelové přípravky.

Obecně lze u chmelových produktů nalézt tyto základní výhody oproti hlávkovému chmelu:

- nižší náročnost na požadavky při skladování v závislosti na druhu chmelového výrobku,
- prodloužení chemické stability chmelového produktu,
- snadnější manipulace a možnost automatizace procesu,
- vyšší účinnost přechodu hodnotných látek během chmelovaru do roztoku,

- možnost odděleného dávkování frakcí chmelových silic a pryskyřic,
- menší odpad, snížení objemu a znečištění odpadních vod,
- nepřítomnost dusičnanů a reziduí postřikových látek (Basařová a kol., 2010).

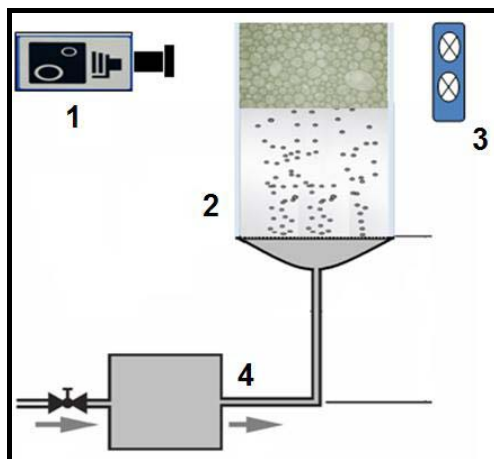
V pivovarství často používané jsou redukované iso- α -hořké kyseliny. Tyto produkty se začaly vyrábět na popud potřeb a požadavků zákazníků a konzumentů piva, neboť díky své jednoduché indikaci do technologie výroby piva umožňují pivovarníkům vyrábět různé druhy piv ze stejných várek. Dalším důvodem byla samozřejmě úspora nákladů při používání těchto výrobků. Jelikož jsou tyto produkty přidávány do hotového piva, je důležité, aby byly naprosto čisté bez příměsí, které by mohly finální produkt poškodit. Při použití těchto výrobků je také nezbytné dbát na důkladné dávkování, obecně je poměr použití těchto látek v mililitrech na hektolitry piva. Další pozitiva při použití těchto látek jsou lepší stabilita pивní pěny a fotostabilita. Do skupiny redukovaných iso- α -hořkých kyselin komerčně používaných patří hlavně *rho*-iso- α -hořké kyseliny, tetrahydro-iso- α -hořké kyseliny a hexahydro-iso- α -hořké kyseliny nebo jejich kombinace (Bamforth, 2006; Priest a Stewart, 2006).

Rho-iso- α -hořké kyseliny, jako jediné redukované chmelové produkty, vykazují menší hořkost než samotné iso- α -hořké kyseliny, je to zhruba 70 % hořkosti. Vykazují spíše jemnou hořkost oproti klasickému chmelení. Lze je přidat přímo do várky nebo po hlavním kvašení. Jejich vliv na stabilitu pěny při obvyklém dávkování není zcela prokázán, malé zlepšení stability lze dosáhnout při použití vyšších koncentrací.

Tetrahydro-iso- α -hořké kyseliny se mohou používat samostatně nebo v kombinaci s jinými chmelovými produkty. Hořkost tetrahopu je až 1,7x vyšší než běžné iso- α -hořké kyseliny. Tyto hodnoty však vykazují vodné roztoky tetrahydro-iso- α -hořkých kyselin. Efektivní hořkost v pivu závisí na mnoha faktorech, jako jsou typ piva, kvalita použitých surovin. Hořkost tetrahopu v pivu se tedy pohybuje v rozmezí 110 – 170 % hořkosti iso- α -hořké kyseliny. Často se do piva přidávají v malém množství pro zlepšení stability pивní pěny. Velmi výrazného posílení stability pěny je dosaženo už při koncentraci 3-4 mg.l⁻¹ hotového piva. Tato stabilní pěna však často působí nepřírozně. Jejich fotostabilní účinek je také prokázán (Goldstein a Ting, 1994).

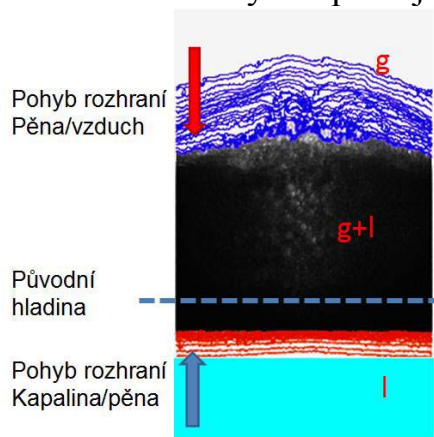
Experimentální měření

Měření bylo prováděno na základě 3 metod. Obrazová analýza na makroskopické úrovni, dále na mikroskopické úrovni a třetí metodou bylo použití komerčního přístroje NIBEM-T. Pro Obrazovou analýzu byla používána následující aparatura:

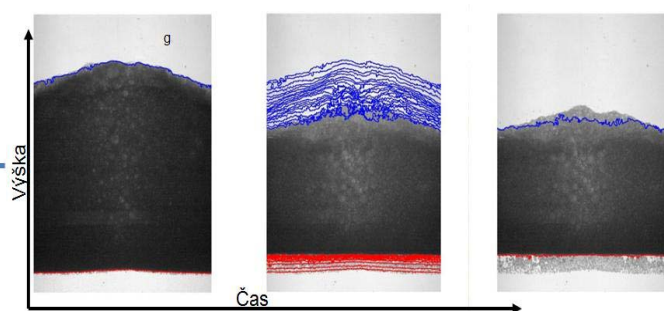


Obr. 1: Schéma použité aparatury (1 – kamera, 2 – kolona, 3 – svítidlo, 4 – systém přívodu plynu)

Kamera nám tedy poskytne sérii snímků, které následně vyhodnocujeme v programu MatLab. Toto vyhodnocení probíhá na základě pohybu rozhraní pěna x vzduch a pěna x kapalina. Pohyb hladiny pěny je v důsledku rozpadu samozřejmě směrem dolů. Tomu napomáhá gravitační stékání zadržované kapaliny v pění. Naopak hladina kapaliny (piva) se pohybuje směrem nahoru, to je způsobeno nárůstem objemu kapaliny (piva) zadržené v pění při jejím postupném rozpadu. Způsob, jakým program MatLab snímky vyhodnocuje, je naznačený na Obr 2 a 3, kde modré linky prezentují hladinu pěna x vzduch tak, jak tato hladina klesá v čase. Červené linky naopak naznačují vzrůst výšky hladiny kapaliny (piva). Tyto dvě hladiny se k sobě z logiky věci přibližují, až se nakonec za určitý čas setkají.



Obr. 2: Rozpad pěny sumárně



Obr. 3: Snímky zaznamenávající rozpad pěny v čase zaznamenaný programem MatLab

Program MatLab nám tedy poskytne informace a pohybu horní a spodní hladiny pěny, tyto hodnoty jsou v pixelech a je třeba je převést na reálné hodnoty, k tomu se hodí klasický tabulkový program MS Office – Excel. Přepočtem pixelů

z dat programu MatLab jsme získali spodní a horní hranici pěny v milimetrech na jednotlivých snímcích. S těmito daty jsme dále pracovali v programu MS Office – Excel. Získaná závislost výšky pěny v čase se nazývá rozpadová křivka pěny. Tímto způsobem se proměřila celá škála koncentrací u vybraných chmelových produktů.

Přístroj NIBEM-T měří pokles vytvořené pěny ve speciální kyvetě, pro tento přístroj určené. NIBEM měří čas, za který hladina pěny propadne o 10 mm, 20 mm 30 mm. Přičemž pro porovnání vzorků se nejčastěji používá hodnota NIBEM 30, což značí úpadek hladiny pěny právě o 30 cm.

Závěr

Námi získané výsledky posloužily k porovnání vlivu vybraných chmelových produktů na strukturu a stabilitu pивní pěny. K tomuto zkoumání jsme použili jak komerční měřicí přístroj NIBEM-T, tak i námi sestavené přístrojové zařízení pro obrazovou analýzu. Jako chmelové produkty byly vybrány výrobky firmy Hopsteiner s.s. Chmelové isoextrakty bez chemické úpravy i chemicky redukované, vyráběné přímo pro pivovarskou výrobu jako tzv. downstream přídavky.

Vliv těchto extraktů byl proměřován v modelovém roztoku, dále pak v námi připraveném modelovém pивu a v komerčním lahvovém pивu, běžně se vyskytujícím v české distribuční síti. Pro zjištění vlivu přidaných chmelových produktů na stabilitu pивní pěny byl použit přístroj NIBEM-T a také obrazová analýza na makroskopické úrovni. Vliv přídavku chmelových produktů na strukturu byl zkoumán obrazovou analýzou na mikroskopické úrovni.

Chmelové extrakty přidávané do pивa mají vliv na chování a strukturu pивní pěny. Byl jasně prokázán stabilizační účinek všech přidávaných chmelových extraktů, s čímž souvisela i koncentrace přidávaných látek. Koncentrační gradient koreloval s vzrůstajícím stabilizačním vlivem. U pěn byl také pozorován saturační efekt chmelových přídavků. Silnější stabilizační efekt na pěnu modelového pивa byl pozorován u hydrogenovaných chmelových extraktů (TETRA-ISO-extraktu). Struktura pěn je po vytvoření velmi podobná, jak s ohledem na výběr chmelového extraktu, tak i koncentraci přídavků.

Použitá literatura

Bamforth C. W. (1998) Beer foam duality, EBC Monograph 27, Amsterdam, str. 10.

Bamforth C. W. (2006) Brewing: New Technologies, Woodhead publishing in food science and technology, 484 stran.

Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T. (2010) Pivovarství, Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha, 904 stran.

Goldstein H., Ting P. (1994) Post kettle bittering compounds: analysis, taste, foam and light stability, EBC, Monograph 22, Zoutherwoude, str. 141-164.

Priest F. G., Stewart G. G. (2006) Handbook of brewing, CRC / Tayler & Francis, 853 stran.

Šavel J., Brož A. (2006) Měření pěnivosti piva, Kvasný průmysl, 10, str. 314-318.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.21/2012)

Výroba bioethanolu z hydrolyzátů pšeničné slámy

Kačaba J., Paulová L.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Odpadní lignocelulosová biomasa by potenciálně mohla být využívána k výrobě kapalného paliva, pokud se podaří vyřešit řadu technologických problémů a vývoj cen energií bude pro tuto technologii příznivý. V Evropě se hlavně jedná o využití pšeničné slámy k výrobě ethanolu. Před vlastní fermentací zkvasitelných monosacharidů na ethanol je nutné materiál mechanicky porušit v procesu předúpravy kombinací působení chemických činidel, vysokého tlaku a vysoké teploty. Předúprava má za cíl porušit mikroskopickou strukturu materiálu, odstranit lignin, hydrolyzovat hemicelulosu a porušit krystalickou strukturu celulosy tak, aby následná enzymová hydrolýza byla co nejefektivnější a spotřeba drahých celulasových enzymů byla co nejmenší. Volbu podmínek a způsob předúpravy je nutné volit s ohledem na vstupní materiál, dále je nutné omezit degradaci využitelných sacharidů a vznik inhibitorů celulasových enzymů a produkčních mikroorganismů.

Jelikož zvýšený obsah těchto látek může významným způsobem ovlivnit výtěžnost etanolu, byla první část práce zaměřena na ověření možnosti nahradit pracnou a časově náročnou HPLC metodu stanovení obsahu inhibičních látek rychlou spektrofotometrickou metodou, která by umožnila odhadnout obsah dvou nejpostoupenějších inhibitorů (furfuralu a hydroxymethylfurfuralu) v hydrolyzátech pšeničné slámy a také sloužit ke kvalitativnímu posouzení toxicity hydrolyzátu. V následující části práce byl využit reálný hydrolyzát pšeničné slámy k výrobě etanolu. V průběhu druhé části práce byly řešeny technologické problémy, které se při použití modelových substrátů (Avicel, glukóza) nevyskytují. Poté byla řešena problematika hydromodulu použitého substrátu, dávkování celulolytických enzymů s tím, že začátek fermentace je po sacharifikaci zpožděn o 12 hodin. Tento proces byl ověřen v laboratorním bioreaktoru ve vsádkovém i přítokovaném uspořádání, přičemž se dosáhlo výtěžnosti etanolu na vnesenou celulózu 0,249 g/g a produktivity ethanolu 0,277 g/l.h.

Stanovení volných aminokyselin ve vínech

Wiedenová L.¹, Nádeníčková B.², Baroň M.², Fiala J.¹

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

²Ústav vinohradnictví a vinařství, Mendelova universita v Brně

Tato práce shrnuje význam aminokyselin ve víně a moštu, především jejich vliv na výslednou senzorickou kvalitu vín, na kterou může působit primárně nebo jako prekursor senzoricky aktivních těkavých látek. Jedním z cílů práce byla validace použité metody, druhým cílem byla charakterizace nových interspecifických odrůd révy vinné z hlediska profilu aminokyselin, jejich porovnání s tradiční odrůdou a nalezení význačných rozdílů mezi nimi. Pro posouzení vlivu technologického postupu výroby vína byla každá z odrůd zpracována pomocí čtyř různých způsobů macerací.

Aminokyseliny byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s předkolonovou derivatizací vzorků, po které následuje separace derivátů v koloně na reverzní fázi a detekce fluorescenčním detektorem. Metoda byla validována pomocí výpočtu opakovatelnosti pro víno a vinný mošt.

Nejvýraznější rozdíl mezi interspecifickými odrůdami a tradiční byl zaznamenán u obsahu argininu, zatímco ostatní aminokyseliny se ve svých koncentracích příliš nelišily. U vín všech odrůd byla provedena senzorická analýza, z jejichž výsledků vyplývá, že by chuť vína mohla být ovlivněna obsahem aminokyselin.

Řešeno a financováno ve spolupráci VŠCHT Praha a MENDELU v Brně

Vývoj metod pro sledování fyziologického stavu a sporulace u bakterií rodu *Clostridium*

Vykydalová P., Linhová M., Patáková P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Bakterie rodu *Clostridium* za nepříznivých podmínek vytvářejí klidové stádium - sporu. V této práci byly vybrány jako modelové organismy pro sledování sporulace nepatogenní, solventogenní druhy klostridií – *Clostridium beijerinckii* CCM 6218, *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598, *Clostridium tetanomorphum* DSM 4473. Cílem experimentů byla možnost využití elektronové a světelné mikroskopie společně s fluorescenční mikroskopií spojenou s analýzou na průtokovém cytometru ke sledování průběhu sporulace. Byla vyvinuta metoda pro separaci spor s následnou identifikací oblasti výskytu spor na průtokovém cytometru. Srovnání mikroskopických technik ukázalo, že pro rozlišení všech stádií sporulace je nejvhodnější světelná mikroskopie s fázovým kontrastem. Ultratenkými řezy bylo možné sledovat akumulaci granulosy a obalové vrstvy spor, ale tato technika vyžaduje náročnou přípravu vzorku. Fyziologický stav populace byl sledován pomocí fluorescenčních sond karboxyfluorescein diacetát (CFDA), propidium jodid (PI) a bis-(1,3-dibutylbarbiturová kyselina) trimethin oxonol (BOX), které byly vyhodnoceny jako vhodné pro monitoring všech stádií sporulace.

Adhezní vlastnosti anaerobních kontaminantů potravin

Bittner M., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Úvod

Anaerobní bakterie jsou důležitá skupina kontaminantů piva. Mezi nejobávanější patří zejména zástupci rodů *Pectinatus* a *Megasphaera*. Předpokládá se, že tyto bakterie jsou schopny dlouhodobě přežívat v pivovarském prostředí díky své schopnosti vytvářet, nebo být součástí biofilmu. Cílem práce bylo určit povrchové vlastnosti různých druhů bakterií vyskytujících se v pivovarském prostředí a materiálů typických pro výrobní zařízení v potravinářství (ocel, plasty, sklo, keramika). Práce je založena na predikci adheze, aplikací termodynamického modelu, DLVO a XDLVO teorie, popisující adhezi buněk na pevný nosič z fyzikálně-chemického hlediska. Stejným způsobem bylo vyhodnoceno také riziko buněčné adheze na různě upravené (APTES, PTES, silanizované, hydrolyzované) skleněné nosiče, které svými povrchovými vlastnostmi simulují vlastnosti materiálů používaných v potravinářských provozech. Skutečná míra adheze byla měřena pomocí adhezních testů, které byly provedeny v sádkovém režimu, kdy byl modelový nosič umístěn v kultivačním zařízení po celou dobu růstu mikroorganismu. Míra adheze byla vyhodnocena pomocí obrazové analýzy.

Experimentální část

Mikroorganismus a jeho kultivace: Buněčná populace *Pectinatus frisingensis* DSM 20465 byla kultivována při teplotě 30°C v růstovém médiu ve složení MRS bujón 52 g/l, thioglykolát sodný 0,5 g/l a L-cystein hydrochlorid 0,5 g/l (Sigma-Aldrich), po dobu cca 48 hodin. Druhý testovaný kmen *Megasphaera cerevisiae* DSM 20461 byl kultivován za stejných podmínek, jako výše zmíněný kmen po dobu cca 24 hodin. Buňky byly kultivovány až po dosažení stacionární fáze růstu, poté dvakrát promyty destilovanou vodou (Sorvall, 6000 rpm, 10 minut) a resuspendovány v destilované vodě. Získaná buněčná suspenze byla použita pro přípravu vrstvy buněk na nitrocelulózový filtr (velikost pórů 0,45μm, průměr membrány 0,47mm, WHATMAN). Vrstva buněk byla poté použita pro fyzikálně-chemickou charakteristiku buněčných povrchů.

Povrchová úprava modelových skleněných nosičů: Skleněná podložní sklíčka byla hydrolyzovaná použitím směsi Piraña (směs kyseliny sírové a peroxidu vodíku), silanizovaná použitím Silanizační směsi I (Sigma-Aldrich), anebo upravena použitím 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES) (Qin a kol., 2007).

Fyzikálně-chemická charakterizace interagujících povrchů: Hodnoty kontaktních úhlů byly získány měřením tzv. metodou přisedlé kapky (objem

kapky $3 \pm 0,2 \mu\text{l}$) na vrstvách buněk řas a povrchu pevných nosičů použitím goniometru k měření kontaktních úhlů (CAM200, KSV, Finsko). Měření bylo prováděno při 25°C pomocí tří kapalin: vody, formamidu a α -bromnaftalenu. Celkové povrchové napětí (γ^{tot}) a jeho komponenty (γ^{LW} , γ^+ , γ^- , γ^{AB}) a hodnoty volných energií interakcí mezi buňkou a nosičem ve vodě bylo vypočítané podle teorie van Osse (van Oss, 1995). Dále následovalo měření zeta potenciálu buněk a nosičů v modelovém prostředí $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ KCl o pH 7. V případě suspenze buněk (o absorbanci 0,1 Při 600 nm) byl použit přístroj Zetasizer Nano ZS (Malvern). U skleněných nosičů o velikosti $20 \times 10 \text{ mm}$ přístroj SurrPAAR, (Anton Paar) pro ZP pevných materiálů. Jedním z důležitých kroků bylo také měření charakteristických rozměrů buněk, které byly měřeny pomocí mikroskopu, který je propojen s digitálním fotoaparátem (Olympus BX51, Nikon Eclipse E400). Fotografie byly posléze vyhodnocovány pomocí softwaru NIS Elements 3.0 (Laboratory Imaging s.r.o., Czech Republic).

