



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2013

10. seminář

Pivovarství a kvasné technologie 2013

4. seminář

Environmentální biotechnologie 2013

Ústav biotechnologie

4. a 5. dubna 2013



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Sborník souhrnů a plných textů příspěvků

Konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2013

10. seminář

Pivovarství a kvasné technologie 2013

4. seminář

Environmentální biotechnologie 2013

Ústav biotechnologie

4. a 5. dubna 2013

Pořádající instituce:

Ústav biotechnologie

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

Odborná skupina Kvasná chemie a biotechnologie
Česká společnost chemická

Sponzoři a spolupracující společnosti:

Denwel, s.r.o.

EPS, s.r.o.

Lallemand UK – AB Vickers

Merck spol. s r.o.



ROCHE, s.r.o.

Budějovický Budvar, n.p.

Heineken Česká republika, a.s.

Pivovary Lobkowicz, a.s.

Pivovar Nymburk s.r.o.

Pivovary Staropramen s.r.o.

Přípravný a organizační výbor:

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

Členové: Bc. Nikol Krmenčíková

Rudolf Jung

Natálie Patakiová

Editor: Jaromír Fiala

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

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013

ISBN 978-80-7080-855-9

Program konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2013

10. seminář – Pivovarství a kvasné technologie 2013

4. seminář - Environmentální biotechnologie 2013

Čtvrtek 4. dubna 2013

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



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

8:00 – 9:00 Registrace účastníků

Přednášková sekce sál B+C

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

9:10 – 9:30 Basařová G.:
**Faktory výroby piva s Chráněným zeměpisným označením
České pivo**

9:30 – 9:40 Hudcová T., Dostálek P., Karabín M., Barešová M., Fialová K.:
Chmel jako léčivá rostlina

9:40 – 9:50 Karlová P., Halecký M., Páca J.:
Mikrobiální degradace směsi dinitrofenolů

9:50 – 10:00 Procházková G., Brányik T.:
**Potenciál využití kvasničných buněčných stěn pro sklizení řasové
biomasy**

10:00 – 10:10 Poštulková M., Brányik T., Fiala J.:
Historie a nové trendy v oblasti výzkumu přepěňování piva

10:10 – 10:20 Cejnar R., Hložková K., Kotrba P., Dostálek P.:
Genetické modifikace pivovarské kvasinky

10:20 – 10:30 Pádrová K., Čejková A.:
Vliv nanočástic železa na mikrobiální buňku

10:30 – 11:00 *Přestávka*

11:00 – 11:10	Šíková M., Pádřová K., Čejková A.: Biologická aktivita (toxicita) nanočástic a možnosti její modulace
11:10 – 11:20	Humhal T., Brányik T., Kaštánek P.: Heterotrofní kultivace jednobuněčných řas na alternativních zdrojích uhlíku a energie
11:20 – 11:30	Zikmundová V., Jaisamut K., Patáková P.: Produkce butanolu z odpadních materiálů
11:30 – 11:40	Ježdík R., Masák J.: Mikrobiální produkce rhamnolipidů a jejich využití
11:40 – 11:50	Holler J., Hošková M., Ježdík R., Masák J.: Vliv rhamnolipidů na tvorbu biofilmu jednobuněčných eukaryot
11:50 – 12:00	Vaicenbauerová L., Pospíšilová D., Jirků V.: Vliv magnetického pole na reprodukční a metabolickou aktivitu jednobuněčného organismu
12:00 – 12:10	Vitoušová K., Novák P., Poštulková M., Brányik T.: Fyzikální a biologické faktory ovlivňující přepěňování piva
12:10 – 12:20	Kvasničková E., Patáková P., Čížková H., Rychtera M.: Mikrobní produkce jantarové kyseliny a dalších kyselin citrátového cyklu u kvasinek druhu <i>Yarrowia lipolytica</i> a vybraných anaerobních bakterií
12:20 – 12:30	Kašáková M., Hlaváčková M., Moravcová J.: Příprava vybraných ligandů pro testování galaktosyltransferas pomocí SPR
12:30 – 14:00	Přestávka na oběd