Adhezní testy: Adheze buněk mikroorganismů na skleněné nosiče probíhala během jejich kultivace ve skleněném reaktoru umístěném v termostátovém inkubátoru při 30°C . K adhezním testům byly použity skleněné destičky ($26 \times 76 \text{ mm}$) s povrchem modifikovaným APTES (3-aminopropyltriethoxysilan), skleněné destičky hydrolyzované ve směsi Piraña (směs kyseliny sírové a peroxidu vodíku) a skleněné destičky s povrchem modifikovaným Silanizačním roztokem I (Sigma Aldrich). Skleněné nosiče byly, po dosažení stacionární fáze růstu mikroorganismu, vyjmuty z reaktoru a standardním způsobem opláchnuty. Osídlená plocha nosiče byla určena pomocí přístroje Cellavista (Roche, Switzerland) a vyhodnocena pomocí obrazové analýzy. Fotografie byly vyhodnocovány pomocí softwaru NIS Elements 3.0 (Laboratory Imaging s.r.o., Česká Republika).

Výpočet interakčních energií

Předpoklad adheze podle Termodynamického modelu

Termodynamický model umožňuje vypočítat hodnoty potenciální interakční energie v místě kontaktu buňky s nosičem na základě rovnováhy mezifázových volných energií a tím předpovědět, zda fyzikálně-chemické vlastnosti povrchů povedou ke stabilní adhezi či nikoliv. Pro výpočet volné interakční energie povrchu nosiče a povrchu buňky ve vodním prostředí je nezbytné znát komponenty povrchového napětí interagujících částic (γ^{LW} , γ^+ , γ^-). K jejich výpočtu slouží tzv. rozšířená Youngova rovnice (Van Oss C.J., 1995).

Předpoklad adheze podle DLVO teorie

Klasická DLVO teorie umožňuje výpočet interakčních energií dvou přibližujících se a na sebe působících povrchů. Zahrnuje působení

nespecifických fyzikálněchemických sil (disperzní, elektrostatické interakce). Hodnoty vstupující do výpočtu získané experimentálně jsou zeta potenciál buněk a nosičů, průměr buněk, iontová síla prostředí.

Předpoklad adheze podle rozšířené (X)DLVO teorie

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

Výsledky a diskuze

Ověření předpokladů adhezními testy

Jelikož všechny použité matematické modely vycházejí ze zjednodušujících předpokladů, jejich platnost lze ověřit pouze experimentálně a to adhezním testem. Testy použité v této práci ukázaly, že buňky bakterie rodu *Pectinatus* a *Megasphaera* kolonizují v největší míře sklo modifikované 3-aminopropyltriethoxysilanem (APTES sklo) a v nejmenší míře hydrolyzované sklo viz Tab. I.

Tab. I. Hodnoty procentuálního osídlení plochy jednotlivých nosičů buňkami rodů *Pectinatus* a *Megaphaera*.

osídlená plocha %	Materiál - sklo		
Organismus	Hydrolyzované	APTES	Silanizované
<i>P. frisingensis</i>	2,6 ± 0,64 %	3,73 ± 0,54 %	3,02 ± 0,45 %
<i>M. cerevisiae</i>	0,13 ± 0,04 %	0,76 ± 0,12 %	0,14 ± 0,05

Předpověď adheze mikroorganismů na základě termodynamického modelu

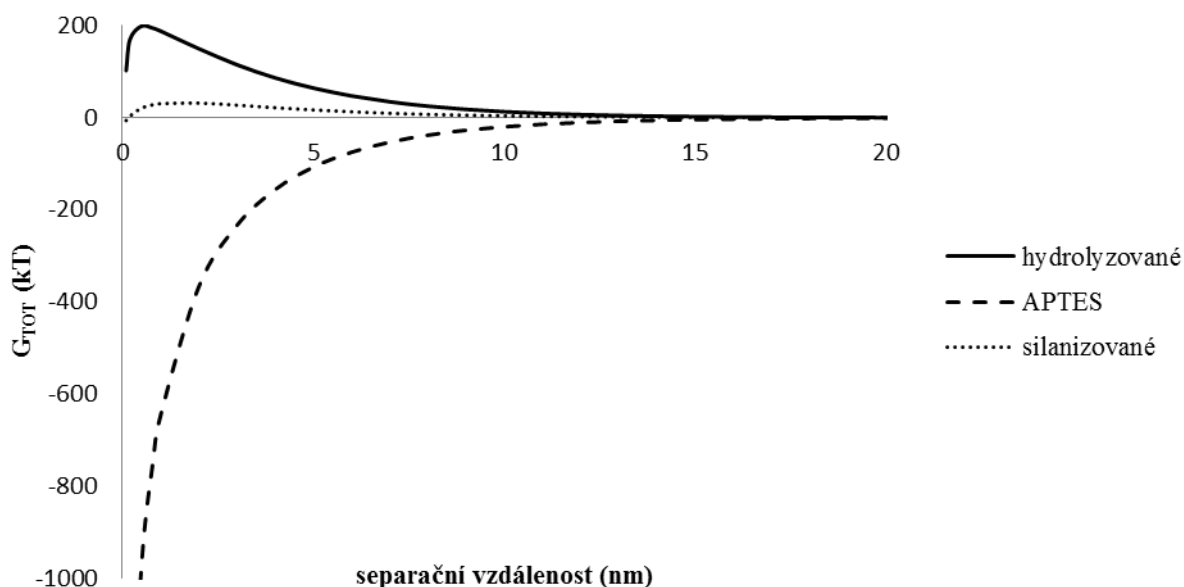
Soudržnost interagujícího systému buňka-nosič ve vodním prostředí z hlediska volné energie je výhodná, když rozdíl Gibbsovy energie adheze (ΔG^{TOT}) je záporný a naopak (Bos a kol., 1999). Výsledky výpočtu podle termodynamického modelu naznačují, že z energetického hlediska nejstabilnější adhezi lze očekávat v případě interakce silanizovaného skla a buněk rodu *Pectinatus*. (Tab. II).

Tab. II. Celkové volné interakční energie (ΔG^{TOT} [mJ.m⁻²]) systémů buňka(B)-voda(W)-nosič(N), kde buňku reprezentují bakterie rodu *Pectinatus* a *Megasphaera* a nosič modifikované skleněné materiály.

Materiál (nosič)	<i>M. Cerevisiae</i> ΔG^{TOT} [mJ.m ⁻²]	<i>P. Frisingensis</i> ΔG^{TOT} [mJ.m ⁻²]
Sklo hydrolyzované	33,1	23,9
Sklo APTES	21,3	12,5
Sklo silanizované	2,7	-2,8

Předpověď adheze buněk mikroskopických konatminantů piva na základě DLVO teorie

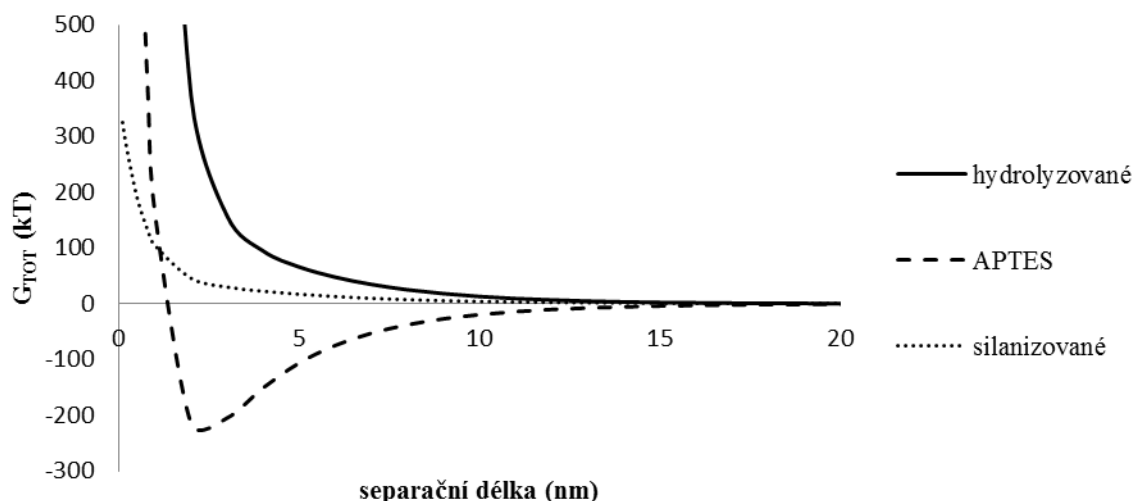
Výsledky předpovědi adheze pomocí DLVO teorie ukazují, že nelze očekávat adhezi buněk bakterie rodu *Megasphaera* na hydrolyzované sklo (Obr. 1) vzhledem k přítomnosti energetické bariéry (pozitivní hodnoty G^{TOT}) v separační vzdálenosti nižší než 15 nm. To znamená, že za reálných kultivačních podmínek bude blízký kontakt buňky a hydrofilního skla nepravděpodobný kvůli odpuzivým elektrostatickým silám. Naopak v případě skla modifikovaného APTES (3-aminopropyltriethoxysilan) a buněk bakterií rodu *Megasphaera* je DLVO teorií předpovídan volný kontakt buněk s nosičem, bez přítomnosti omezujících odpuzivých sil, díky záporným hodnotám G^{TOT} (Obr. 1). Stejných výsledků (absence energetické bariéry pouze v případě APTES skla) bylo dosaženo i v případě buněk rodu *Pectinatus*. Výsledky adhezních testů (Tab. I) je potvrzením platnosti DLVO modelu za podmínek experimentu.



Obr. 1: Závislost celkové interakční energie na separační vzdálenosti mezi buňkou (populace bakterií rodu *Megasphaera*) a nosičem (APTES sklo, hydrolyzované sklo, silanizované sklo) vypočítaná na základě DLVO teorie.

Předpověď adheze buněk mikroskopických řas na základě rozšířené (X)DLVO teorie

Podle XDLVO teorie je adheze všech kultivovaných buněk vysoce pravděpodobná na sklo modifikované APTES (negativní G^{TOT} , Obr. 2). Opačným extrémem je hydrofilní sklo (negativní zeta potenciál), které by podle XDLVO teorie nemělo být vhodným nosičem pro buňky rodu *Megasphaera* (pozitivní G^{TOT} , Obr. 2). Adheze buněk na silanizované sklo také není podle XDLVO teorie příliš pravděpodobná (pozitivní G^{TOT} , Obr. 2). Konfrontací předpovědí z matematického modelu XDLVO (Obr. 2) s reálnými experimenty buněčné adheze (Tab I.) lze stejně jako v případě DLVO teorie říct, že model správně předpověděl nejvyšší míru adheze buněk na APTES sklo. Rovněž nízký stupeň kolonizace hydrolyzovaného skla a silanizovaného skla byl očekáván na základě XDLVO modelu.



Obr. 2. Závislost celkové interakční energie na separační vzdálenosti mezi buňkou (populace bakterií rodu *Megasphaera*) a nosičem (APTES sklo, hydrolyzované sklo, silanizované sklo) vypočítaná na základě XDLVO teorie.

Závěr

Ke zhodnocení fyzikálně-chemické povahy adheze bakteriálních kontaminantů piva rodu *Pectinatus* a *Megasphaera* k pevným nosičům (hydrolyzované sklo, sklo modifikované pomocí 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES), silanizované sklo) byly využity tři přístupy výpočtu interakčních energií. Termodynamický model, DLVO teorie a XDLVO teorie. Obecně lze říci, že soulad resp. nesoulad mezi předpovědí buněčné adheze na základě modelů, majících různě zjednodušující předpoklady, a reálnou adhezí pomáhá pochopit řídicí děje

buněčné interakce s pevnými substráty. Správnou identifikací nejdůležitějších faktorů adheze mikroorganismů, v našem případě bakterií rodu *Pectinatus* a *Megapshaera*, můžeme tomuto jevu volbou správných materiálů předejít.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.21/2012) a GAČR (P503/12/1424).

Reference

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

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

Qin M., Hou S., Wang L., Feng X., Wang R., Yang Y., Wang C., Yu L., Shao B., Qiao M. (2007) *Two methods for glass surface modification and their application in protein immobilization.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 60, 243–249.

Biosyntéza vybraných kyselin citrátového cyklu - výběr mikroorganismů

Macháčková J., Rychtera M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Cílem této práce je otestovat vybrané mikroorganismy na produkci kyselin citrátového cyklu, mezi které patří jantarová, jablečná a fumarová kyselina, a následně vybrat, které z těchto mikroorganismů jsou z hlediska množství vyprodukovaných kyselin nejlepší.

Bylo testováno celkem 13 kvasinkových a tři plísňové kmeny. Dva kvasinkové kmeny *Candida zeylanoides* a *Candida catenulata* byly také zvlášť kultivovány na médiu obsahujícím etanol jako zdroj uhlíku. Jako potenciální nejlepší producenti jantarové kyseliny byly dle literatury také testovány anaerobní kapnofilní bakterie dostupné v Německé sbírce mikroorganismů, konkrétně *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia ruminalis*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Wolinella succinogenes*, *Flavobacterium succinicans*, které při tvorbě organických kyselin využívají CO₂. Některé z uvedených mikroorganismů byly kultivovány také ve větším měřítku ve fermentoru, konkrétně *Mannheimia ruminalis*, *Kloeckera apiculata* a *Candida zeylanoides*.

Experimenty prokázaly, že nejvyšších hodnot vyprodukovaných kyselin jablečné, jantarové a fumarové dosahují bakterie *Actinobacillus succinogenes* a *Mannheimia ruminalis*. Bylo dosaženo koncentrace jablečné kyseliny přes 6 g.l⁻¹ a jantarové kyseliny přes 2 g.l⁻¹.

Selekce vhodného producenta etanolu z lignocelulózových materiálů a jeho využití v SSF procesu

Pošta J., Paulová L., Melzoch K.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývá selekcí vhodného producenta etanolu z lignocelulózových materiálů, jenž jsou perspektivní surovinou pro výrobu bioetanolu. Selektce vhodného producenta etanolu z vybraných mikroorganismů (*S.cerevisiae*, *C.utilis*, *K.marxianus*, *P.stipitis*, *Z.mobilis*, *M.rouxii*) byla provedena na základě spektra využívaných sacharidů, které se vyskytují v hydrolyzátech lignocelulózových materiálů, a dále na základě rychlosti produkce ($0,889 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ – *Z.mobilis*, $0,290 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ – *K.marxianus*) a výtěžnosti etanolu ($0,59 \text{ g.g}^{-1}$ – *Z.mobilis*, $0,52 \text{ g.g}^{-1}$ *K.marxianus*) z glukózy a schopnosti produkovat etanol za vyšších teplot blízkých se optimální teplotě enzymové hydrolýzy během SSF procesu. Na základě těchto kritérií byli jako vhodní producenti etanolu vybráni *Z.mobilis* a *K.marxianus*. Bakterie *Z.mobilis* i kvasinka *K.marxianus* dosáhli při teplotě 40°C výtěžnosti etanolu $0,37 \text{ g.g}^{-1}$. Potenciál kvasinky *P.stipitis* tkví v možnosti jejího použití pro dofermentování zbylé xylózy v hydrolyzátu poté, co glukóza byla přeměněna na etanol jiným mikroorganismem, čímž by došlo k navýšení celkové výtěžnosti etanolu. *P. stipitis* tak byla otestována na živném médiu obsahujícím směs glukózy a xylózy (výtěžnost etanolu $0,27 \text{ g.g}^{-1}$) a samotnou xylózu (výtěžnost etanolu $0,35 \text{ g.g}^{-1}$). Další část práce byla zaměřena na výběr vhodného komerčně dostupného enzymového preparátu, který by rozkládal celulózu s vysokou účinností. Na základě provedených testů byly vybrány přípravky, které dosáhly nejvyšší konverze celulózy na glukózu - NS-22086 (konverze 67%) od firmy Novozyme a Celuláza 500β (konverze 35%) od firmy Bio-BN.

Separace kvasinek pomocí elektromigračních metod

Pražáková Š., Kvasnička F.

Ústav konzervace potravin, VŠCHT Praha

Anotace

V posledních letech se začínají využívat k separaci a identifikaci mikroorganismů v různých vědních oborech elektromigrační metody. Většina publikovaných prací na téma separace mikroorganismů pomocí elektromigračních metod se zabývá detekcí mikrobiální kontaminace a identifikačními možnostmi v lékařské, ale i v potravinářské oblasti. Výsledky experimentů naznačují, že separace a identifikace mikroorganismů založená na těchto metodách je velmi citlivá, levná a především velmi rychlá a proto předpokládáme, že by se tyto metody daly využít při separaci pivovarských kvasinek.

Historie

První elektroforetické experimenty byly prováděny v různých médiích již na konci 19. století. Elektroforetické techniky, které využívají elektrické pole k separaci ionogenních částic, byly vyvíjeny v průběhu 20. století.

Elektroforéza se začala vyvíjet až v 50. letech 20. století. Objevily se také další elektroforetické techniky – izoelektrická fokuzace a izotachoforéza. Tyto tři metody jsou nejen odlišné v principu separace, ale také v prostředích, která se využívala při vývoji těchto metod. V začátcích elektroforézy se využíval k separaci látek papír. V roce 1955 Smithies použil pro elektroforézu škrobový gel. V roce 1957 Kohn využil jako nosič pro elektroforézu acetát celulózy a o dva roky později, v roce 1959, Ornstein, Davis a Raymond s Weintraubem použili polyakrylamidový gel. Kapiláry byly do elektroforézy zavedeny J. W. Jorgensonem a K. D. Lukacsovou na začátku osmdesátých let dvacátého století. (1,2,3)

Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační metody jsou souhrnně uváděny pod jednotným názvem - vysokoúčinná kapilární elektroforéza (High-Performance Capillary Electrophoresis, HPCE). Jedná se o účinné analytické separační metody, které umožňují separaci, identifikaci a kvantifikaci ionogenních i neutrálních částic. Metody HPCE zahrnují několik elektroforetických technik lišících se separačním mechanismem realizovaných v kapilárním instrumentálním systému:

kapilární zónová elektroforéza (CZE),
kapilární izotachoforéza (CITP),

kapilární izoelektrická fokuzace (CIEF),
elektroforéza v síťovacích prostředích využívající agarózové i polyakrylamidové gely (CGE)
elektroforéza v kapalných síťovacích mediích (SDS-elektroforéza bílkovin),
bioafinitní elektroforéza
a dále kombinované elektromigrační a chromatografické techniky:
elektrokinetická chromatografie (MEKC)
kapilární elektrochromatografie (CEC). (1,2,4)

Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza (CZE = Capillary Zone Electrophoresis) dělí ionogenní látky na základě jejich rozdílné elektroforetické pohyblivosti při konstantním napětí. Kromě elektroforetické pohyblivosti ovlivňuje směr a rychlost migrace analytů také elektroosmotický tok (EOF). V běžných křemenných kapilárách je rychlost EOF větší než elektroforetická pohyblivost většiny záporně nabitých analytů, proto je výsledná migrace ionogenních částic orientována ke katodě. Neutrální částice se budou pohybovat ke katodě rychlostí EOF. Během jedné analýzy lze současně analyzovat anionty i kationty v separačním (základním) elektrolytu, kdy kationty k detektoru dorazí jako první, protože mají nejvyšší rychlost a anionty se budou pohybovat pomaleji, protože jdou proti EOF. (1,5,6)

Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)

Isoelektrická fokusace (isoelectric focusing = IEF) umožňuje separaci amfolytů na základě jejich rozdílných isoelektrických bodů. Při separaci se uplatňuje kromě elektroforetické pohyblivosti iontů i gradient pH prostředí elektrického pole. Kapilára je naplněna tzv. amfolytem obsahující směs látek s odlišnými hodnotami pK. Dělené látky, po vložení napětí, migrují roztokem amfolytů do dosažení pH, které se rovná jejich isoelektrickému bodu (pI). V místě kapiláry, kde dosáhnou separující látky hodnotu pH = pI, se stávají elektroneutrálními a vytvoří úzkou zónu (fokuzují). (1,6,7)

Kapilární izotachoforéza (CITP)

Kapilární izotachoforéza (CITP = Capillary isotachopheresis) je elektroforéza realizovaná v diskontinuálním systému dvou elektrolytů s odlišnou elektroforetickou pohyblivostí iontů. Separace iontů probíhá po připojení napětí. Vzorek se vkládá mezi tzv. vedoucí elektrolyt (leading electrolyte), který obsahuje iont stejného náboje jako dělené ionty vzorku, ale má nejvyšší pohyblivost a tzv. koncový elektrolyt (terminating electrolyte) stejného náboje s iontem s nejnižší elektroforetickou pohyblivostí. Separované ionty během analýzy vytváří zóny, které jsou seřazeny za sebou podle klesající elektroforetické pohyblivosti. Při jedné analýze lze tedy separovat buď kationty, nebo anionty. (1,4,7)

Separace mikroorganismů pomocí elektromigračních metod

Elektromigrační techniky byly navrženy jako náhrada za tradiční mikrobiologické identifikační metody. V této oblasti bylo provedeno mnoho výzkumů a výsledky experimentů naznačují, že diagnostika založená na této technologii může být velmi citlivá, levná a především velmi rychlá. (8)

Princip separace mikroorganismů je založen na elektrickém náboji, který je na povrchu buněčné stěny, a elektroforetické pohyblivosti buněk při působení elektrického pole. Buněčná stěna většiny mikroorganismů je elektricky nabitá a při fyziologickém pH má záporný náboj. Ten je ovlivněn složením polymerů, které vytvářejí povrch buněk. Faktory jako jsou genetické modifikace, podmínky růstu, způsob izolace, stáří buněk mohou vést ke změně výsledného povrchového náboje buněčné stěny a tím i ke změně elektroforetické pohyblivosti, která vede k nesprávnému přiřazení signálu daného mikroorganismu. Elektroforetická mobilita mikroorganismů v elektrickém poli je tedy závislá i na pH a iontové síle použitého roztoku elektrolytu při separaci. (2)

Kromě toho mohou některé mikroorganismy produkovat biomolekuly, které mohou vytvářet nežádoucí píky nebo mohou negativně ovlivňovat separaci ostatních separujících se mikroorganismů přítomných v analyzované směsi. (2)

Mikroorganismy mají také schopnost pomocí různých chemických a fyzikálních mechanismů přilnout k různým druhům substrátu, jako jsou nečistoty, organické nebo anorganické povrchy, nebo k mikroorganismům stejného nebo různého druhu a tvořit tzv. klastry. (2)

Možnosti ovlivnění separace mikroorganismů pomocí elektromigračních metod

Mikroorganismy, stejně jako biologické látky, mají tendenci se absorbovat na povrch kapilární stěny a tím rozostřovat zóny. Obecně platí, že vysoké koncentrace elektrolytů snižují adsorpci analytů na stěnu kapiláry. (9,2) Pro separaci mikroorganismů se ve většině případů používají elektrolyty fosfátové, borátové, citrátové a fosfáto – borátové. (10)

Při separaci mikroorganismů je zároveň nutné minimalizovat silný EOF (9), který vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní části elektrické dvojvrstvy, na rozhraní pevné a kapalné fáze na vnitřní stěně kapiláry. (4,6)

EOF lze například ovlivnit pomocí vhodných experimentálních podmínek, mezi které lze zařadit pH elektrolytu (ovlivňuje disociaci silanolových skupin na stěně kapiláry), iontovou sílu elektrolytu (ovlivňuje zeta potenciál mikroorganismů), organická rozpouštědla (např. methanol, acetonitril, které zvyšují rozpustnost složek analyzovaného vzorku v elektrolytu) a různá aditiva přidávaná do elektrolytu (např. polyakrylamid, polyethylenoxid, která zvyšují viskozitu a maskují náboj stěny kapiláry. (2,11)

EOF lze dále ovlivnit použitím tzv. modifikované kapiláry, jejíž vnitřní povrch je upraven různými rozpustnými polymery. Např. hydroxymethylpropyl celulóza, hydroxypropyl celulóza, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon, které zabrání adsorpci mikroorganismů na stěnu kapiláry a potlačí EOF. (12)

Další z možností, jak (ovlivnit) zvýšit účinnost separace je využití vyššího napětí s ohledem na vznikající Joulovo teplo, které by mohlo způsobit nevhodnou iontovou tepelnou vodivost mezi separovaným vzorkem a elektrolytem. Což má za následek lokální změny v elektrickém poli a tedy i změny v rychlosti migrace iontů. Joulovo teplo lze ovlivnit pomocí úzké kapiláry, elektrolytu o nízké vodivosti, popř. termoregulací samotné kapiláry. (2,4,11)

Závěr

Elektromigrační metody se stávají cenným nástrojem při detekci mikroorganismů v mnoha vědních oborech a to díky své jednoduchosti, rychlosti, citlivosti a minimálním množstvím vzorku potřebného pro analýzu.

Největší význam identifikace a kvantifikace mikroorganismů je v diagnostice infekčních chorob, ale v jiných vědních oborech jako je potravinářství a farmaceutický průmysl, kde je monitoring mikroorganismů důležitý především z hlediska bezpečnosti a řízení kvality.

Problematika, která je spojená se separací, identifikací a kvantifikací mikroorganismů pomocí elektromigračních metod, jako je adsorpce na stěny kapiláry, agregace, elektroforetická heterogenita, nízká reprodukovatelnost, lze zajistit použitím vhodných pracovních podmínek.

Reference

(1) Pazourek J. (2. 6. 2003): Moderní elektroforetické analytické metody, (přednášky pro magisterské studium), skripta.

(2) Tér T. (2011): Možnosti využití kapilární elektroforézy pro separaci mikrobů, Diplomová práce, VŠCHT.

(3) Gaš B. (2001): Kapilární elektroforéza, separační analytická metoda pro věk mikročipů, Vesmír, **80**: 370 – 373.

(4) Klouda P. (2003): Moderní analytické metody, Ostrava, Pavel Klouda, ISBN 80-86369-07-2. str. 33 – 39.

(5) www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/separace.pdf (únor 2012).

(6) Kašička V. (1997): Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod, Chemické listy, **91**: 320 – 329.

- (7) Králová B., Fukal L., Rauch P., Ruml T. (2007): Bioanalytické metody, Praha, VŠCHT, ISBN 978-807080-449-3, str. 232.
- (8) Kłodzińska E., Tănase Ș., Tomescu A. A., Moga M., Buszewski B. (2010): Capillary zone electrophoresis in determination of microorganisms. *Revue Roumaine de Chimie*, 55(6): 283-288.
- (9) Horká M., Růžička F., Horký J., Holá V., Šlais K. (2006): Capillary isoelectric focusing of proteins and microorganisms in dynamically modified fused silica with UV detection. *Journal of Chromatography B*, **841**: 152-159.
- (10) Rypárová O., Petr J., Kowalska M., Znaleziona J., Knob R., Maier V., Frébort I., Ševčík J. (2008): Analýza mikroorganismů metodou kapilární elektroforézy. *Chemické listy*, **102**: 1121-1126.
- (11) Tagliaro F., Manetto G., Crivellente F., Smith F.P. (1998): A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International*, **92**: 75-88.
- (12) Szumski M., Kłodzińska E., Buszewski B. (2005): Separation of microorganisms using electromigration techniques. *Journal of Chromatography A*, **1084**: 186 – 193.

Vliv surovin a technologie na prekurzory přepěňování piva

Poštulková M., Fiala J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Úvod

Jev gushingu je charakterizován tím, že okamžitě po otevření láhve, tzn. po odstranění nadměrného tlaku nad pivem, se vytvoří velké množství jemných bublinek v celém objemu piva, které stoupají vzhůru a vytváří pěnu, která přetéká z láhve a v nejhorších případech dokonce z láhve vytryskne. Prudká reakce obvykle po několika vteřinách skončí (Hippeli a Elstner, 2002). Pro lepší přehlednost je gushing dělen na primární a sekundární. Primární souvisí s napadením ječmene vláknitými houbami (nejčastěji rodu *Fusarium*) a především pak se sekundárními metabolity těchto plísní, jako jsou hydrofobiny nebo ns-LTPs¹. Sekundární přepěňování se projevuje v technologickém zpracování (např. nečistoty v lahvích, krystaly šťavelanu vápenatého a další). Ve skutečnosti se oba jevy prolínají a vzájemně souvisí (Pellaud, 2002; Hippeli a Elstner, 2002). Hydrofobiny jsou na cystein bohaté bílkovinné struktury, produkovány vláknitými houbami a jako takové jsou považovány za přímé prokurzory přepěňování piva (Hippeli a Elstner, 2002).

Přepěňování piva je multifaktoriální problém a jako takový ho ovlivňují prakticky všechny faktory výroby sladu a piva. Nejvíce však gushing souvisí s ječmenem a z něj vyrobeným sladem.

Materiál a metody

Byla k dispozici data pivovaru sídlícího na území České republiky a vyrábějící komerčně dostupné pivo. Ze zpracovaných dat pak bude upozorněno na některé trendy, jež souvisí s přepěňováním.

Databáze obsahovala množství dat, která se vztahovala k reálným vzorkům různých sladů přivezených do pivovaru a použitých pro výrobu piva. Tyto všechny vzorky byly podrobeny testu na stanovení přepěňovací aktivity sladu.

Ke stanovení gushingu se v laboratoři pivovaru používá klasický třídenní třepací test, původně vyvinutý v laboratořích Carlsberg a poté modifikován na provoz laboratoře. Celá procedura zahrnuje nahrazení 50 ml piva v půllitrové lahvi sladinovým extraktem a poté třídenní třepání za definovaných podmínek. Po těchto třech dnech se láhev otevře a odečte se množství vypěněného piva (Vaag, 1993).

Výsledky a diskuze

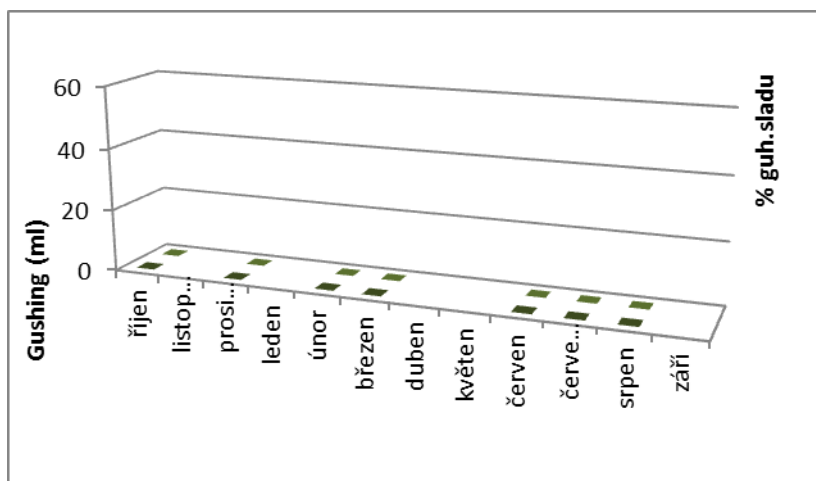
Byla zpracována data o přepěňovací aktivitě sladu v pivovaru za časové období od začátku roku 2008 až po konec roku 2011. Veškerý slad dodaný do pivovaru

je podroben testu na stanovení přepěňovací aktivity sladu. Tím vzniklo množství dat, na nichž lze pozorovat některé zajímavé trendy. Slad je dopravován do pivovaru v pytlích nebo cisternách a je poněkud obtížné zprůměrovat gushingový potenciál jednotlivých šarží. Bylo využito některých jednoduchých funkcí programu Microsoft Excel, kdy z množství dat byly vybrány vzorky s přepěňujícím potenciálem, zprůměrovány a k nim přiřazeno z jakého celkového množství pocházely.

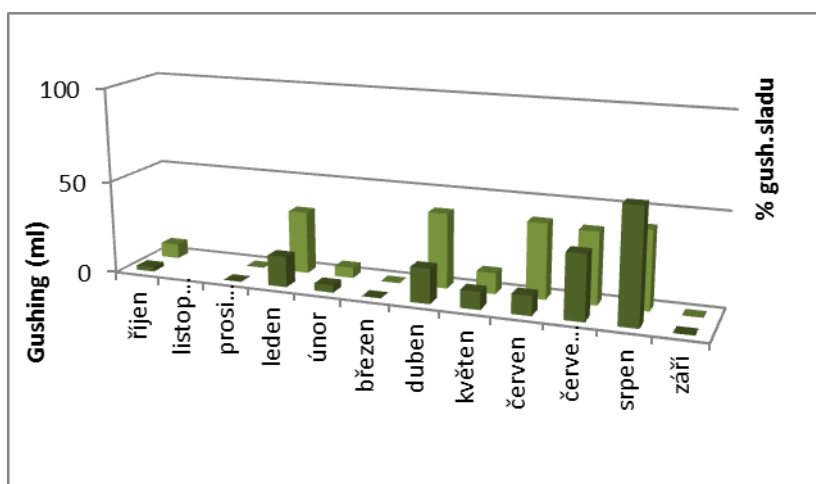
Vliv sezóny na přepěňovací aktivitu sladu

Vliv ročníku na přepěňování piva není tak neobvyklým jevem vzhledem ke skutečnosti, že přepěňování souvisí s mikrobiologickým a fyziologickým hlediskem kupovaného ječmene a z něj vyrobeného sladu. Na ukázkou jsou na obr. 1 uvedeny tři grafy sezón pohybu přepěňování u bavorského typu sladu. Sloupce v popředí udávají gushing sladu v mililitrech, v pozadí je pak procento přepěňujících sladů z celé várky. Sezóny byly zvoleny vždy od října do září. Důvodem je to, že sklizeň ječmene probíhá většinou koncem července a během srpna. Po uskladnění ječmene do sil sladoven se ještě ponechává minimálně měsíc v klidu (dormance ječmene). Během sklizně a po uskladnění (tzn. během léta a v září) se zpracovává ječmen z předchozího období a až přibližně začátkem října se začne sladovat nový ječmen. Tento způsob zpracování ječmene byl potvrzen samotnými dodavateli.

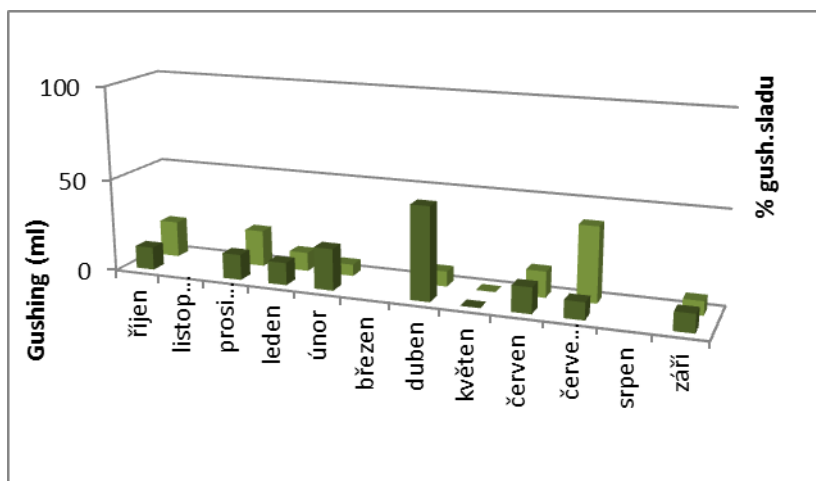
Na grafech je patrné (obr.1-3.), že během sezóny 2008-2009 měl bavorský slad téměř nulovou přepěňovací aktivitu, slady karamelový a český se během tohoto roku chovaly podobně, nicméně během některých měsíců se u nich gushing vyskytl. Dle časopisu Kvasný průmysl se jednalo o mimořádně kvalitní sezónu, jež přispěla k minimálnímu výskytu chorob ječmene a suchá sklizeň pak potlačila rozvoj mikroorganismů (Prokeš a Helánová, 2009). Dobrý zdravotní stav ječmene pak také výrazně ovlivnil přepěňování jakožto kvalitativního parametru sladu. Celkové minimum plísni způsobilo, že se jejich sekundární metabolity pravděpodobně nerozvinuly v dostatečné míře na to, aby mohly přepěňování způsobovat.