14:00 – 14:10	Strejc J., Vondra V., Širíšťová L., Brányik T.: <i>Alicyclobacillus</i> – kontaminant ovocných nápojů a původce jejich kažení
14:10 – 14:20	Vondra V., Strejc J., Širíšťová L., Brányik T.: Studie kmenů rodu <i>Alicyclobacillus</i> kontaminujících ovocné nápoje
14:20 – 14:30	Karachevtsev A., Jelínek L., Karabín M.: Parametry sladování a jejich vliv na technologické vlastnosti sladu
14:30 – 14:40	Fialová K., Hudcová T., Karabín M., Dostálek P.: Biologicky aktivní látky chmele a jejich využití
14:40 – 14:50	Podolová N., Bittner M., Brányik T.: Experimentální metody kvantifikace tvorby mikrobiálních biofilmů
14:50 – 15:00	Kolková H., Bryzgal T., Fiala J.: Vliv podmínek skladování bylin na koncentraci jejich účinných látek
15:00 – 15:10	Kuchař J., Vaněk T., Páca J.: Degradace směsi par styren/acetone v odpadním vzduchu v probublávaném reaktoru
15:10 – 15:20	Kotlíková B., Jelínek L., Dostálek P.: Možnosti zvýšení trvanlivosti piva
15:20 – 15:30	Humhal T.: Pivní styly

15:30 – 16:00

Přestávka

Prezentace sponzorujících společností – sál B+C

16:00 – 17:00

Prezentace sponzorujících společností

17:00 – 17:30

Diskuse

17:30

Zakončení 1. dne konference

Pátek 5. dubna 2013

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

Možnost návštěvy vybraných laboratoří a technologické haly ÚB

- Sraz účastníků 11:00 hodin před knihovnou ÚB

**Souhrny
a plné texty příspěvků**

Chmel jako léčivá rostlina

Hudcová T., Dostálek P., Karabín M., Barešová M., Fialová K.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Už v minulosti byl chmel (*Humulus lupulus* L.) znám jako léčivá rostlina. Odvary z chmelových hlávek byly využívány například při léčení nespavosti či ke zlepšení funkce gastrointestinálního traktu. V současnosti jsou chmelové přípravky dostupné v nejrůznějších formách, od sušených chmelových hlávek až po tablety či éterické oleje obsahující chmelový extrakt. Látky obsažené ve chmelu jsou rovněž součástí doplňků stravy na potlačení negativních příznaků klimakteria. Tyto doplňky stravy a funkční potraviny s deklarovaným obsahem chmele byly podrobeny analýze na obsah nejvýznamnějších sekundárních metabolitů vykazující pozitivní účinky na lidské zdraví, především na hořké kyseliny, které mají prokazatelné sedativní a antibakteriální účinky. Analyzované byly taktéž prenylované flavonoidy, které vykazují antioxidační, protizánětlivé, antikarcinogenní, antimikrobiální a estrogenní účinky. Lze předpokládat, že díky přibývajícím studiím o prospěšnosti látek obsažených ve chmelu, se využití chmele v oblastech výživy a v různých oblastech medicíny ještě více rozšíří.

Mikrobiální degradace směsi dinitrofenolů

Karlová P., Halecký M., Páca J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Úvod

Nitrofenoly patří mezi nebezpečné a relativně perzistentní polutanty životního prostředí, kontaminující zejména půdu a vodu. Do prostředí pronikají skrze antropogenní činnost spojenou s výrobou, použitím, či skladováním pesticidů, výbušnin nebo barviv (Spain a kol., 2000). Tři látky ze skupiny nitrofenolů (2-nitrofenol, 4-nitrofenol a 2,4-dinitrofenol) byly pro svoji toxicitu a rozsah jimi způsobeného znečištění zařazeny na seznam předních polutantů U.S. EPA (U.S. EPA, 2012, online). Kromě vysoké akutní i chronické toxicity se 2,4-dinitrofenol vyznačuje také schopností odpřahovat oxidativní fosforylaci. Přestože škodlivý účinek nitrofenolů a jim příbuzných látek na lidské zdraví vedl k zákazu použití produktů na jejich bázi, jako je herbicid Dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrofenol) (Hammill a Crawford, 1996) nebo použití samotného 2,4-DNF v humánní medicíně jako prostředku proti obezitě (Colman, 2007), objem výroby a výskyt nitrofenolů v životním prostředí je stále významný.

Jedním z prostředků pro odstranění nitrofenolů z odpadních vod či kontaminované půdy je mikrobiální degradace. Ve srovnání s dostupnými fyzikálními metodami je tato metoda relativně levná a účinná a nedochází při ní v takové míře k tvorbě toxických vedlejších produktů a skleníkových plynů (Snellinx a kol., 2002). Jako zdroj uhlíku, energie či dusíku dokáže nitrofenoly využít řada bakterií (Kulkarni a Chaudhari, 2007), avšak mezi mikrobiální degradéry nitrofenolů patří mimo heterotrofních bakterií také zástupci sinic (Hirooka a kol., 2006) a kvasinek (Alexieva a kol., 2008).

Mikroorganismy mohou nitrofenoly odbourat za aerobních i anaerobních podmínek pomocí různých oxidativních či reduktivních strategií v závislosti na enzymovém vybavení daného mikroorganismu, pozici nitroskupiny na aromatickém jádře a podmínkách prostředí. Za aerobních podmínek jsou nitrofenoly transformovány oxidativní cestou prostřednictvím mono- či dioxygenas a nitroskupina je odštěpena v podobě dusitanového iontu (Nishino a kol., 2000). Nicméně silný negativní mezomerní efekt, rostoucí s počtem nitroskupin navázaných na aromatickém jádře, ztěžuje katalýzu oxygenasami a je důvodem, proč mohou být u polynitroaromátů během počáteční fáze degradace preferovány redukční mechanismy, a to i za aerobních podmínek (Rieger a kol., 2002). Za anaerobních podmínek dochází téměř výhradně k redukci nitroskupiny na aminoskupinu. Vzniklé aminy ovšem často nejsou anaerobními mikroorganismy dále metabolizovány a zůstávají v prostředí, anebo

mohou být odbourány až po změně podmínek oxidační cestou (Soojhawon a kol., 2005).

Mikrobiální degradace jednotlivých nitrofenolů byla již důkladně prozkoumána, avšak studií zabývajících se odbouráváním jejich směsí je doposud poměrně málo. Přitom v prostředí nejsou směsné kontaminace nijak výjimečné, neboť nitroaromáty mohou do prostředí pronikat buď rovnou ve směsích, nebo se mohou v prostředí transformovat v jiné vlivem různých biologických či abiotických faktorů. V odborné literatuře byly zdokumentovány jak případy indukce odbourávání nitrofenolu jiným nitroaromatickým kosubstrátem (Iwaki a kol., 2007), tak naopak případy inhibice (Han, 2008; Blasco a kol., 1999). Znalost takovýchto substrátových interakcí může být klíčová pro úspěšný návrh a implementaci bioremediačních technologií.

Cílem této práce bylo popsat průběh odbourávání 2,4-dinitrofenolu (2,4-DNF), 2,6-dinitrofenolu (2,6-DNF) a jejich směsí za aerobních podmínek v kontinuálně pracujícím náplňovém reaktoru. Pozornost byla věnována nejen závislosti degradační účinnosti na vstupní koncentraci substrátů, ale také osudu nitroskupiny v průběhu odbourávání dinitrofenolů.

Materiál a metody

Mikroorganismy

Dinitrofenoly (DNF) byly odbourávány směsnou bakteriální kulturou pocházející ze sbírky laboratoře, která byla původně izolována ze vzorků půdy odebrané z prostředí dlouhodobě kontaminovaného nitroaromatickými látkami. Tato kultura byla kultivována v třepaných baňkách v minerálním médiu s přidavkem dinitrofenolů po dobu asi jednoho měsíce a poté byla použita k inokulaci reaktorů.

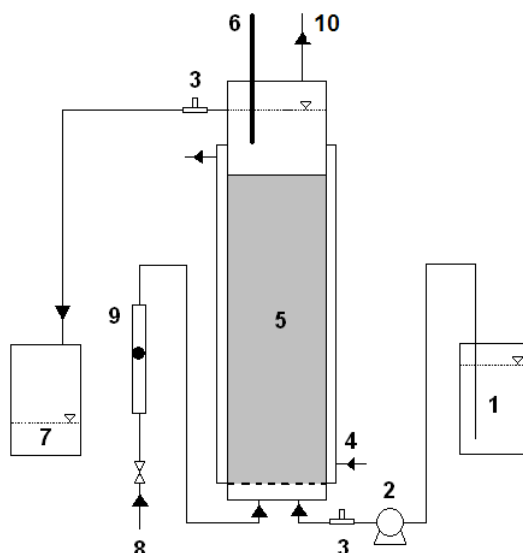
Kultivační médium

Pro adaptaci mikroorganismů i vlastní degradační experimenty v reaktorech bylo použito základní minerální BSM médium, obsahující $0,5 \text{ g.l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $0,4 \text{ g.l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0,3 \text{ g.l}^{-1} \text{ MgCl}_2$ a $50 \text{ }\mu\text{l.l}^{-1}$ roztoku stopových prvků ($3,2 \text{ g.l}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $6 \text{ g.l}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $2 \text{ g.l}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $2 \text{ g.l}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $3 \text{ g.l}^{-1} \text{ CaSO}_4 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$, $2 \text{ g.l}^{-1} \text{ CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $2 \text{ g.l}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ a $0,1 \text{ g.l}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Do tohoto média byly přidávány roztoky DNF, které představovaly pro mikroorganismy jediný zdroj uhlíku, dusíku a energie.