Obr. 1: Průběh přepěňování českého sladu během sezóny 2008-2009 (sloupce v popředí vyjadřují průměrný gushingový potenciál u vzorků s touto tendencí, sloupce v pozadí kolik procent z celkového množství vyšetřeného sladu přepěňovalo)



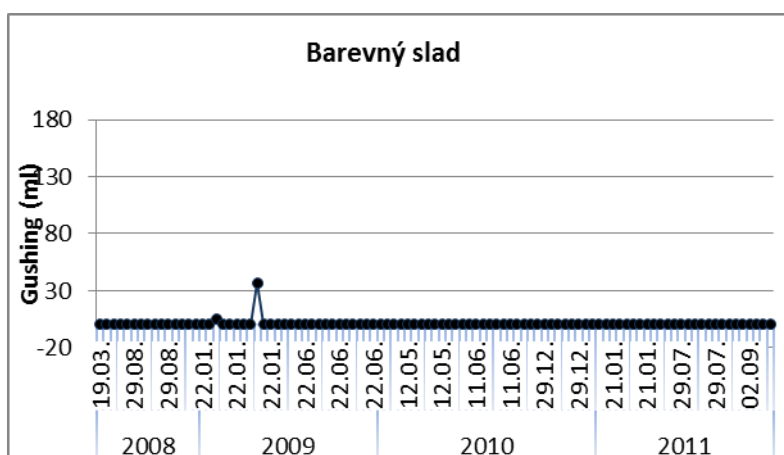
Obr. 2: Průběh přepěňování bavorského sladu během sezóny 2009-2010 (popis viz. obr.1)



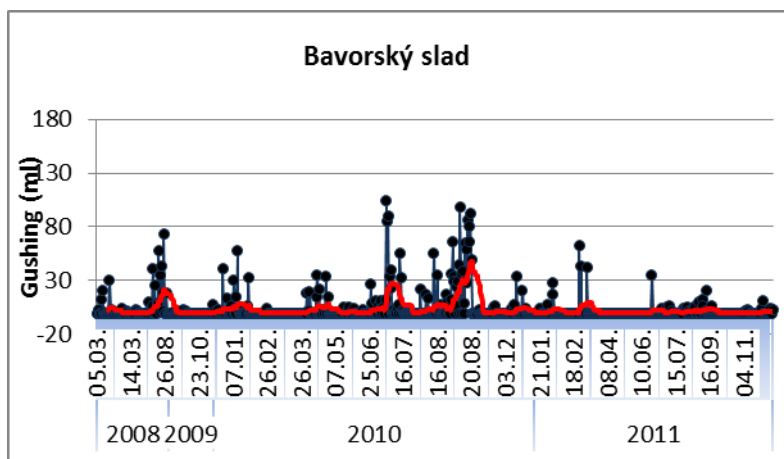
Obr. 3: Průběh přepěňování bavarského sladu během sezóny 2010-2011 (popis viz. obr.1)

Vliv typu sladu na jeho přepěňovací aktivitu

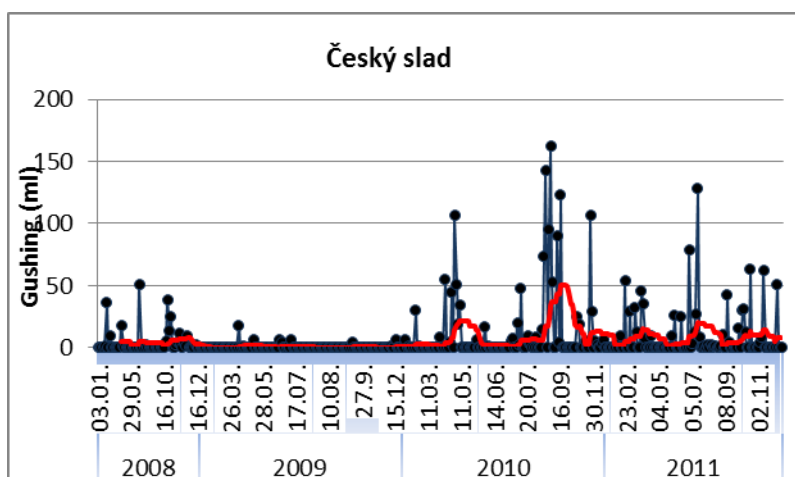
Zajímavým trendem je porovnání různých typů sladů v závislosti na přepěňování. Při srovnávání jednotlivých typů grafů (obr.4.-7.) si nelze nepovšimnout toho, že barevný slad měl za období 2008-2011 nejmenší potenci k přepěňování. Barevný slad je na pražiči dotahován až při 225 °C, dojde tak k jeho úplné enzymatické inaktivaci. Karamelové slady jsou rovněž inaktivní, ale záleží na typu karamelového sladu, nižší teplota pražení částečně enzymovou aktivitu zachovává (Basařová a kol., 2010). Při porovnání obr. 4. a obr. 7. dvou enzymově inaktivních sladů lze pozorovat, že karamelový slad na rozdíl od barevného přepěňování často vykazuje. Je tedy zřejmé, že vysoká teplota při výrobě barevného sladu může mít podstatný vliv na potenci k přepěňování.



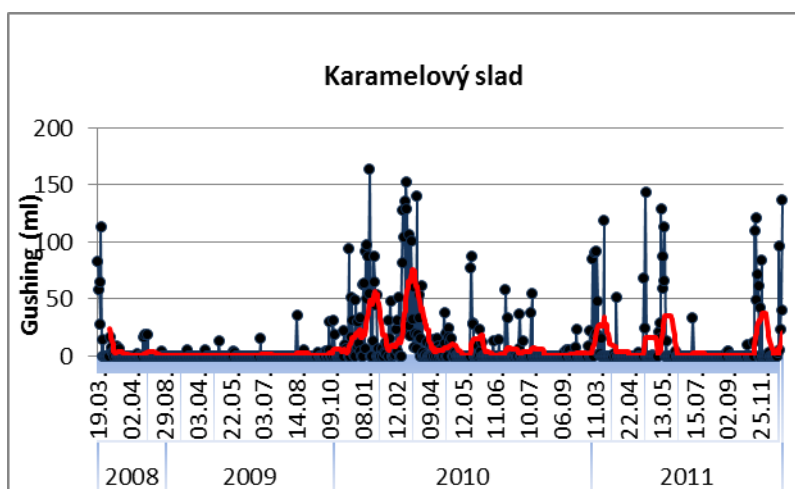
Obr. 4: Průběh přepěňování barevného sladu během období 2008-2011



Obr. 5: Průběh přepěňování bavorského sladu během období 2008-2011 (modrá křivka znázorňuje přepěňovací aktivitu vzorku, červená křivka značí klouzavý průměr 15 za sebou jdoucích období)



Obr. 6: Průběh přepěňování českého sladu během období 2008-2011 (popis křivek viz obr. 5.)



Obr. 7: Průběh přepěňování karamelového sladu během období 2008-2011 (popis křivek viz obr. 5.)

Závěr

Na potencionální přepěňování má vliv průběh klimatických podmínek během růstu a sklizně ječmene, z kvalitního ječmene je vyroben i kvalitní slad, u něhož je pak testem zjištěna minimální gushingová aktivita. Taková sezóna byla dle dat 2008-2009.

Nejmenší potenci při stanovení přepěňovací aktivity sladu má slad barevný, také vzhledem ke svým značně odlišným fyzikálně chemickým vlastnostem. Z praktického hlediska však celkové přepěňování piva může ovlivnit minimálně, v pivovarství je využíván pouze v malém množství pro výrobu piv speciálních. Složení a vlastnosti surovin pro výrobu piva gushing ovlivňují (ne-li způsobují), jejich pečlivým výběrem lze výsledný gushing omezit – především se toto tvrzení vztahuje na ječmen, který může nést gushingový potenciál a předávat ho postupně dál až do výsledného piva.

Literatura

Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T. (2010) Pivovarství, teorie a praxe výroby piva, Praha, VŠCHT, 904 stran.

Hippeli S., Elstner, E.F. (2002) Are hydrophobins and/or non-specific lipid transfer proteins responsible for gushing in beer? New hypotheses on the chemical nature of gushing inducing factors, Z. Naturforsch. [online]. 57c [25.6.2012]. Dostupné z: <http://www.znaturforsch.com/ac/v57c/s57c0001.pdf>
Pellaud J. (2002) Gushing: State of the Art, *Cerevisia* 27, str. 189-205.

Prokeš, J., Helánová, A. (2009) Jakost sladovnického ječmene sklizně 2008 v České republice, *Kvasný průmysl*, 55 (1), str. 9-15.

Vaag, P., Riis, P., Knudsen, A.D., Pedersen, S., Meiling, E. (1993) A simple and rapid test for gushing tendency in brewing materials, *Proc. Eur. Brew. Conv.*, Oslo, 24, str. 155-162.

Řešeno a financováno ve spolupráci VŠCHT Praha a pivovaru na území ČR.

Kontinuální produkce 1-butanolu

Pokorný T., Lipovský J., Patáková P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

1-butanol je možné získat tzv. aceton-butanol-ethanolovou (ABE) fermentací obvykle sacharidického substrátu pomocí solventogenních druhů rodu *Clostridium*. Kontinuální fermentace s volnými a imobilizovanými buňkami, s glukosou jako substrátem, byly prováděny ve většině případů s kmenem *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598. Při dvoustupňových fermentacích s volnými buňkami, kdy byly oba stupně vedeny za různé zředovací rychlosti ($0,1$ a $0,04 \text{ h}^{-1}$) a za různého pH ($6,5$ a 5) bylo úspěšně dosaženo pouze fáze acidogeneze tj. tvorby kyseliny máselné a octové. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s buňkami, imobilizovanými na povrch kukuřičných oklasků, kdy bylo při ustáleném stavu dosaženo produktivity tvorby rozpouštědel $0,45 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ při zředovací rychlosti $0,12 \text{ h}^{-1}$. Imobilizace metodou „entrapment“ do peletek alginátu se osvědčila jako vhodný způsob pro dlouhodobé uchování aktivních buněk, kdy v opakovaných vsádkových fermentacích v baňkách bylo stabilně dosahováno výtěžnosti $0,23 \text{ g/g}$.

Využití SPME pro stanovení senzoricky významných těkavých látek piva

Kociánová P., Štěrbá K., Dostálek P., Karabín M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Jednou z charakteristických vlastností piva je jeho aroma způsobené kombinací různých chutí a vůní. Příčinou tohoto komplexního vjemu je hlavně společné senzorické působení skupiny tzv. „těkavých látek piva“, které zahrnují například vyšší alkoholy, organické kyseliny a estery. Náplní této práce byl vývoj metody pro stanovení těchto látek využívající „head-space“ mikroextrakce na pevné fázi (HS-SPME-GC). Tato metoda je časově nenáročná a nevyžaduje velké objemy vzorků a rozpouštědel. Byly navrženy vhodné parametry extrakce (délka, teplota), GC analýzy (volba vhodné kolony, teplotní program, průtok) i přípravy vzorků (vliv přídavku NaCl) pro dosažení co nejvyšší opakovatelnosti. Tato metoda byla použita pro sledování obsahů těkavých látek v různých druzích tuzemských i zahraničních piv.

Fyziologická a genetická modifikace pivovarských kvasinek ve výrobě nealkoholického piva

Strejc J., Bittner M., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Souhrn

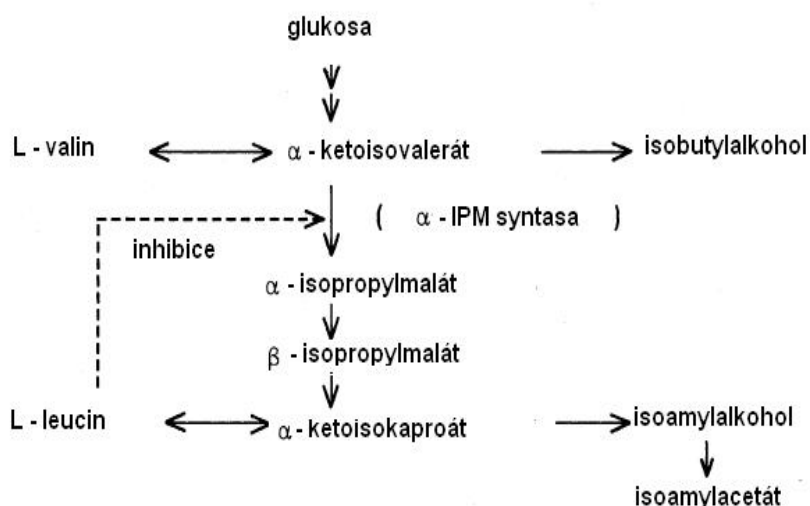
Nealkoholické pivo je nápoj, jehož obliba u spotřebitelů stále stoupá. Pro výrobce je proto žádoucí hledat nové možnosti a postupy pro zlepšení senzorických vlastností daného produktu. Jednou z možností pro dosažení kýženého výsledku může být využití speciálního kvasinkového druhu či kmene v procesu omezeného prokvašení mladiny. Práce je zaměřena na izolaci a využití mutantního kmene pivovarské kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* produkujícího zvýšené množství esteru isoamylacetátu. Syntéza isoamylacetátu je úzce spojena s dráhou syntézy leucinu, který při zvýšené koncentraci v médiu působí jako zpětnovazebný inhibitor této dráhy. Izolace je založena na selekci mutantů rezistentních ke zpětnovazebné inhibici syntetické dráhy leucinu pomocí selektivního média, které obsahuje analog leucinu (5,5,5-trifluoro-DL-leucin) se stejnou inhibiční funkcí jako samotný leucin, ale nezastupující leucin jako živinu pro buňky. Vedle produkce senzoricky aktivních látek je důležitým technologickým parametrem také rychlost kvašení. Práce se proto dále zaměřuje na měření růstové rychlosti mutantů a jejich další výběr na základě kvantifikace produkce esterů.

Úvod

Způsobů, kterými lze připravit nealkoholické pivo, existuje velké množství, ať už se jedná o způsoby, které našly rozsáhlejší uplatnění v průmyslovém měřítku, nebo o způsoby rozvinuté pouze v měřítku laboratorním. Obecně lze způsoby výroby nealkoholického piva rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupina je založena na odstraňování ethanolu z hotového piva, zatímco do druhé skupiny řadíme metody založené na omezené tvorbě ethanolu v průběhu kvašení. Souhrnně se první skupina založená na šetrném odstranění vzniklého ethanolu z piva označuje jako fyzikální metody výroby nealkoholického piva. Skupina se dále dělí na tepelné (vakuová destilace, vakuové odpařování) a membránové metody (dialýza, reverzní osmóza) a vyznačuje se odpovídajícími vyššími investičními náklady na zařízení zajišťující odstraňování alkoholu a vyššími energetickými nároky jejich provozu. Metody zařazené do druhé skupiny, která se zakládá na omezené tvorbě ethanolu, se nazývají metody biologické. Oproti fyzikálním metodám není ve většině případů tzv. biologických metod potřeba pořizovat speciální zařízení a postačí úprava technologie, tudíž jsou i investiční a provozní náklady nižší než u fyzikálních metod. Mezi biologické metody je řazeno upravené rmutování, limitované

kvašení a použití speciálních kvasinek s požadovanými technologickými parametry. Termínem speciální kvasinky je možno rozumět kmeny/druhy kvasinek, které se běžně v pivovarské praxi nevyužívají, a mutantní kmeny pivovarských kvasinek, ať už se jedná o spontánně mutované kmeny nebo kmeny připravené za pomoci metod genového inženýrství (Basařová a kol., 2010; Brányik a kol., 2012).

Jednou z cest výroby nealkoholického piva se zlepšenými organoleptickými vlastnostmi by mohlo být použití kmene nadprodukujícího určitý sensoricky aktivní metabolit ve spojitosti s metodami omezeného kvašení. Ashida a kol. (1987) popsali princip vzniku a izolaci mutantních kmenů nadprodukujících isoamylalkohol a isoamylacetát ve spojitosti se syntézou L-leucinu (Obr. 1). Z těchto dvou metabolitů je to zejména isoamylacetát, který by v případě zvýšené koncentrace mohl svou banánovou chutí a aroma představovat zajímavý zdroj sensorických vjemů pro obohacení chuťového profilu nealkoholických pív. Při vyšší koncentraci L-leucinu dochází k zpětnovazebné inhibici enzymu α -isopropylmalát syntasa. Na základě této skutečnosti se předpokládá, že mutované buňky nevykazující tuto zpětnovazebnou inhibici budou produkovat více isoamylalkoholu a isoamylacetátu než buňky nemutované. Vznik a izolace spočívá ve vystavení buněk mutagennímu činidlu po určitou dobu a poté naočkování těchto buněk na selektivní agarové medium deficientní na leucin, ale obsahující analog leucinu, který je buňkami neutilizovatelný a má schopnost stejné zpětnovazebné inhibice α -isopropylmalát syntasy jako L-leucin (Ashida a kol., 1987). Nebo na izolaci spontánně mutovaných kmenů bez použití mutagenního činidla s použitím dostatečného selekčního tlaku (Lee a kol., 1995), čehož bylo využito i v této práci.



Obr. 1 Schéma zpětnovazebné inhibice při syntéze L-leucinu.
(Ashida a kol., 1987)

Materiál a metody

Mikroorganismus

Jako výchozí kmen pro pokusy byl vybrán spodně kvasící pivovarský kmen kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* nesoucí označení 2 pocházející ze sbírky Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Praze.

Izolace mutantních kmenů nadprodukujících isoamylacetát

Izolace byla založena na využití ztuženého média (20 g.l⁻¹ agar, 20 g.l⁻¹ glukosa, 0,67 g.l⁻¹ kvasničné dusíkaté báze) s přidavkem leucinového analogu 5,5,5-trifluor-DL-leucinu (TFL). Molekulární princip izolace spontánních mutantů nadprodukujících isoamylalkohol a isoamylacetát je popsán výše, přičemž pracovní postup izolace mutantů byl následující. Byla napěstována suspenze (25 °C, 100 ot.min⁻¹) výchozího kmene v mladinovém médiu o koncentraci 7,5 % hm. Sterilní destilovanou vodou byla upravena koncentrace buněk na hodnotu 12,4×10⁶ buněk.ml⁻¹. Následně bylo rozetřeno 0,5 ml připravené buněčné suspenze na Petriho misky obsahující ztužené selektivní médium s 0,51 mM, 0,86 mM a 1,1 mM koncentrací TFL. Kultivace následně probíhala 7 dní při 30 °C. Vybrané kolonie byly přeneseny na šikmý agar (20 g.l⁻¹ agar, 30 g.l⁻¹ glukosa, 5 g.l⁻¹ KH₂PO₄, 0,4 g.l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 2 g.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2 g.l⁻¹ kvasničný extrakt) pro další uchování a manipulaci a označeny trojmístným číslem a písmenem, kdy číslo udává koncentraci TFL, při které byl mutantní kmen izolován, a písmeno označuje vlastní kolonii na Petriho misce. Například označení 086-B tedy znamená, že se jedná o mutantní kmen získaný izolací na selektivním médiu obsahujícím TFL v 0,86 mM koncentraci a vlastní kolonie na misce byla označena písmenem B.

Kultivace mutantních kmenů

Deset mutantních kmenů získaných izolací na selektivním médiu a výchozí kmen 2 byly kultivovány v syntetickém minerálním médiu (30 g.l⁻¹ glukosa, 5 g.l⁻¹ KH₂PO₄, 0,4 g.l⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 2 g.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 2 g.l⁻¹ kvasničný extrakt). Kultivace probíhala v netřepaných Erlenmayerových baňkách za teploty 8 °C. Paralelně s experimentem za stejných kultivačních podmínek probíhalo měření růstové křivky pro kmen 2 a 24 hodin po dosažení stacionární fáze byl experiment ukončen a byly odebrány vzorky na analýzu senzoricky aktivních látek. Jako další parametr byla sledována specifická růstová rychlost získaná z proměřené růstové křivky původního kmene 2 a tří mutantních kmenů.

Analýza senzoricky aktivních látek

Pro stanovení senzoricky aktivních látek bylo použito metody HS-SPME GC/MS neboli headspace mikroextrakce na tuhou fázi a plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí, Touto metodou byly analyzovány estery ethylacetát, ethylbutyrát 2-methylbutylacetát a 3-methylbutylacetát

(isoamylacetát) jako jejich suma a 2-fenylethylacetát. Bylo použito plynového chromatografu Agilent GC 6890N (Agilent Technologies, USA), kolony InnoWax 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (Agilent Technologies, USA), hmotnostního detektoru Agilent 5975B Inert MSD (Agilent Technologies, USA), mikroextrakčního vlákna potaženého vrstvou 75 μ m Carboxen/polydimethylsiloxanu (Sulpeco, USA), a automatického dávkovacího systému COMBI PAL CTC Analytics. Nosným plynem bylo He 6.0, teplota inletu byla 260 °C a tlak metody 48,75 kPa. V průběhu analýzy byl nastaven teplotní program s počáteční teplotou 30 °C po dobu deseti minut, která poté rostla rychlostí 2 °C za minutu do dosažení 52 °C, která byla udržována po dobu dvou minut. Poté byla teplota zvyšována do 65 °C rychlostí 2 °C za minutu a po jejím dosažení se rychlost zvýšila na 5 °C za minutu až do dosažení teploty 250 °C, která byla udržována po dobu tří minut. Vzorky analyzované touto metodou byly po odebrání přefiltrovány přes membránový filtr z nitrátu celulózy (Whatman, Německo) o velikosti pórů 0,45 μ m a průměru 47 mm a uschovány v mrazničce do vlastní analýzy. Pro vlastní analýzu byly do tmavých 20 ml kyvet odváženy 2 g NaCl, bylo přidáno 10 ml vzorku a 0,1 ml vnitřního standardu obsahujícího ethylheptanoát.