Reaktor a kultivační podmínky

Degradační experimenty byly prováděny ve dvou kontinuálně provozovaných náplňových reaktorech s volným (mezičásticovým) pracovním objemem 290 ml, celkovým pracovním objemem 730 ml, výškou lože 330 mm a hmotnostní náplně 490 g. Jako náplň reaktoru byla použita expandovaná břidlice s velikostí částic 4-8 mm. Reaktor byl prostřednictvím duplikátorového pláště temperován na 30°C . Minerální médium s rozpuštěnými DNF bylo přiváděno na dno

reaktoru v soupradu se vzduchem. Reaktor je schematicky znázorněn na Obr. 1. Organická zátěž reaktoru byla měněna skokově změnou vstupní koncentrace DNF v médiu, zatímco průtok média a hydraulický retenční čas byly udržovány konstantní na hodnotách $1,9 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ a 2,5 h.



Obr. 1 Schéma náplňového reaktoru: (1) zásobník s médiem, (2) membránová pumpa, (3) vzorkovací místo, (4) temperace, (5) náplň reaktoru, (6) kyslíková elektroda, (7) odpadní nádoba, (8) přívod vzduchu, (9) rotametr, (10) výstup vzduchu

Analytické metody

Koncentrace DNF a dusičnanových a dusitanových iontů byly stanovovány prostřednictvím systému HPLC (systém DeltaChrom, Watrex, kolona Nucleosil 120-C18) s detektorem diodového pole (UV 6000 LP, Thermo Separation Products Inc.). Koncentrace amonných iontů byla stanovována pomocí systému HPLC (systém DeltaChrom, Watrex, kolona Watrex Universal Cation II) s vodivostním detektorem (Shodex CD-5).

Výpočtové vztahy

K vyhodnocení průběhu degračních experimentů byly použity následující výpočtové vztahy:

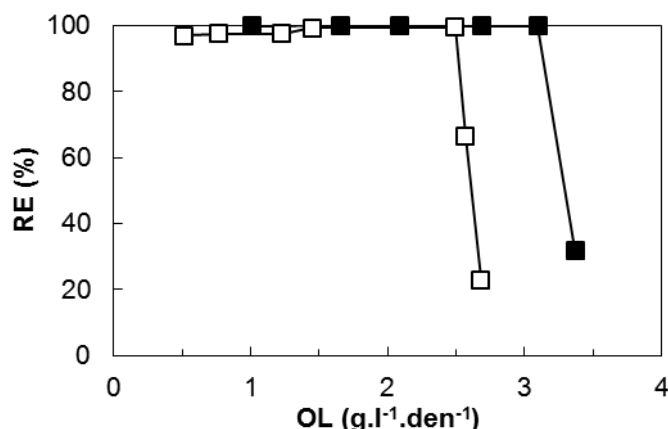
Účinnost odbourávání (RE):
$$RE = \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}}\right) \cdot 100 \text{ (\%)}$$

Organická zátěž (OL)
$$OL = \frac{C_{in} \cdot F}{V_L} \quad (\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{den}^{-1})$$

kde C_{in} a C_{out} jsou vstupní a výstupní koncentrace, F je průtok kapalného média ($\text{l} \cdot \text{den}^{-1}$) a V_L je volný pracovní objem reaktoru.

Výsledky a diskuze

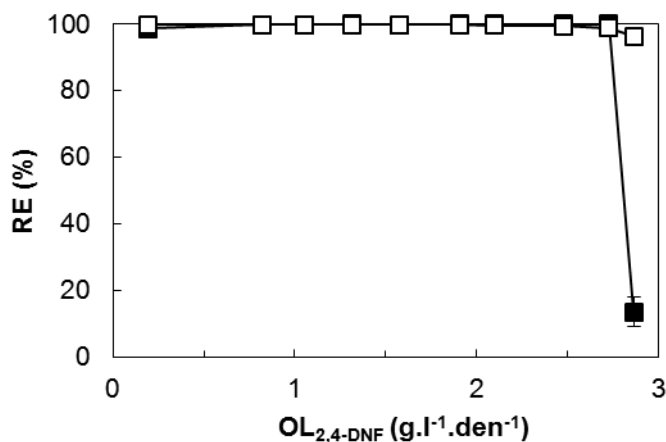
V první fázi experimentu byly 2,4-DNF a 2,6-DNF odbourávány v reaktorech každý zvlášť. Závislost účinnosti odbourávání DNF na organické zátěži je znázorněna na Obr. 2. 2,4-DNF byl odbouráván s téměř 100 % účinností až do koncentrace 312 mg. l⁻¹, odpovídající organické zátěži 3,1 g.l⁻¹.den⁻¹. 2,6-DNF byl odbouráván s účinností vyšší než 97% až do koncentrace 282 mg. L⁻¹ odpovídající organické zátěži 2,5 g.L⁻¹.den⁻¹.