Výsledky a diskuze

Izolace mutantních kmenů

Počet buněčných kolonií narostlých na jednotlivých miskách (Obr. 2) se selektivním médiem je uveden v tabulce (Tab. I.) společně s procentuální úspěšností nárůstu kolonií, která vyjadřuje podíl narostlých kolonií k celkovému počtu buněk nanesených na misku. Nejvíce kolonií narostlo na médiu s nejnižší koncentrací TFL tedy 0,51 mM, nejméně pak při koncentraci 1,1 mM. Výsledky procesu izolace kolonií potvrdily, že zvyšující se koncentrace TFL má vliv na snižující se počet vzniklých kolonií (Lee a kol., 1995). Následující pokusy však ukázaly, že kolonie narostlé při vyšší koncentraci nemusí být zárukou vyšší produkce isoamylacetátu oproti koloniím narostlým při nižší koncentraci TFL. Pro další práci bylo náhodně vybráno osm kolonií z misky s 1,1 mM koncentrací TFL a dvě kolonie z misky s 0,86 mM koncentrací TFL.

Tab. I. Počet kolonií a frekvence/procentuální úspěšnost nárůstu kolonií pro rozdílné koncentrace 5,5,5-trifluor-DL-leucinu (TFL).

koncentrace TFL [mM]	počet kolonií	frekvence/ procentuální úspěšnost nárůstu kolonií
0,51	126	1:49200/0,00203 %
0,86	55	1:112730/0,0008 %
1,1	17	1:364700/0,00027 %



Obr. 2 Nárůst kolonií na Petriho miskách se ztuženým selektivním médiem obsahujícím 0,51 mM (vlevo), 0,86 mM (uprostřed) a 1,1 mM (vpravo) koncentraci 5,5,5-trifluor-DL-leucinu.

Produkce esterů

Produkce esterů ethylacetátu, ethylbutyrátu, sumy 2-methylbutylacetátu a 3-methylbutylacetátu (isoamylacetát) a 2-fenylethylacetátu u vzorků vzniklých kvašením syntetického minerálního média za pomoci původního kmene 2 a deseti mutantních kmenů od něho odvozených byla zjišťována prostřednictvím HS-SPME GC/MS. Zjištěné množství esterů v jednotlivých vzorcích bylo následně vyjádřeno relativně v procentech (Tab. II) vztažením na množství jednotlivých esterů u vzorku kvašeném původním kmenem 2. Tento vzorek tedy nabývá pro jednotlivé estery hodnoty sto procent.

Tab. II. Relativní vyjádření obsahu zjišťovaných esterů a celkové sumy esterů v procentech vztažením hodnot pro jednotlivé vzorky ke vzorku kvašeném původním kmenem 2.

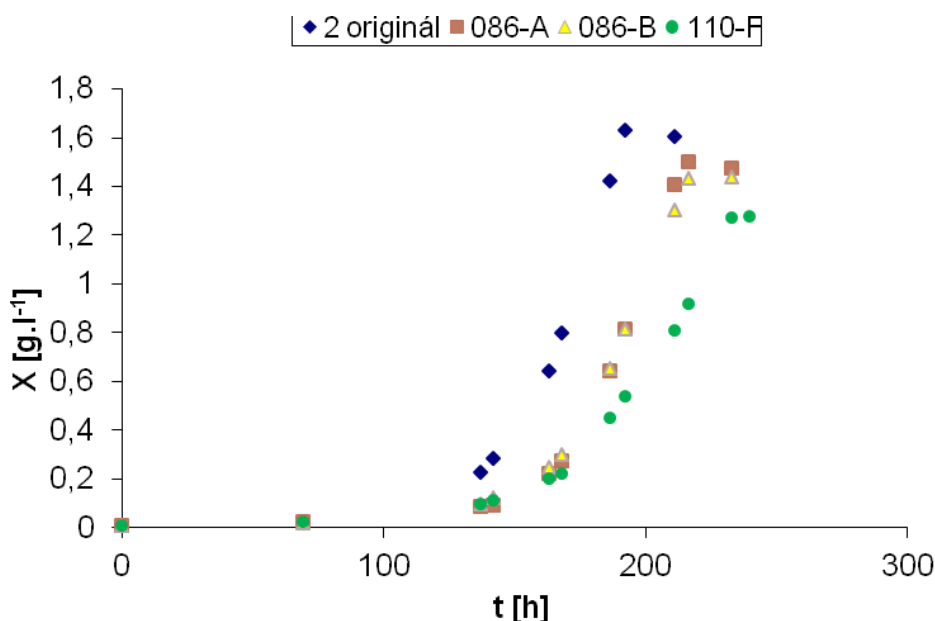
	2	110-A	110-B	110-C	110-D	110-E	110-F	110-G	110-H	086-A	086-B
ethylacetát	100	30	44	80	59	120	124	56	154	75	143
ethylbutyrát	100	31	43	85	41	77	98	50	114	66	145
methylbutylacetáty	100	109	235	69	35	69	146	129	132	194	258
2-fenylethylacetát	100	38	30	76	43	96	113	38	95	29	87
suma esterů	100	40	53	72	43	80	109	61	209	123	234

Výsledné hodnoty ukázaly, že z hlediska obsahu methylbutylacetátů sedm z deseti mutantních kmenů vyprodukovalo více methylbutylacetátů než původní kmen 2. Jednoznačně nejvíce methylbutylacetátů při porovnání s kmenem původním vyprodukoval kmen 110-B a kmeny 086-A a 086-B, ačkoliv tyto dva kmeny byly získány izolací při nižší koncentraci TFL oproti zbylým osmi

zkoumaným mutantním kmenům. Ze zbylé trojice zjišťovaných esterů nepřesáhl jejich obsah u mutantních kmenů kmen původní u více jak čtyř vzorků s výraznějšími výkyvy oproti původnímu kmenu 2 směrem dolů u vzorků 110-A, 110-B, 110-D a 110-G. Nejvýraznější změnou produkce jak jednotlivých esterů tak jejich sumy oproti kmenu původnímu vynikal mutantní kmen 086-B, který měl nižší produkci pouze pro ester 2-fenylethylacetát.

Růstové vlastnosti

Z hlediska výroby nealkoholického piva je výhodné, aby produkční kmen tvořil co nejméně ethanolu, případně vykazoval nízkou rychlost kvašení umožňující účinnou kontrolu a řízení procesu. V případě kmenů kvasících mladinu nižší rychlostí lze kvasný proces zastavit těsně pod legislativně určenou hranicí obsahu ethanolu 0,5% obj. Překročení této hranice totiž vyžaduje ředění upravenou vodou (další finanční náklady), zatímco při nižším obsahu ethanolu produktu chybí těkavé látky, jejichž tvorba souvisí s alkoholovým kvašením. Mutantní kmeny 086-A, 086-B, 110-F byly společně s původním kmenem 2 vybrány pro proměření růstové křivky (Obr. 3) a zkoumání růstové rychlosti v syntetickém minerálním médiu při 8 °C. Původní kmen 2 a mutantní kmeny 086-A a 086-B vykazovaly specifickou růstovou rychlost $0,04 \text{ h}^{-1}$, zatímco mutantní kmen 110-F vykazoval nižší specifickou růstovou rychlost a to $0,03 \text{ h}^{-1}$. Sníženou rychlost kvašení u mutantů se změněnou zpětnovazebnou regulací syntézy leucinu získaných pomocí analogu této aminokyseliny (TFL) zaznamenali i autoři dřívějších prací (Ashida a kol., 1987; Lee a kol., 1995; Casalone a kol., 1997). Získané růstové křivky by také mohly poukazovat na nižší výtěžnost biomasy na jednotku substrátu.



Obr. 3 Růstová křivka původního kmene 2 a vybraných mutantních kmenů v syntetickém minerálním médiu při 8 °C.

Závěr

Cílem práce bylo získat spontánně vzniklý mutantní kmen pivovarské kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* vyznačující se nadprodukcí isoamylalkoholu a isoamylacetátu. s možností jeho dalšího využití pro výrobu nealkoholického piva. Izolace buněk resistantních k zpětnovazebné inhibici α -isopropylmalát syntasy v přítomnosti různých koncentrací 5,5,5-trifluor-DL-leucinu proběhla úspěšně. Náhodně vybrané kolonie byly následně testovány z hlediska produkce isoamylacetátu. Získané výsledky poukazovaly na skutečnost, že sedm z deseti vybraných kolonií mutantních kmenů produkovalo více isoamylacetátu než původní kmen. Byly také zjištěny mírné odlišnosti při zkoumání růstových vlastností vybraných mutantních kmenů a kmene původního.

Reference

Ashida S., Ichikawa E., Suginami K., Imayasu S. (1987) Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component, Agricultural and Biological Chemistry, 51, str. 2061–2065.

Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T. (2010) Pivovarství: Teorie a praxe výroby piva, Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha, 904 stran.

Brányik T., Silva D.P., Baszczyński M., Lehnert R., Almeida e Silva J.B. (2012) A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production, Journal of Food Engineering, 108, str. 493 – 506.

Casalone E., Fia G., Barberio C., Cavalieri D., Turbanti L., Polsinelli M. (1997) Genetic and biochemical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to trifluoroleucine, Research in Microbiology, 148, str. 613 – 623.

Lee S., Villa K., Patino H. (1995) Yeast strain development for enhanced production of desirable alcohols/esters in beer, Journal of American Society of Brewing Chemists, 53, str. 153 – 156.

Studium vlivu sladování na obsahy vybraných polyfenolových látek ječmene

Halama Š., Jelínek L., Karabín M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Polyfenoly v důsledku svých antioxidačních a dalších fyzikálně-chemických vlastností mohou značně ovlivnit organoleptické vlastnosti piva zejména s ohledem na jeho senzorickou a koloidní stabilitu.

Tato práce se zabývá aplikací modifikovaných a dříve používaných metod izolace a analýzy polyfenolů pro kvantitativní a kvalitativní stanovení volných, esterifikovaných a vázaných polyfenolů v ječmeni a sladu s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole (HPLC-DAD). Pomocí této metody byly nalezeny rozdíly v zastoupení volných, vázaných a esterifikovaných polyfenolů ječmene s ohledem na odrůdu, ročník sklizně a pěstební oblast. Dále byly srovnány změny v obsazích polyfenolů během sladování v závislosti na použité technologii.

Aplikace polyamidových sorbentů pro zvýšení koloidní stability piva

Ženíšek V., Jelínek L., Dostálek P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Polyfenoly jsou schopny interagovat s polypeptidy za vzniku koloidního zákalu, který je spotřebiteli vnímán jako negativní aspekt sensorického profilu piva. Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) a polyamid 6 jsou polymerní sorbenty běžně využívané v pivovarství k odstranění fenolových látek, které jsou považovány za hlavní prekurzory koloidního zákalu.

Cílem práce bylo objasnění schopnosti jednotlivých sorbentů vázat na svůj aktivní povrch tyto fenolové látky. Pivo je velice složitá matrice a tak je pomocí modelových roztoků analyzována povaha a síla interakce polyfenolů s přípravky bez interference ostatních látek. Byly vytvořeny soubory dat, na jejichž základě se dále zkoumala doporučená dávkování těchto přípravků v světlém nestabilizovaném ležáku.

Během procesu stabilizace přichází pivo do kontaktu s řadou dalších pevných částic (křemelina, silikagely), které mohou mít značný vliv na hodnotu sorpce. Proto byly provedeny testy zkoumající sorpční účinky těchto přípravků na polyfenoly.

Netradiční způsoby stabilizace piva

Kotlíková B., Jelínek L., Dostálek P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Pivo je celosvětově oblíbený nápoj a od doby, kdy je velká část výstavu určena na export, se zvyšují nároky i na jeho koloidní stabilitu a trvanlivost. Pojem koloidní stabilita piva se v pivovarské technologii rozumí rovnováha mezi zákalotvornými bílkovinami a polyfenoly. Tyto látky mají schopnost tvořit společně komplexy, které se z piva vylučují ve formě jemného zákalu (Bamforth, 1999). To je spotřebitelem vnímáno jako vada, protože běžný zákazník očekává pivo dokonale čiré, což je pro něj záruka čerstvosti.

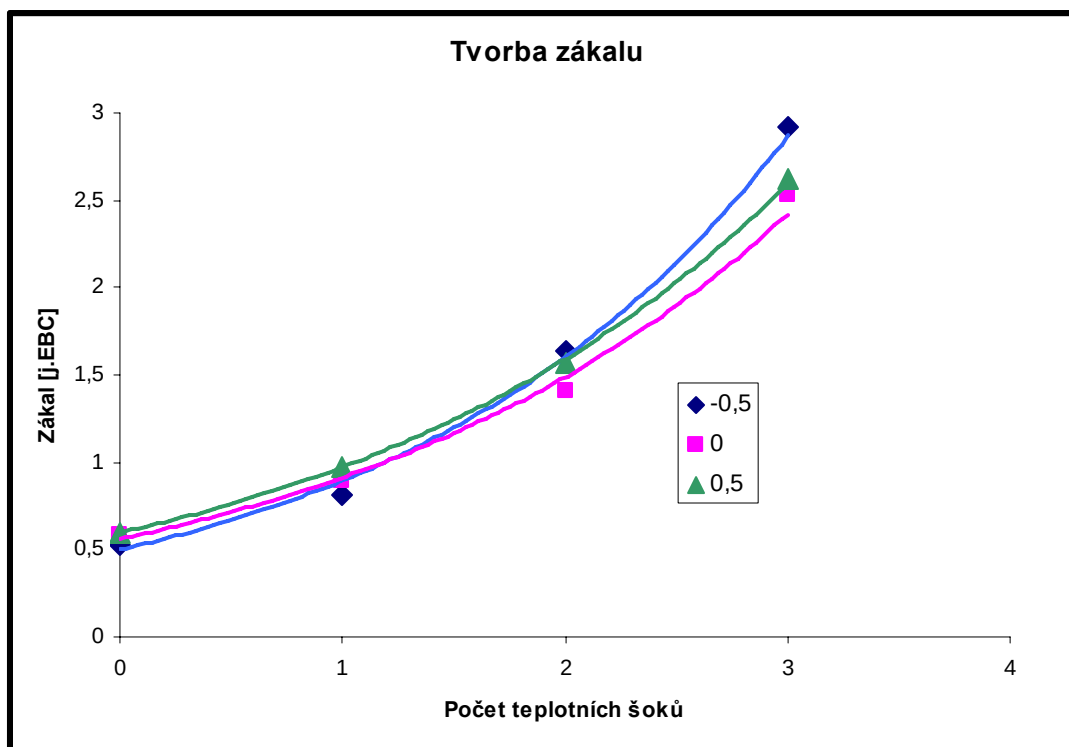
Tvorba zákalu je urychlována především přítomností kyslíku, ale také vlivem působení vyšších teplot, světla nebo přílišnými pohyby piva. Jsou rozlišovány dva hlavní typy zákalu, chladový a trvalý. Chladový se z piva vylučuje při ochlazení na 0 °C, ovšem při opětovném zahřátí na 20 °C se znovu rozpustí. Trvalý zákal vzniká oxidací složek chladového zákalu a je jevem stárnutí. Od chladového zákalu se liší především svou neschopností rozpustit se při 20 °C (Stewart, 2006).

Vznik zákalu je možné omezit používáním kvalitních vstupních surovin, ověřeného technologického postupu, vhodným skladováním, ale především odstraněním jednoho nebo obou hlavních zákalotvorných prekurzorů (bílkoviny, polyfenoly) (Siebert a kol., 1996). Tento krok se nazývá stabilizace piva a na trhu je dnes celá řada tzv. stabilizačních prostředků, které jsou běžně používány v různých fázích výroby piva. Nejčastěji probíhá během konečných úprav piva (při filtraci), ovšem některé prostředky (taniny, enzymy) se do piva dávkuje již na varně nebo v ležáckém sklepě a z piva se odstraní buď sedimentací, nebo při již zmíněné filtraci (Basařová a kol., 2012, Freeman, 2006). Enzymy už se v moderním pivovarství příliš nepoužívají, protože není možné odstranit je z piva ani filtrací. Jedinou možností, jak je inaktivovat, je pasterace (Briggs a kol., 2004). Proto se staly mnohem oblíbenějšími stabilizačními prostředky tzv. adsorpční prostředky dusíkatých a polyfenolových látek. Tyto přípravky jsou kompletně odstranitelné filtrací a používají se buď křemičité gely pro odstranění zákalotvorných bílkovin, nebo přípravky na bázi PVPP pro odstranění polyfenolů. Nevýhodou těchto stabilizátorů je jejich poměrně vysoká cena, protože s vyššími nároky na trvanlivost piva přirozeně roste jejich spotřeba (Siebert a Lynn, 1997).

Bílkoviny a polyfenoly však také poměrně významně ovlivňují senzorický profil piva, a proto se v dnešní době zvyšuje zájem o jiné, fyzikální metody (využití dochlazovače, ultrazvuku, tlakových rázů), kterými by se dala zvýšit koloidní

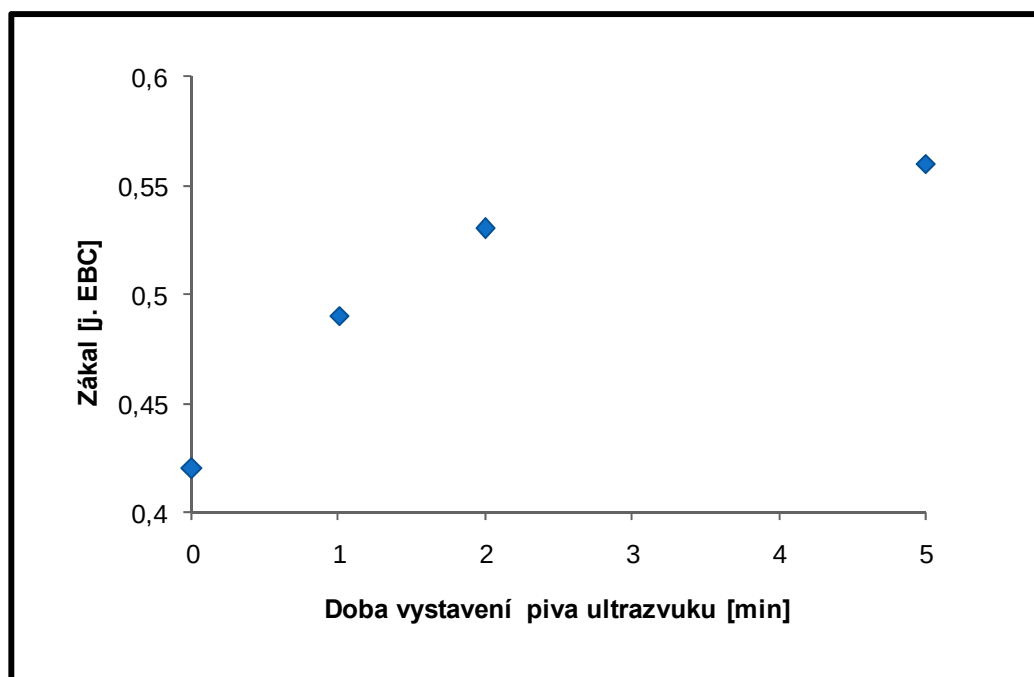
stabilita, aniž by tyto senzoričky významné látky byly z piva odstraněny. Dále by se tím vyřešil problém s otázkami, zda není na závadu vystavovat pivo kontaktu s cizími, chemickými látkami a další velkou výhodou by bylo i snížení nákladů spojených s nákupem stabilizačních prostředků a redukce odpadů vznikajících po stabilizaci, protože většina adsorpčních prostředků není regenerovatelná (Broderick, 2006).

Fyzikální metody fungují na principu zrychlené tvorby chladového zákalu a jeho následném odstranění pomocí filtrace, čímž se sníží náklady na stabilizační prostředky a zlepší se koloidní stabilita. Jednou z možností je použití dochlazovače. Toto zařízení (deskový chladič) slouží k ochlazení piva na požadovanou teplotu (nejčastěji teploty blízké 0 °C) a je umístěné před filtrem. Byly provedeny provozní testy, kdy vstupující pivo mělo max. 5 °C a bylo možné ho ochladit na max. -1 °C. Chladicí kapalinou byla solanka. Na obr. 1 jsou znázorněny 3 křivky, které zobrazují vývoj zákalu u piv vystaveným teplotám -0,5 °C, 0 °C a 0,5 °C (Kotlíková, 2011).



Obr. 1: Tvorba zákalu během šokových testů

Další možností je využití ultrazvuku. Jeho vlivem dochází k tvorbě kavit, následně k denaturaci bílkovin a k tvorbě vazeb mezi bílkovinami a polyfenoly, což se projeví vznikem zákalu. Laboratorní testy byly prováděny s kmitočtem 30 kHz a výsledky jsou znázorněny na obr. 2 (Jelínek L., soukromé sdělení).



Obr. 2: Závislost vzniku zákalu na zvyšující se délce působení ultrazvuku

Dále je možné použít ke zlepšení koloidní stability tlakové rázy. Ty také způsobují zrychlené vylučování zákalotvorných prekurzorů piva a tím urychlují tvorbu zákalu. Aplikovat je lze buď na mladé pivo během sudování, nebo na hotové pivo během filtrace. V obou případech dojde k vysrážení zákalotvorných částic, které se odstraní během filtrace. Laboratorně již bylo v minulosti toto rázování zkoumáno, přičemž byly zkoušeny tlaky o různé síle. Nejúčinnější byly tlaky v rozmezí 6 – 10 MPa a nejvyšší tvorby zákalu bylo dosaženo při 10 pulzech a době působení 15 – 80 s (Karel V, 1980).

Téma možností stabilizace piva fyzikálními metodami není doposud řádně probádané a skrývá mnoho možností, jak ošetřit pivo bez přídavku chemických látek a zároveň mu významně prodloužit trvanlivost. Ovšem zatím nebylo dosaženo uspokojivých výsledků ani s použitím dochlazovače či ultrazvuku, a to především proto, že této problematice nebyla věnována dostatečná pozornost. I když testy s dochlazovačem byly prováděny v provozním měřítku, nebylo dosaženo očekávaných výsledků, k čemuž přispělo i to, že rozdíly mezi zkoušenými nastavenými teplotami byly příliš nízké, a tudíž se výrazně neprojevovalo zvýšení koloidní stability. Co se týče tlakových rázů, lze pomocí získaných výsledků lépe určit vhodný způsob stabilizace piva, ovšem zatím nebylo prokázáno, že by samotné tlakové rázy dosahovaly takové účinnosti jako adsorpční stabilizační prostředky.

Pokud by bylo dalšími testy prokázáno významné zlepšení koloidní stability u piv, ošetřených fyzikálními metodami stabilizace piva, přistoupilo by se dále k posouzení možnosti úspor nákladů na stabilizační prostředky při využití fyzikálních metod spolu s ekonomickou bilancí „náklady spojené s fyzikálními metodami : úspory nákladů na stabilizační prostředky“.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.21/2012).

Literatura

Bamforth, Ch. W. (1999) Beer Haze, Journal of the American Society of Brewing Chemists, 57, str. 81-90.

Basařová G. (2010) Fyzikálně-chemická stabilita piva (Pivovarství – teorie a praxe výroby piva, Basařová G., Šavel J., Basař P., Lejsek T.) Vydavatelství VŠCHT Praha, str. 611 – 636.

Briggs D. E., Boulton Ch.A., Brookes P.A., Stevens R. (2004) Beer maturation and treatments (Brewing: Science and Practise, Briggs D. E.), Woodhead Publishing Limited and CRC Press, England.

Broderick S. (2006) Silica – based colloidal stabilisation, The Brewer and Distiller, 2, str.19 – 22.

Freeman G. (2006) Filtration and stabilisation of beer (Brewing: New Technologies, Bamforth C. W.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, str. 275 – 292.

Karel V.: *Výzkumná zpráva č. 18/1980-II*, VÚPS, Praha 1980.

Kotlíková B. (2011) Optimalizace postupů stabilizace piva, VŠCHT v Praze, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství.

Siebert K. J., Lynn P. Y. (1997) Mechanisms of absorbent action in beverage stabilization, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, str. 4275 – 4280.

Siebert K. J., Troukhanova N. V., Lynn P. Y. (1996) Nature of polyphenol – protein interactions, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, str. 80 – 85.

Stewart G. C. (2006) Beer stability (Handbook of Brewing, Priest F. G., Stewart G. C) Tailor&Francis Group, London, New York, str. 715 - 727.

Mikroskopické techniky sledování adheze buněk a tvorby biofilmu

Pospíšilová D., Masák J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Adheze buněk je složitý proces, který je ovlivněn celou řadou faktorů, vycházejících z vlastností jak biologického činitele, tak vnějšího prostředí. Adheze je prvním krokem při vytváření biofilmu- organizovaného společenstva mikroorganismů. Schopnost mikroorganismů tvořit biofilm a odlišné vlastnosti těchto buněk mohou mít a mají dopad na člověka v negativním i pozitivním slova smyslu. Negativním dopadem je např. zvýšená rezistence buněk biofilmu k antibiotikům. Na druhou stranu větší odolnosti buněk můžeme využít v environmentálních biotechnologiích při odbourávání polutantů např. při čištění odpadních vod. Z těchto důvodů je zkoumání procesu adheze a tvorby biofilmu potenciálně velmi přínosné.

Obsahem této přednášky je seznámení s mikroskopickými technikami zkoumání adheze a tvorby biofilmu se zaměřením na využití průtočných cel a analýzy obrazu. Spojení těchto technik umožňuje nedestruktivní sledování adheze a tvorby biofilmu v čase a přináší možnost účinně sledovat vliv různých vnějších podmínek.

Studium vlivu antibiotik na tvorbu a stabilitu biofilmu

Holfeldová J., Pospíšilová D., Masák J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

V této práci byl zkoumán vliv pěti antimikrobních látek, jmenovitě bacitracinu, cefalosporinu C, chlorhexidinu, polymyxinu B a erytromycinu, na tvorbu a stabilitu biofilmu bakterií *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115 a *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595. Pro použité antimikrobní látky byly experimentálně stanoveny subinhibiční koncentrace. Byl sledován vliv antimikrobních látek na počáteční adhezi, na chování buněk adherovaných v přítomnosti antimikrobních látek a vliv antimikrobních látek na adherované buňky. Biofilm byl sledován v průtočných celách za pomoci světelné mikroskopie a data byla vyhodnocována analýzou obrazu. Změny ve struktuře biofilmu byly stanovovány pomocí velikosti osídlené plochy a počtem a velikostí jednotlivých kolonií bakterií *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115 a *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595. Bylo zjištěno, že jednotlivé antimikrobní látky působí v různých fázích vývoje biofilmu odlišně, některé podporují kolonizaci povrchu nosiče, zatímco jiné tvorbu biofilmu potlačují. Experimenty dále prokázaly, že buňky v počátečních fázích tvorby biofilmu jsou více náchylné vůči působení antimikrobních látek než buňky ve zralém biofilmu.

Modulace podmínek vnějšího prostředí umožňující posílení produkce rhamnolipidů u vybraných bakteriálních kmenů

Ježdík R., Hošková M., Masák J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Působením člověka je životní prostředí kontaminováno množstvím polutantů, které mají velmi často hydrofobní charakter. Problémem při biodegradaci těchto látek je jejich nízká rozpustnost ve vodě, což způsobuje špatnou dostupnost pro mikroorganismy. Biodostupnost hydrofobních látek je možné zvýšit aplikací povrchově aktivních látek (surfaktantů), avšak tyto látky mohou mít negativní vliv na daný ekosystém. Použití biosurfaktantů na bázi rhamnolipidů je vhodnější alternativou, jelikož bisurfaktanty jsou méně toxické než chemické surfaktanty a omezuje se tak další zatěžování znečištěného prostředí. Rhamnolipidy mají amfifilní molekulu složenou z hydrofobní a hydrofilní části, které jsou spojené glykosidovou vazbou (Soberón-Chavéz a kol., 2005). Hydrofobní část obsahuje mastné kyseliny (β -hydroxydekanovou kyselinu) (Banat a Desai, 1997) a hydrofilní část je složena z jedné nebo dvou molekul rhamnosy (Soberón-Chavéz a kol., 2005).

Produkce rhamnolipidů je charakteristickou vlastností bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (Soberón-Chavéz a kol., 2005). Avšak biosyntéza rhamnolipidů není výhradní vlastností bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Rhamnolipidy jsou produkovány mnoha jinými bakteriemi zahrnující *Pseudomonas putida*, (Soberón-Chavéz a kol., 2005), *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Nocardioides* sp. a *Pseudoxanthomonas* sp. Tyto bakteriální druhy jsou možnými adepty pro produkci rhamnolipidů, hlavně *Enterobacter asburiae*, který ve srovnání s *Pseudomonas aeruginosa*, není patogenní (Nitschke a kol., 2011).

Produkce rhamnolipidů závisí na zdroji uhlíku kompozici ostatních složek média, především na zdrojích dusíku a multivalentních iontů. Nejčastěji se pro produkci rhamnolipidu využívá kultivace při limitaci růstu jedním nebo více komponenty kultivačního média (Al-Tahnan a kol., 2000; Contiero a kol., 2005).

Materiály a metody

Použité mikroorganismy

Při sledování produkce rhamnolipidu 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.

Sledování produkce rhamnolipidu

Pro stanovení rhamnolipidu v kultivační směsi bylo použito vyjádření koncentrace rhamnosy, která je přímo úměrná koncentraci rhamnolipidu, které lze přepočítat dle koeficientu, který se liší na základě složení rhamnolipidové směsi.

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.

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.

Stanovení kritické micelární koncentrace

Rhamnolipidy snižují povrchové napětí. V oblasti koncentrací pod KMK je pokles povrchového napětí nepřímo úměrný koncentraci rhamnolipidu v roztoku. Pokud rhamnolipid 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 rhamnosy. Pro toto stanovení byla použita metoda stanovení kontaktního úhlu roztoku rhamnolipidu s povrchem teflonové destičky. Pro odhad kritické micelární koncentrace byly použity údaje z literatury (Abdel-Mawgoud a kol., 2009, Kosová, 2011). Preparáty rhamnolipidu byly rozpuštěny v minimálním médiu M7. Ředěním bylo vytvořeno více různých koncentrací, část roztoků v koncentraci pod KMK a část roztoků nad KMK.

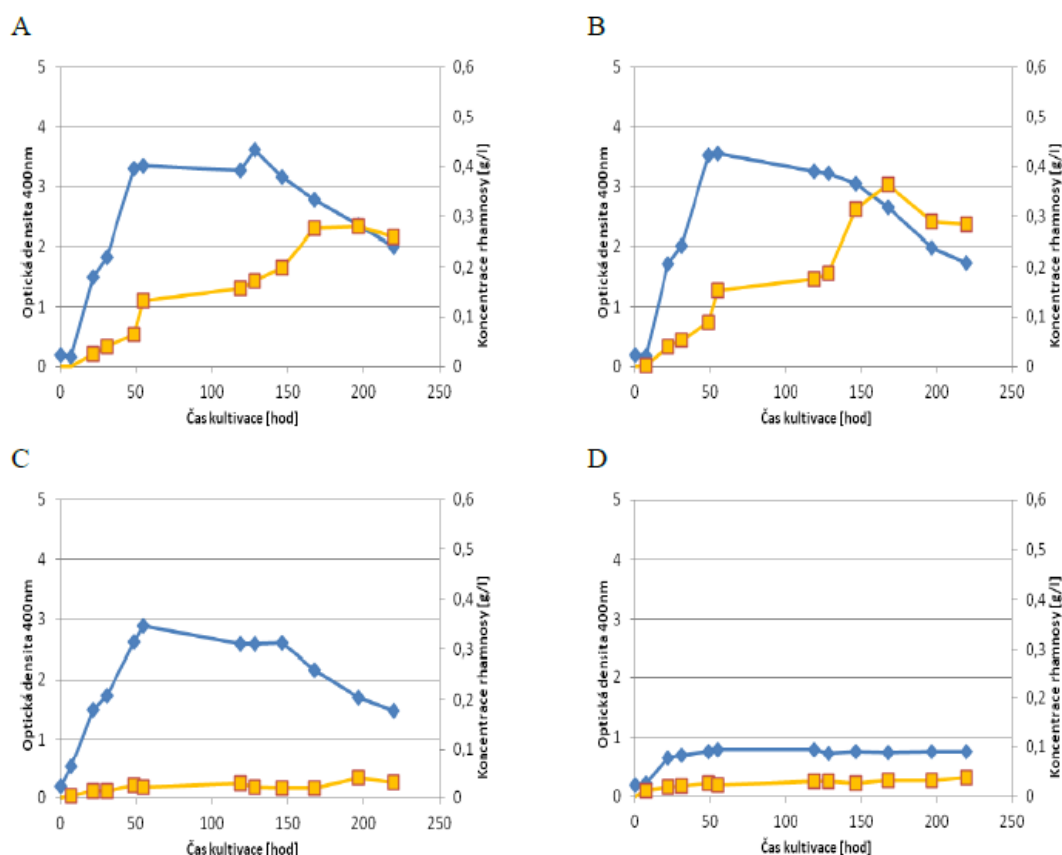
Jednotlivé roztoky rhamnolipidu byly kapány na termostátovanou teflonovou destičku (30 °C). Kapka roztoku na povrchu destičky byla vyfotografována a získaný obraz následně vyhodnocen v programu FTA 32. Z naměřených hodnot kontaktního úhlu (Obr. 9) jednotlivých roztoků byl sestaven graf, mající dvě části, oblast pod KMK a nad KMK, obě části byly proloženy s využitím lineární regrese a v průsečíku přímek byla odečtena KMK.

Výsledky a diskuze

Produkce rhamnolipidů jednotlivými bakteriálními kmeny

Vzhledem k předpokladu, že zdroj uhlíku je jedním ze základních faktorů ovlivňujících biosyntézu rhamnolipidů (Nitsche a kol., 2005) a v návaznosti na

předchozí práci (Kosová, 2011), bylo provedeno měření růstových křivek a tvorby rhamnolipidů jednotlivými bakteriálními kmeny do média na vybraných zdrojích uhlíku.



Obr. 1. Růst *Acinetobacter calcoaceticus* B-59190 a produkce rhamnolipidů v závislosti na použitém zdroji uhlíku. Růstové křivky (◆), koncentrace rhamnosy ve vodném médiu (■) médium M1; zdroj uhlíku citrát sodný 20 g/l (A), citrát sodný 20 g/l + hexadekan 4 mg/l (B), Slunečnicový olej 20 g/l (C), glycerol 5 g/l (D).

Z grafického vyjádření (Obr. 1) je zřejmé, že tato bakterie jako zdroj uhlíku a energie pro růst preferuje citrát sodný a slunečnicový olej. Jako nejlepší zdroj uhlíku z hlediska množství vyprodukovaného rhamnolipidu se jeví citrát sodný. Po přidavku kosubstrátu hexadekanu, který dle předpokladu může sloužit jako prekurzor pro syntézu rhamnolipidu, bylo zaznamenáno mírné zvýšení produkce rhamnolipidu, nicméně toto zvýšení oproti použití čistého citrátu sodného bylo nevýznamné. V případě použití slunečnicového oleje bylo v kultivačním médiu detekováno pouze malé množství rhamnosy, což může být zapříčiněno nízkou produkcí rhamnolipidu, nebo navázáním rhamnolipidu na fázové rozhraní olej-voda.

Produkce rhamnolipidu je zaznamenána na konci exponenciální fáze, kdy buňky vytvoří přibližně polovinu maximálního produkovaného množství. V průběhu stacionární fáze je nárůst koncentrace rhamnolipidu mírnější. Na konci

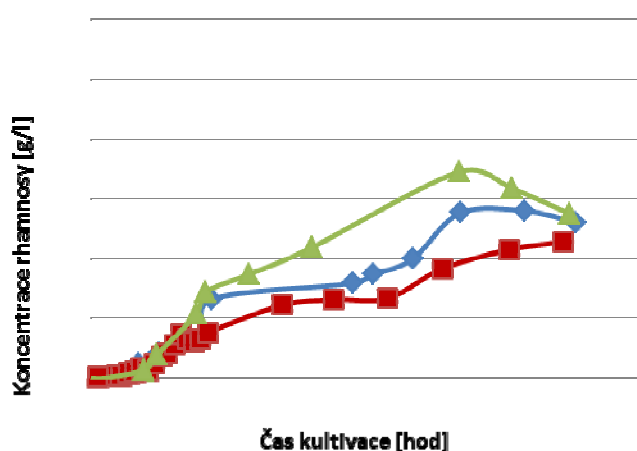
stacionární fáze rapidně stoupá koncentrace rhamnolipidu až na maximální produkované množství. Tento nárůst byl zaznamenán přibližně 130 hodin od počátku kultivace. Přibližně při 180 hodinách kultivace dosahuje koncentrace rhamnolipidu maxima.

S ohledem na množství vyprodukované rhamnolipidu a na izolaci preparátu rhamnolipidu byl pro produkci rhamnolipidu vybrán citrát sodný jako zdroj uhlíku, jelikož hexadekan neindukoval výraznou změnu v produkci rhamnosy a mohl by tvořit komplikace při izolaci a purifikaci rhamnolipidu.

Obdobné výsledky byly naměřeny i pro zbývajících dva bakteriální kmeny, všechny tři produkční kmeny se při kultivaci za totožných podmínek chovají velice podobně. Produkce rhamnolipidu do vodného prostředí je nejvýraznější při kultivaci na citrátu sodném popřípadě citrátu sodném s přísadkou hexadekanu, jako jediném zdroji uhlíku.

Srovnání produkce rhamnolipidu jednotlivými bakteriálními kmeny

Po porovnání produkce rhamnolipidu uváděnými mikroorganismy byl zvolen citrát sodný jako nejvhodnější zdroj uhlíku pro produkci rhamnolipidu. Přídavek hexadekanu neindukoval významné změny v produkci u žádného z testovaných mikroorganismů a mohl by tvořit komplikace při izolaci a zejména při purifikaci rhamnolipidu.



Obr. 2. Srovnání produkce rhamnolipidu jednotlivých bakteriálních kmenů.

Srovnání produkce rhamnolipidu (vyjádřeno jako rhamnosa) do extracelulárního prostředí bakteriemi *Acinetobacter calcoaceticus* B-59190 (◆), *Enterobacter asburiae* B-59189 (■) a *Pseudomonas aeruginosa* B-59188 (▲); médium M1, zdroj uhlíku citrát sodný 20 g/l.