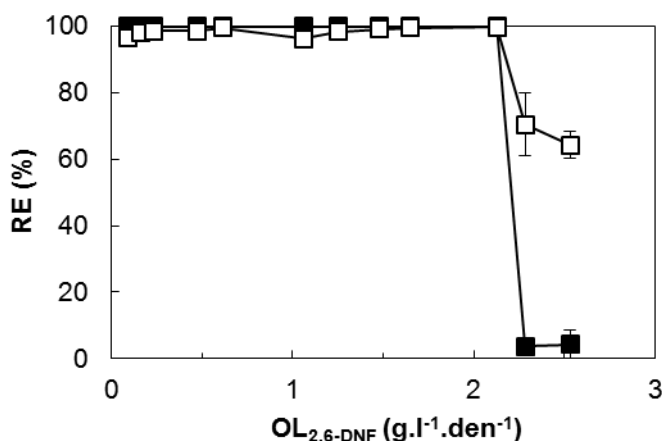
Obr. 2 Odbourávání 2,4-DNF a 2,6-DNF v náplňových reaktorech samostatně: (—■—) účinnost odbourávání 2,4-DNF, (---□---) účinnost odbourávání 2,6-DNF v závislosti na organické zátěži jednotlivými látkami

V druhé fázi experimentu byl zkoumán průběh odbourávání směsí DNF. Do reaktoru R1 byla přiváděna směs s konstantní koncentrací 2,6-DNF 100 mg.l⁻¹ a byla skokově měněna koncentrace 2,4-DNF v rozmezí 20 – 300 mg.l⁻¹. Průběh odbourávání této směsi je znázorněn na Obr. 3. Po překročení mezní koncentrace 284 + 100 mg.l⁻¹ (OL = 2,7 + 1 g.L⁻¹.den⁻¹) 2,4-DNF + 2,6-DNF dramaticky klesla účinnost odbourávání 2,4-DNF, zatímco účinnost odbourávání 2,6-DNF se snížila jen nepatrně. Podobný trend byl pozorován při odbourávání směsi DNF v reaktoru R2, do něž byla přiváděna směs obsahující konstantní koncentraci 2,4-DNF 100 mg.l⁻¹ a měnící se koncentraci 2,6-DNF. I zde došlo po překročení mezní koncentrace k výraznému poklesu účinnosti odbourávání 2,4-DNF, zatímco pokles účinnosti odbourávání byl se zvyšující se zátěží pozvolnější (Obr. 4). Mez odbourávání byla dosažena při hodnotě vstupní koncentrace 100 + 198 mg.l⁻¹ (OL= 1 + 2,1 g.L⁻¹.den⁻¹) 2,4-DNF + 2,6-DNF, a tedy při nižší celkové zátěži než u reaktoru R1, což lze přičítat vyšší toxicitě 2,6-DNF. V obou případech došlo po překročení mezních zátěží ke ztrátě schopnosti účinně odbourat ze směsi 2,4-DNF i po snížení vstupní koncentrace obou substrátů. Regenerace biokatalyzátoru při nízké vstupní koncentraci DNF trvala déle než 7 dní. V případě reaktoru R1 byla schopnost biokatalyzátoru odbourávat 2,4-DNF obnovena až při úplné absenci 2,6-DNF v médiu.

Z porovnání obou fází experimentu plyne, že vyšší koncentrace obou DNF byly odbourány v případě, kdy byly DNF do reaktoru přiváděny samostatně.