Obr. 2 shrnuje produkci rhamnolipidu bakteriemi v prostředí M1 se zdrojem uhlíku citrátem sodným. Z grafického vyjádření je zřejmé, že při stejných kultivačních podmínkách bakterie *Pseudomonas aeruginosa* B-59188 produkuje větší množství rhamnolipidu (cca 0,35 g/l) do vodného média, než bakterie *Acinetobacter calcoaceticus* B-59190 (0,3 g/l) a *Enterobacter asburiae*

B-59189 (0,25 g/l). Časová závislost produkce rhamnolipidu jednotlivých mikroorganismů je velice podobná, pouze *Enterobacter asburiae* B-59189 dosahuje maximální produkce rhamnolipidu později.

Stanovení kritické micelární koncentrace

Složení rhamnolipidových směsí se liší dle produkčního 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).

Tab. I. Kritické micelární koncentrace rhamnolipidových směsí stanovené pomocí měření konstantního úhlu.

Produkční mikroorganismus	KMK [mg/l]
<i>Acinetobacter calcooaceticus</i> B-59190	7
<i>Enterobacter asburiae</i> B-59189	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-59188	26

Z výsledků stanovení KMK (Tab. I) můžeme konstatovat, že směs rhamnolipidů produkovaná bakterií *Acinetobacter calcooaceticus* B-59190 obsahuje procentuálně nejvyšší podíl rhamnolipidových kongenerů s více dekanovými kyselinami, který vykazují nižší KMK než rhamnolipidy s jednou dekanovou kyselinou.

Závěr

Pro produkci rhamnolipidu byl zvolen čistý citrát sodný jako zdroj uhlíku, jelikož přídavek hexadekanu nejevil významné změny v produkci a zároveň by mohl tvořit potíže při následné izolaci rhamnolipidu. Největší produkce dosahovala bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Směs rhamnolipidů produkovaná bakterií *Acinetobacter calcooaceticus* dosahuje nejnižší KMK, z čehož můžeme předpokládat, že tato směs obsahuje procentuálně více kongenerů rhamnolipidu s více dekanovými kyselinami.

Použitá literatura

Abdel-Mawgoud, A. M.; Aboulwafaa, M. M.; Hassouna, N. A-H. Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2009**, 157, 329-345

Al-Tahnan, R. B.; Sandrin, T. R.; Bodour, A. A.; Maier, R. M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properte and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Enviromental Microbiology* **2000**, 66 (8), 3262-326.

Banat, I. M.; Desai, J. D. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potencial. *Microbiology and Molecular Biology Rewiews* **1997**, 61, 47- 64.

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

Contiero, J.; Costa, S. G. V. O.; Nitschke, M. Rhamnolipid Surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progres* **2005**, 21, 1593-1600.

Kosová, B. Produkce biosurfaktantu na bázi rhamnolipidu. Diplomová práce, VŠCHT v Praze, 2011

Nitschke, M.; Costa, S. G. V. O.; Contiero, J. Rhamnolipids ans PHAs: Recent reposrts on *Pseudomonas*-derived molecules if increasing industrial interest. *Process Biochemistry* **2011**, 46, 621-630.

Soberón-Chavéz, G.; Lépine, F.; Déziel, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2005**, 68, 718-725.

Interakce nanočástic železa s prokaryotní a eukaryotní buňkou

Pádrová K., Schreiberová O., Čejková A.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Nanočástice železa nulové valence disponují značným redukčním potenciálem, kterého lze úspěšně využít v oblasti remediací kontaminovaných vod a půd. Poměrně velká reaktivita nanočástic železa je však příčinou vzniku oxidativního stresu, který je důsledkem vysoké toxicity tohoto materiálu. Jejich přítomnost v prostředí by mohla negativně narušovat autochtonní mikroflóru. První část předložené práce se zabývá ovlivněním růstu modelových mikroorganismů, zastupujících prokaryotní a eukaryotní buňku, které jsou vystaveny působení nanočástic nulamocného železa preparátu NANOFER 25. Vliv nanočástic železa byl zkoumán u gramnegativní bakterie *Pseudomonas fluorescens*, grampozitivní bakterie *Rhodococcus erythropolis* a kvasinky *Trichosporon cutaneum*. Vzhledem k značné cytotoxicitě nanočástic a možnostem jejich uplatnění, je druhá část práce zaměřena na hledání látek, které by exponované mikroorganismy před letálními účinky nanočástic ochránily. Potenciální protektivní charakter byl sledován u vybraných huminových látek, které jsou známy svou schopností interakce s mikroorganismy a schopností ochrany buněk před stresovým prostředím. Inhibiční účinek nanočástic železa byl porovnán s účinky modelových látek, které jsou známými poskytovateli reaktivních forem kyslíku (peroxid vodíku a menadion). Podíl životaschopných buněk po expozici nanočástic elementárního železa v přítomnosti huminových látek byl porovnán s množstvím buněk se zachovanou reprodukční aktivitou populace vystavené pouze účinkům nanočástic.

Úvod

Nanotechnologie jsou založeny na používání částic o poloměru v rozmezí 1 nm až 100 nm. Nanočástice často disponují odlišnými chemickými a fyzikálními vlastnostmi, než částice stejných materiálů, ale větších rozměrů. V posledních letech se výzkum v oblasti remediací soustředí především na nanočástice železa nulové valence (elementární nanočástice) (nZVI) (Li H. a kol., 2009). Významnou vlastností nZVI je jejich vysoká reaktivita, která je zároveň příčinou značné cytotoxicity nanočástic a omezuje jejich použití k zefektivnění bioremediačních procesů. Pravděpodobně hlavní příčinou toxicity nanočástic elementárního železa je schopnost vyvolat vznik oxidativního stresu (Keenan Ch.R. a kol., 2009). Oxidace nZVI vede ke sledu reakcí, jejichž produkty jsou reaktivní formy kyslíku (superoxidy, peroxidy a volné radikály). Reaktivní formy kyslíku mají schopnost dále oxidovat, a tak poškozovat, biologické

makromolekuly, což může mít až letální účinky na exponované organismy (Keenan Ch.R. a kol, 2009, Touati D., 2000). Mechanismy jakými nZVI negativně působí na živé mikroorganismy zatím nejsou přesně známy, ale zdá se, že z hlediska toxicity je rovněž významná jejich interakce s buňkou. Tuto skutečnost do jisté míry potvrzuje aplikace huminových látek, které jsou v poslední době zkoumány jako možná protekční činidla chránící mikroorganismy vůči účinkům nanočástic. Huminové látky jsou součástí přirozené organické hmoty a mají schopnost se adsorbovat na povrch buněk i nanočástic, čímž brání jejich vzájemnému fyzickému kontaktu. Nanočástice se pak nemohou adsorbovat na buněčný povrch a pronikat do cytosolu, kde jsou oxidovány intracelulárním kyslíkem (Chen J. a kol., 2011).

Metody

Sledování účinku nanočástic nulamocného železa

Vliv nZVI byl sledován na vybraných mikroorganismech, gramnegativní bakterie *Pseudomonas fluorescens* (CCM 2115), grampozitivní bakterie *Rhodococcus erythropolis* (CCM 2595) a kvasinky *Trichosporon cutaneum* (CCY 30.5.10). V práci byly použity nanočástice komerčně dostupného výrobku NANOFE 25. Jedná se o dlouhodobě stabilní vodnou suspenzi nZVI, která je stabilizována pouze anorganickým modifikátorem. Střední velikost nanočástic je 50 nm. Částice jsou dodávány firmou Nano Iron, s.r.o. ČR. Byl sledován vliv dvou různých koncentrací nZVI 1 g/l a 5 g/l. Tyto koncentrace byly určeny na základě úvodního experimentu, kdy na základě dostupné literatury byly vybrány čtyři různé koncentrace elementárních nanočástic (1 g/l, 2 g/l, 5 g/l a 10 g/l), jejichž účinek byl zkoumán. Vzhledem k silnému cytotoxickému účinku nZVI byly následně vybrány koncentrace 1 g/l a 5 g/l. Účinek nZVI byl porovnán s účinkem dvou známých prooxidantů peroxidu vodíku (500 μ M) a menadionu (100 μ M) (Winterbourn Ch. C. a kol., 1979). Vlivu studovaných stresových látek byly mikroorganismy vystaveny v pozdní fázi exponenciálního růstu, protože bylo naší laboratoří dříve zjištěno, že mikroorganismy nacházející se v tomto fyziologickém stavu jsou vůči účinkům nZVI nejcitlivější. Na úvod experimentu bylo proto nutné nejprve proměřit růstové křivky studovaných mikroorganismů. Po nárůstu buněčné populace na požadovanou optickou densitu byly buňky separovány centrifugací (9000 g, 10 min, 10°C) a promyty v 10 ml 0.15 M fosfátového pufru. Odstředěné buňky byly resuspendovány v 5 ml 0.15 M fosfátového pufru. Získanou buněčnou suspenzí byly inokulovány připravené roztoky (10 ml 0.15 M fosfátového pufru) studovaných látek na optickou densitu $0,200 \pm 0,005$. Během průběhu pokusu byly odebírány vzorky v intervalech 5, 10, 15, a 30 minut. Účinky látek byly vyhodnoceny oproti kontrolní buněčné populaci a stanoveny na základě hodnot získaných pomocí metody KTJ (kolonie tvořící jednotky) na vrstvě živného agaru.

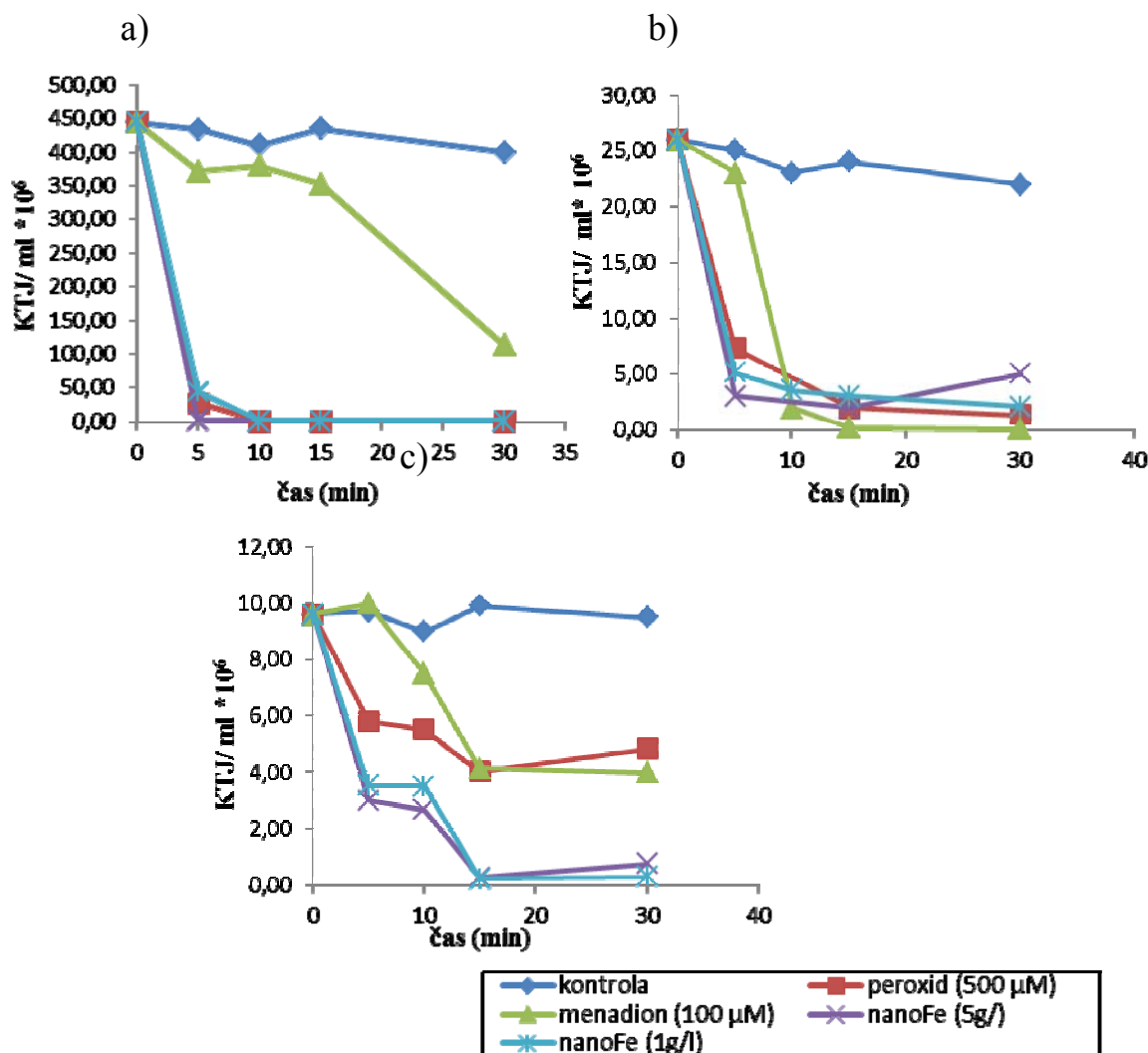
Vliv huminových látek na snížení toxicity nanočástic nulamocného železa

Huminové látky (HL), jejichž potenciální protekční účinky byly v práci zkoumány, byly připraveny ze surovin pocházejících z lomů v České republice. Distributorem je Výzkumný ústav anorganické chemie (VÚAnCh), a.s. Ústí nad Labem. Zkoumanými látkami byl humát sodný PAB 32 a huminové kyseliny V00A1, SM01A1, SJ02b/OA, SD11A2 (Madronová L. a kol., 2010), u kterých nebyl prokázán negativní účinek na buněčný růst. Naším úkolem bylo najít huminové látky, které by mohly účinně ochránit buňky před toxicitou nZVI. Použitá koncentrace u všech vybraných typů huminových látek byla 0,3 g/l. Tato koncentrace byla vybrána na základě předchozích pokusů naší laboratoře, kdy byl zkoumán vliv různých koncentrací na růst suspenzní populace vybraných bakterií. Metodika sledování vlivu huminových látek na snížení toxicity nZVI, byla stejná jako v případě sledování jejich toxických účinků. Protektivní charakter huminových látek byl porovnán s účinkem studovaných koncentrací nZVI na vybrané mikroorganismy bez přítomnosti huminové látky.

Výsledky a diskuze

Expozice účinkům nanočástic nulamocného železa

Studované mikroorganismy reagovaly na přítomnost stejných koncentrací nanočástic odlišně. Na obrázcích 1 a,b,c jsou dokumentovány průběhy závislosti úbytku KTJ na čase v důsledku expozice studovaných mikroorganismů stresovým látkám.



Obr. 1a,b,c. Expozice bakterie *Pseudomonas fluorescens* (a), *Rhodococcus erythropolis* (b) a kvasinkové populace *Trichosporon cutaneum* (c) účinkům prooxidantů (peroxid vodíku 500 μM, menadion 100 μM) a vybraných koncentrací nanočástic elementárního železa (nanoFe 1 g/l a 5 g/l).

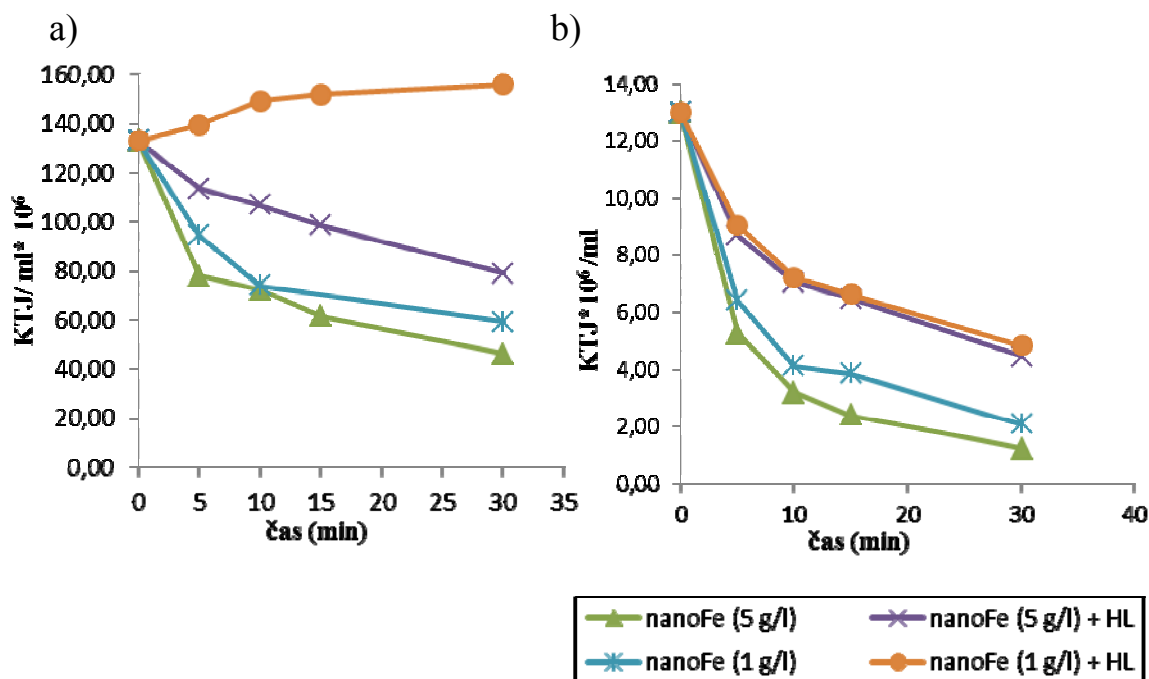
Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že nejcitlivějším mikroorganismem vůči účinkům sledovaných koncentrací nZVI je bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Obrázek 1a ilustruje, že již po 5 minutách inkubace bakterie v přítomnosti 1 g/l nZVI došlo k úbytku KTJ o 90 %. Vliv peroxidu vodíku měl na studovanou buněčnou populaci podobný účinek, počet KTJ klesl o 94 %. Naproti tomu negativní působení menadionu na životaschopnost bakteriální populace bylo pozvolné a k výraznému poklesu reprodukční aktivity docházelo až po 15 minutách. V případě grampozitivní bakterie *Rhodococcus erythropolis* (viz obr. 1b) bylo zjištěno, že je vůči účinkům obou sledovaných koncentrací nZVI odolnější než *P. fluorescens*. Obě studované koncentrace nZVI, které byly zkoumány v předložené práci, neměly na buněčnou populaci

bakterie *R. erythropolis* v daném časovém intervalu letální účinky. K podobným závěrům dospěla i práce kolektivu Barnes R.J. a kol, 2010. V jejich práci bylo zjištěno, že díky rigidnější buněčné stěně jsou grampozitivní bakterie odolnější vůči účinkům nZVI. Během prvních 5 minut expozice buněk koncentrací 1 g/l poklesl počet KTJ o 80 % a během následného pozorování již další významný pokles reprodukční aktivity nenastal. V případě vyšší koncentrace byl průběh podobný, s rozdílem, že počet KTJ po 5 minutách inkubace klesl o 88 %. Účinek menadionu měl na buněčnou populaci rodokoka letální účinek na rozdíl od peroxidu vodíku, který se choval podobně jako nZVI. U populace kvasinky *Trichosporon cutaneum* (viz obr. 1c) se letální účinky nZVI se projevily až po 15 minutách působení. Jeho odolnost vůči účinkům nZVI je v porovnání s rodokokem nižší. V případě kvasinky byl nejvýznamnější rozdíl zaznamenán v reakci na přítomnost peroxidu vodíku. Kvasinka je vůči jeho účinkům výrazně odolnější, než zkoumané bakterie.

Ze skutečnosti, že se toxicita nZVI u studovaných mikroorganismů vždy neprojevila stejným procentuálním poklesem hodnoty KTJ je možné usoudit, že rychlost nástupu letálních účinků nanočástic u exponovaných mikroorganismů bude záviset na více faktorech a aktuálním fyziologickém stavu mikroorganismů. Trendy závislosti úbytku hodnoty KTJ na čase však jednoznačně dokumentují silné cytotoxické účinky nZVI u všech studovaných mikroorganismů.

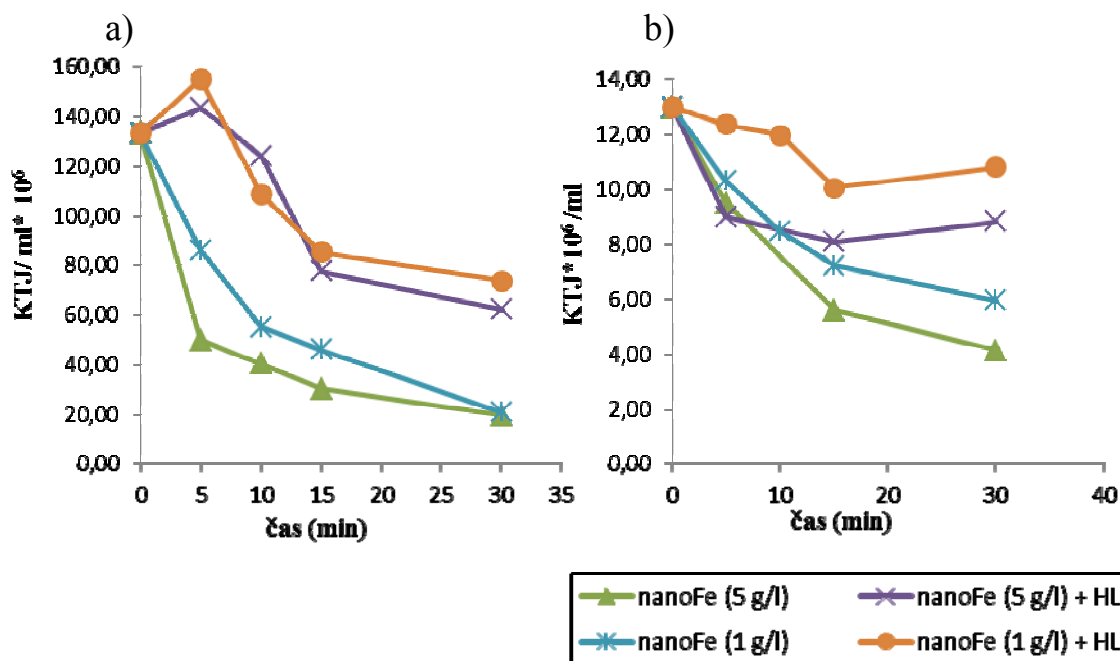
Vliv huminových látek na snížení toxicity nanočástic železa nulové valence

Obrázek 2 a,b ilustruje, jak se projevila přítomnost huminové látky SM0A1 na snížení toxicity u bakterie *R. erythropolis* a kvasinky *T. cutaneum*.



Obr. 2 a,b. Vliv huminové kyseliny SM01A (HL) o koncentraci 0,3 g/l na protekci bakteriální populace *Rhodococcus erythropolis* (a) a kvasinkové populace *Trichosporon cutaneum* (b) před toxickými účinky nanočástic elementárního železa (nanoFe 1 g/l a 5 g/l).

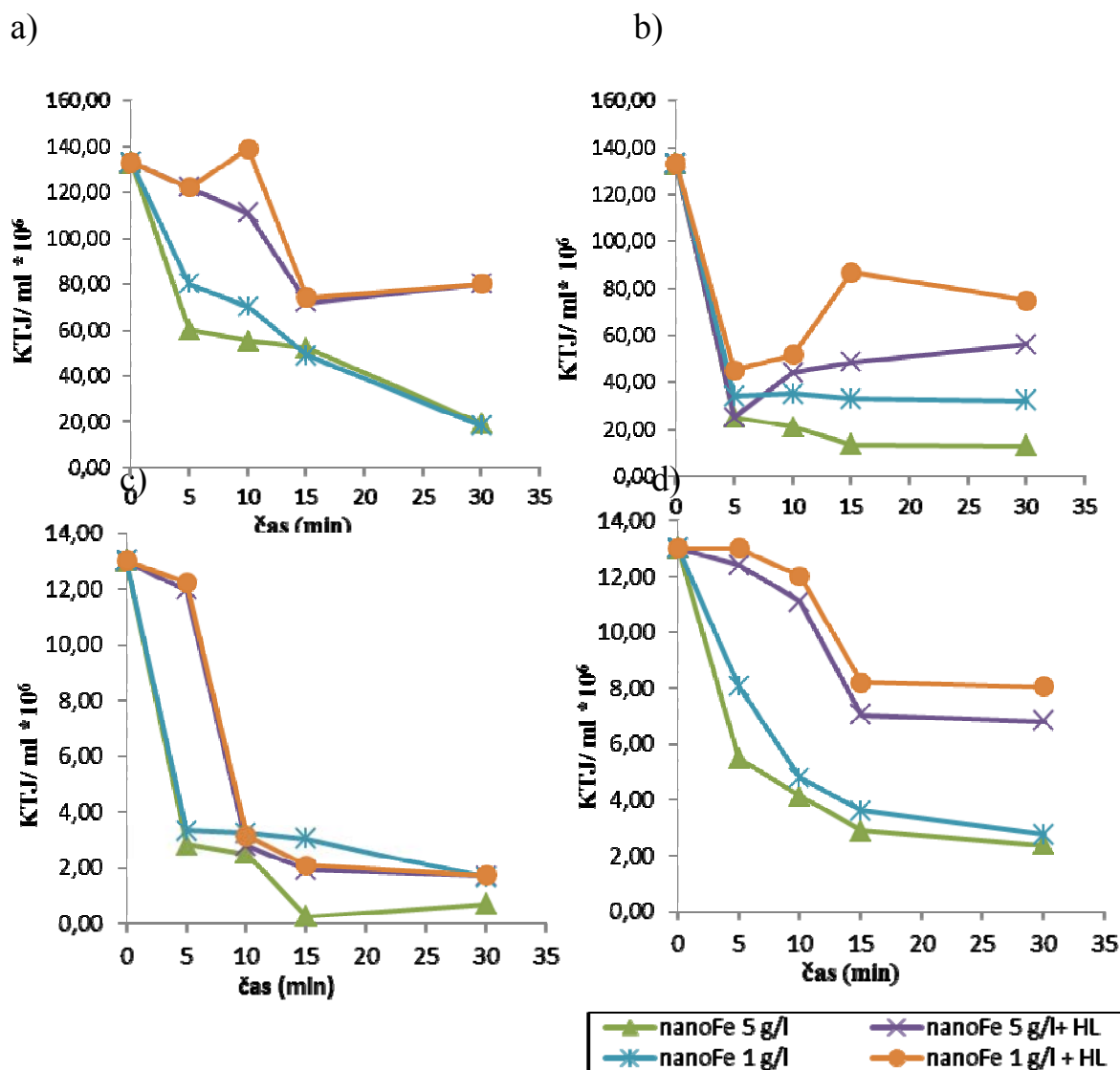
U bakterie *Rhodococcus erythropolis* (viz obr. 2a) byly prokázány pozitivní protektivní účinky především u huminové kyseliny SM01A. Interference 0,3 g/l huminové kyseliny SM0A1 s 1 g/l nZVI vedla k úplnému omezení toxicity nanočástic a v průběhu pokusu nedošlo k žádnému poklesu reprodukční aktivity u exponovaných buněk. Huminová kyselina SM0A1 má u populace kvasinky *T. cutaneum* (viz obr. 2b) na omezení toxicity stejné koncentrace nZVI opačný vliv. V tomto případě huminová kyselina jen částečně omezila cytotoxické působení nanočástic. Na obrázku 3 a, b je dokumentována opačná situace, která nastala po aplikaci huminové kyseliny SJO2b/oA na populaci vybraných mikroorganismů.



Obr. 3 a, b. Vliv huminové kyseliny SJ02b/oA (HL) o koncentraci 0,3 g/l na protekci bakteriální populace *Rhodococcus erythropolis* (a) a kvasinkové populace *Trichosporon cutaneum* (b) před toxickými účinky nanočástic elementárního železa (nanoFe 1 g/l a 5 g/l).

Z obrázku 3a je patrné, že v případě *R. erythropolis* se přítomnost huminové kyseliny SJ02b/oA neprojevila vliv na omezení toxicity nZVI na rozdíl od kvasinkové populace (viz obr. 3b), kde došlo k výraznému snížení letálních účinků 1 g/l nZVI. V případě bakteriální i kvasinkové populace byla prokázána schopnost omezit toxicitu koncentrace nZVI 1 g/l také u huminové kyseliny V00A1. Naopak kyselina SD11A2 neprojevila výrazný vliv na ochranu obou exponovaných mikroorganismů. Protektivní charakter huminových látek se nejméně projevil v případě buněčné populace *P. fluorescens*, kdy nedošlo k žádnému významnému omezení cytotoxických účinků nZVI. Tato skutečnost rovněž potvrzuje rozdílnou afinitu huminových látek k různým mikroorganismům. Efektivita protekce mikroorganismů huminovými kyselinami závisí nejen na typu huminové látky, ale také použité koncentraci (Chen J. a kol., 2011).

U buněčné populace bakterie *R. erythropolis* a kvasinky *T. cutaneum* byl rovněž vyzkoušen vliv dvou různých koncentrací humátu sodného PAB 32 (0,01 g/l a 0,3 g/l). Jednotlivé průběhy jsou ilustrovány na obrázku 4 a, b, c, d.



Obr. 4 a, b, c, d. Vliv dvou různých koncentrací humátu sodného PAB 32 (HL) na protekci bakteriální populace *Rhodococcus erythropolis*, a) 0,01 g/l, b) 0,3 g/l PAB 32, a kvasinkové populace *Trichosporon cutaneum*, c) 0,01 g/l, d) 0,3 g/l PAB 32, před toxickými účinky nanočástic elementárního železa (nanoFe 1 g/l a 5 g/l).

Z výše uvedeného obr. 4 je patrné, že v případě bakteriální populace (viz obr. 4a, b) měla nižší studovaná koncentrace humátu sodného výraznější protekční účinek, než koncentrace vyšší. Tato skutečnost naznačuje možný cytotoxický účinek vyšší aplikované koncentrace humátu sodného PAB 32 vůči bakterii *R. erythropolis*. U kvasinky *T. cutaneum* (viz obr. 4c, d) byl zaznamenán opačný průběh. V tomto případě nižší studovaná koncentrace humátu sodného (0,01 g/l) neprokázala, na rozdíl od vyšší koncentrace (0,3 g/l), žádný vliv na omezení toxicity nZVI.

Předložená práce dokumentuje první výsledky naznačující pozitivní vliv některých studovaných huminových látek na snížení nebo úplné omezení cytotoxicity nZVI. Ve výzkumu v této oblasti však bude nezbytné nadále pokračovat s cílem objasnit mechanismy, kterými huminové látky na snížení toxicity nZVI působí.

Seznam použité literatury

Barnes, R.J.; Gast, Ch.J.; Riba, O.; Lehtovirta, L.E.; Prosser, J.I.; Dobson, P.J.; Thompson, P. The impact of zero-valent iron nanoparticles on a river water bacterial community. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, 184, 73-80.

Chen, J.; Xiu, Z.; Lowry, G.V.; Alvarez, P.J.J. Effect of natural organic matter on toxicity and reactivity of nano-scale zero-valent iron. *Water Research* **2011**, 45, 1995-2001.

Keenan, Ch.B.; Goth-Goldstein, R.; Lucas, D.; Sedlak, D.L. Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe(II) in human bronchial epithelial cells. *Environmental Science and Technology* **2009**, 43, 4555-4560.

Li, H.; Zhou, Q.; Wu, Y.; Fu, J.; Wang, T.; Jiang, G. Effect of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2009**, 72, 684-692.

Madronová, L.; Novák J.; Novák F.; Kozler J. Humic acids from raw materials (coal, lignite and peat deposits in ...) of the Czech Republic **2010**.

Touati, D. Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, 373 (1), 1-6.

Winterbourn, Ch.C.; French, F.K.; Claridge, R.F.C. The reaction of menadione with haemoglobin. *Biochemical Journal* **1979**, 179, 665-673.

Stanovení metabolických intermediátů mikrobiální degradace dinitrofenolů

Karlová P., Halecký M., Páca J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Mikroorganismy jsou schopné odbourávat nitrofenoly oxidační nebo redukční cestou za vzniku řady metabolitů. Při nevhodné volbě podmínek biodegradace se mohou některé metabolity hromadit v médiu; jako obtížně odbouratelné se jeví zejména aminoderiváty vzniklé redukcí nitrofenolů, které navíc mohou vykazovat vyšší toxicitu než výchozí látky. Pro úspěšné řízení bioprocessu vedoucí k úplné detoxikaci nitrofenolů je tedy schopnost detekovat případné intermediáty klíčová.

Cílem prováděného měření bylo vyvinout metodiku identifikace intermediátů degradace dinitrofenolů z kapalných vzorků pomocí GC/MS a jejich kvantifikace na HPLC/DAD. Komplexní povaha kapalných vzorků z bioreaktorů vyžadovala jejich úpravu před vlastní analýzou. Za tímto účelem byla testována účinnost extrakce standardů předpokládaných intermediátů dvěma organickými rozpouštědly (diethylether, dichlormethan) a jejich derivatizace třemi různými činidly. Jako nejúčinnější metoda úpravy vzorků pro GC/MS se ukázala extrakce do diethyletheru a silylace fenolů pomocí BSTFA + TMCS (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid + trimethylchlorosilan).

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21/2012)

Separace mikroskopických řas pomocí magnetických částic

Podolová N., Procházková G., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Mikroskopické řasy jsou v dnes využívány k variabilním účelům - od výroby doplňků stravy, krmiv pro hospodářská zvířata či akvakultury, přes kosmetické produkty až k biopalivům. Separace mikroskopických řas z jejich kultivačního prostředí má využití ve sklizni těchto mikroorganismů, a protože konvenční metody separace biomasy (např. centrifugace, mikrofiltrace) představují ekonomicky náročné procesy, je třeba vyvinout levnější alternativy. Možné řešení představují magnetické separace, v současnosti používané v mnohých biotechnologických odvětvích. Předmětem předložené práce bylo studium adheze mikroskopické sladkovodní řasy *Chlorella vulgaris* P12 na tři typy superparamagnetických mikročástic SiMAG-ionex (Chemicell), nesoucích diethylaminoethylové (SiMAG-DEAE), polyethyleniminové (SiMAG-PEI) anebo (2-hydroxypropyl)trimethylamonium chloridové (SiMAG-Q) funkční skupiny, s cílem stanovit, zda je možné využít magnetických agens k úspěšné separaci řasové biomasy. Nejprve byly charakterizovány povrchové vlastnosti buněk *C. vulgaris* a magnetických částic měřením zeta potenciálů (v roztocích 10 mmol.dm⁻³ KCl, pH 2-12), na jejichž základě byly určeny podmínky, za kterých vykazují buňky a magnetické částice opačný elektrokinetický potenciál (10 mmol.dm⁻³ KCl, pH 4). Po experimentálním stanovení doby separace (30 min) při laboratorní teplotě byla sledována závislost účinnosti separace biomasy na poměru hmotnostních koncentrací přidaných magnetických částic k biomase. Účinné separace řasové biomasy, tj. nad 90 %, bylo dosaženo při poměru hmotnostních koncentrací 0,1 v případě částic SiMAG-PEI a SiMAG-Q. Částice SiMAG-DEAE vykazovaly nižší schopnost separace buněk, jelikož bylo třeba přidat téměř dvojnásobnou hmotnost částic. Magnetizace živé řasové biomasy za modelových podmínek byla úspěšná. V navazující práci budou v rámci optimalizaci metody testovány i odlišné experimentální podmínky.

Vliv resveratrolu a jeho analogů na adhezivní schopnosti bakteriálních buněk

Křenková J., Kolouchová I.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Stilbeny jsou přírodní fenolické sloučeniny rostlin, které působí jako ochranné látky pro buňky vystavené stresovým podmínkám (UV záření, teplota, napadení mikroorganismy). Stilbeny řadíme mezi fytoalexiny - sekundární metabolity, mezi jejichž zástupce patří např.: resveratrol, pinosylvín a další. Ve stresových podmínkách, v přítomnosti některých stilbenů, nedochází k nárůstu bakteriálních buněk. Toto zjištění se však týká jen některých stilbenů, především resveratrolu a pinosylvínu. Biofilm studujeme díky schopnosti buněk adorovat na povrch. Biofilm je vrstva organismů na povrchu (jakýkoliv materiál, na kterém je daný organismus schopen adheze, např.: nemocniční materiál, sliznice, povrchy ve vodním prostředí). Biofilm je schopen odolávat různým fyzikálním a chemickým vlivům. V této práci studujeme vliv stilbenů na tvorbu a stabilitu biofilmu u bakterií rodu: *Rhodococcus erythropolis*, bakterie gram- atypicky pozitivní; *Pseudomonas aeruginosa*, bakterie gram - negativní a *Micrococcus luteus*, bakterie gram - negativní.

Biologická degradace acetonu a styrenu v probublávaném submersním reaktoru

Vaněk T., Halecký M., Páca J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývá biologickou degradací par acetonu a styrenu v probublávaném submersním reaktoru. Během tohoto experimentu byla sledována schopnost probublávaného submersního reaktoru účinně degradovat směs par acetonu a styrenu. Současně byla sledována tvorba a hromadění biodegradačních intermetabolitů v médiu.

Reaktor se skládal ze skleněné kolony (ID = 75 mm a H = 620 mm), pracovní objem reaktoru byl 1,5 L a výška kapaliny v reaktoru 320 mm. Reaktor byl provozován v „upflow“ uspořádání, homogenizaci vsádky zajišťoval proud vzduchu. Reaktor byl inokulován směsnou mikrobiální populací izolovanou z biofiltru, který byl dlouhodobě zatěžován směsí par acetonu a styrenu za konstantního průtoku vzduchu ($V_g = 1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$). Během experimentu byly sledovány následující provozní parametry: vstupní a výstupní koncentrace acetonu a styrenu ve vzduchu, koncentrace acetonu v kapalině, koncentrace rozpuštěného kyslíku v kapalině, teplota, pH, průtok vzduchu a sušina biomasy v médiu.

Byla zjištěna schopnost probublávaného submersního reaktoru účinně degradovat páry acetonu a styrenu ve směsi. Reaktor vykazoval nestabilitu a citlivost na změny organické zátěže. V případě zatížení reaktoru celkovou organickou zátěží nad $50 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ došlo k poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu, tím byla limitována účinnost degradace a byla sledována tvorba intermediátů degradace acetonu a styrenu.