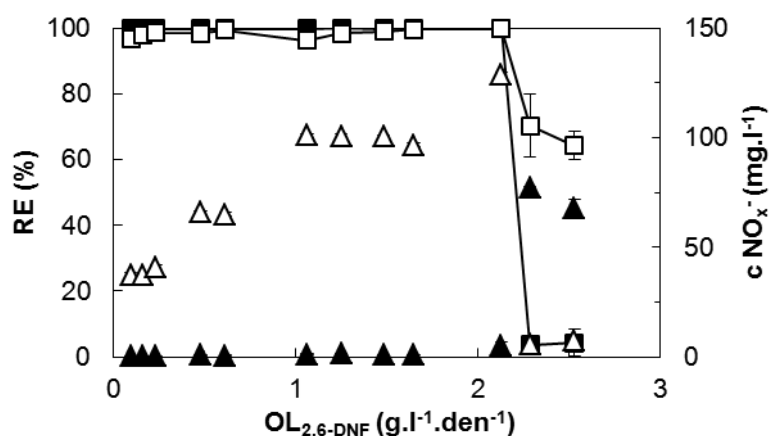
Obr. 3 Odbourávání směsi dinitrofenolů obsahující konstantní koncentraci 100 mg.l⁻¹ 2,6-DNF: (■) účinnost odbourávání 2,4-DNF, (□) účinnost odbourávání 2,6-DNF v závislosti na organické zátěži 2,4-DNF



Obr. 4 Odbourávání směsi dinitrofenolů obsahující konstantní koncentraci 2,4-DNF 100 mg.l⁻¹: (■) účinnost odbourávání 2,4-DNF, (□) účinnost odbourávání 2,6-DNF v závislosti na organické zátěži 2,6-DNF

Během všech experimentů byla analyzována přítomnost dusitanových, dusičnanových a amonných iontů v médiu na výstupu z reaktorů. Amonné ionty, tvořící se reduktivními metabolickými drahami, nebyly v médiu buď vůbec přítomny, nebo byly detekovány v množství nižším než 3 mg.l⁻¹. Zajímavé poznatky přineslo sledování koncentrace dusitanových a dusičnanových aniontů. Navzdory očekávání byla koncentrace dusitanových aniontů až do dosažení mezní koncentrace DNF nízká a naopak koncentrace dusičnanových aniontů se zvyšovala se vzrůstající koncentrací DNF. Nicméně po překročení mezní koncentrace DNF v médiu koncentrace dusičnanových aniontů významně poklesla a naopak stoupla koncentrace dusitanových aniontů. Tento trend byl

pozorován při odbourávání DNF samostatně i ve směších. Na Obr. 5 je pro ilustraci ukázán průběh uvolňování dusičnanových a dusitanových aniontů do média během odbourávání směsi DNF v reaktoru R2 obsahující konstantní koncentraci 100 mg.l⁻¹ 2,4-DNF a zvyšující se koncentraci 2,6-DNF. Lze předpokládat, že nitroskupina je oxidativními metabolickými drahami degradace DNF odštěpována ve formě dusitanového iontu, který je dále oxidován přítomnými mikroorganismy na dusičnanový. Jejich nitrifikační aktivita je ovšem při dosažení určité koncentrace DNF inhibována a v médiu stoupne koncentrace dusitanových iontů, která naopak inhibuje odbourávání DNF (Luque-Almagro a kol., 2006).



Obr. 5 Tvorba dusíkatých aniontů v průběhu odbourávání směsi DNF: (—■—) účinnost odbourávání 2,4-DNF, (—□—) účinnost odbourávání 2,6-DNF, (▲) koncentrace NO₂⁻, (△) koncentrace NO₃⁻

Závěr

Náplňové reaktory byly schopné odbourat relativně vysoké koncentrace dinitrofenolů, a to jak samostatně, tak ve směsi. Horní kritická mez odbourání byla pro oba DNF vyšší, jestliže byly odbourávány samostatně, nicméně celková odbouraná organická zátěž dosahovala vyšších hodnot u směsí. Až do překročení meze odbourávání bylo do média uvolňováno značné množství dusičnanových aniontů, jejichž koncentrace ovšem po jejím překročení výrazně poklesla a naopak koncentrace dusitanových iontů v médiu na výstupu z reaktoru stoupla. Souvislost mezi metabolismem DNF a dusíkatých iontů bude zřejmě významná a bude předmětem dalšího zkoumání.

Během žádného z experimentů nebyly v médiu na výstupu z reaktorů detekovány kromě dusíkatých iontů žádné metabolity. Lze tedy říci, že aerobní mikrobiální degradace v kontinuálně pracujících náplňových reaktorech je vhodným nástrojem pro detoxifikaci průmyslových odpadních vod znečištěných vysokou koncentrací dinitrofenolů.

Použitá literatura

Alexieva Z, Gerginova M, Zlateva P, Manasiev J, Ivanova D, Dimova N. Monitoring of aromatic pollutants biodegradation. *Biochem Eng J.* 2008; 40(2): 233-40.

Blasco R, Moore E, Wray V, Pieper D, Timmis K, Castillo F. 3-nitroadipate, a metabolic intermediate for mineralization of 2,4-dinitrophenol by a new strain of a *Rhodococcus* species. *J. Bacteriol.* 1999;181(1): 149–52.

Colman E. Dinitrophenol and obesity: An early twentieth-century regulatory dilemma. *Regul Toxicol Pharm.* 2007; 48(2): 115-7.

Hammill TB, Crawford RL. Degradation of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb) by *Clostridium bifermentans* KMR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62(5):1842-46.

Han S. In Situ Bioremediation and Natural Attenuation of Dinitrotoluenes and Trinitrotoluene [PhD Thesis]. Atlanta, USA: Georgia Institute of Technology; 2008.

Hirooka T, Nagase H, Hirata K, Miyamoto K. Degradation of 2,4-dinitrophenol by a mixed culture of photoautotrophic microorganisms. *Biochem Eng J.* 2006; 29(1-2): 157–62.

Iwaki H, Kazuya A, Hasegawa Y. Isolation and characterization of a new 2,4-dinitrophenol degrading bacterium *Burkholderia* sp. strain KU-46 and its degradation pathway. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 2749(1): 112–17.

Kulkarni M, Chaudhari A. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. *J Environ Manage.* 2007; 85(2): 496-512.

Luque-Almagro VM, Blasco R, Sáez LP, Roldán MD, Moreno-Vivián C, Castillo F, Martínez-Luque M. Interactions between nitrate assimilation and 2,4-dinitrophenol cometabolism in *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *Curr Microbiol.* 2006; 53(1): 37-42.

Nishino SF, Spain JC, He Z. Strategies for aerobic degradation of nitroaromatic compounds by bacteria: Process discovery to field application. In: Spain JC, Hughes JB, Knackmuss HJ, editors. Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives. Boca Raton, FL: CRC Press; 2000. p. 7-61.

Rieger PG, Meier HM, Gerle M, Vogt U, Groth T, Knackmuss HJ. Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *J Biotechnol.* 2002; 94(1): 101-23

Snellinx Z, Nepovím A, Taghavi S, Vangronsveld J, Vanek T, Van der Lelie D. Biological remediation of explosives and related nitroaromatic compounds. *Environ Sci Pollut R.* 2002; 9(1): 48-61.

Soojhawon I, Lokhande PD, Kodam KM, Gawai KR. Biotransformation of nitroaromatics and their effects on mixed function oxidase system. *Enzyme Microb Tech.* 2005; 37(5): 527–33.

Spain JC. Introduction. In: Spain JC, Hughes JB, Knackmuss HJ, editors. Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives. Boca Raton, FL: CRC Press; 2000. p. 1-6.

U.S. EPA: Priority Pollutants [Internet]. Washington DC: United States Environmental Protection Agency; [poslední aktualizace 6.3. 2012; citováno 28.4. 2013]. Dostupné z:
<http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm>.

Financováno z MŠMT (projekt KONTAKT II LH13073) a GAČR (projekt P503/11/0163).

Potenciál využití kvasničných buněčných stěn pro sklízení řasové biomasy

Procházková G., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Redukce celkových procesních nákladů spojených s velkoobjemovým pěstováním řasové biomasy je pro dnešní procesy klíčové. Jedním z nových řešení by mohl být vývoj metody pro výrobu nových flokulačních agens z buněčných stěn pivovarských kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Modelovým mikroorganismem byla zelená řasa *Chlorella vulgaris* mající řadu biotechnologicky atraktivních vlastností. Základ kvasničných buněčných stěn (β -glukan) byl chemicky modifikován činidlem DEAE (diethylaminoethyl), aby nesl kladně nabitě funkční skupiny a docházelo k úspěšnému navázání daného agens na negativně nabitý buněčný povrch. Po separaci biomasy a získání žádoucích produktů by pak následně zbylý materiál mohl posloužit jako substrát bohatý na polysacharidy pro anaerobní digesci.

Poděkování: Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2013).

Historie a nové trendy v oblasti výzkumu přepěňování piva

Poštulková M., Brányik T., Fiala J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Přepěňování piva – tzv. gushing – je negativní jev, kdy při otevření piva vlivem náhlého poklesu tlaku dochází k prudkému úniku kapaliny z pивní lahve či plechovky. Přestože se gushing zkoumá již řadu let, ještě dosud nebyl jeho mechanismus plně pochopen. Předpokládá se, že plísňová kontaminace vstupní suroviny pro výrobu sladu – ječmene – je jedna z hlavních příčin přepěňování. Plísně totiž produkují malé, hydrofobní, silně povrchově aktivní proteiny zvané hydrofobiny, které se podílejí na stabilizaci malých bublin CO_2 v konečném produktu. Kvalita surovin a vedení celého procesu výroby piva pak může nakonec gushing podpořit nebo potlačit. Rovněž je věnována značná pozornost vývoji nových metod pro predikci a stanovení přepěňování. Původní testy, jež nejsou příliš spolehlivé, začínají být nahrazovány citlivějšími a přesnějšími metodami. Stále více vědeckých skupin se obrací od molekulárně-biologické podstaty přepěňování k fyzikálně-chemické, kde se gushing studuje především jako kombinace prekursoru přepěňování (například hydrofobinu) a plynu CO_2 .

Genetické modifikace pivovarské kvasinky

Cejnar R.¹, Hložková K.², Kotrba P.², Dostálek P.¹

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

²Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Úvod

Genetické modifikace pivovarských kvasinek jsou velmi náročné. Je totiž mnohem snazší geneticky modifikovat dobře charakterizované haploidní laboratorní kmeny než geneticky komplexní průmyslové kmeny, které jsou běžně polyploidní, aneuploidní, či dokonce allopoloidní¹⁻³. Důkazem je skutečnost, že strategie použitá k určité modifikaci laboratorního kmene nemusí nutně fungovat (a často také nefunguje) u kmene průmyslového^{4,5}. Ještě složitější je situace u spodně kvasících kmenů. Tyto kvasinky spadající do druhu *Saccharomyces pastorianus* jsou genetickými hybridy druhů *Saccharomyces cerevisiae* (svrchní kvasinky) a *Saccharomyces bayanus*⁶. Studie založené na hybridizacích DNA ukázaly, že v genomu druhu *Saccharomyces pastorianus* jsou zastoupeny dva typy chromozomů – chromozomy druhu *Saccharomyces cerevisiae* a chromozomy druhu *Saccharomyces bayanus*^{7,8}. Existence dvou genomů byla potvrzena i jinými metodami, např. analýzou proteomu⁹. Genomy jednotlivých produkčních kmenů jsou tedy rozličnými kombinacemi genomů těchto dvou druhů. Dokonce bylo zjištěno, že některé kmeny mohou dále obsahovat i části genomů z dalších kvasinek patřících do evoluční skupiny *Saccharomyces cerevisiae* sensu stricto¹⁰. Důsledkem jsou rozdíly mezi vlastnostmi a schopnostmi jednotlivých produkčních kmenů, přičemž konkrétní genotyp závisí na původu kmene. Konkrétní kmeny a jejich vlastnosti pak lze přiřadit k určitým pivovarům nebo lokalitě¹¹. Navzdory obtížím se v mnoha laboratořích po celém světě podařilo vypěstovat různě transformované pivovarské kvasinky. Některé z nich jsou diskutovány v tomto přehledu.

Optimalizace kvasných schopností

Jednou z možností, jak dosáhnout vyšší efektivity při výrobě piva je vylepšení kvasných schopností produkčního kmene. V mladině jsou obsaženy zkvasitelné monosacharidy glukóza a fruktóza, disacharidy maltóza a sacharóza a trisacharid maltotrióza. Maltóza je hlavním zkvasitelným cukrem mladiny – tvoří asi 60% veškerých cukrů, u maltotriózy se jedná o zhruba 20%. Nedostatečné zkvašování maltózy a hlavně maltotriózy některými kmeny kvasinek vede k nižšímu obsahu alkoholu v pive a zbytkové cukry mohou navíc způsobovat chuťové problémy¹². Řídicím dějem utilizace maltózy a maltotriózy je rychlost jejich transportu do buňky¹². Výzkum se proto zaměřil hlavně na zvýšení účinnosti maltózových a maltotriózových přenašečů. Maltóza, příp. maltotrióza, je transportována do

buňky permeázou, následně hydrolyzována za vzniku dvou, resp. tří, glukózových podjednotek, které jsou pak zpracovány centrálním metabolizmem kvasinky¹². Geny kódující utilizaci maltózy – *MAL* geny, jsou lokalizovány v tzv. *MAL* lokusech¹³. Laboratorní kmeny obsahují pouze jeden *MAL* lokus, v průmyslových kmenech je *MAL* lokusů pět¹⁴. Každý z těchto pěti vzájemně nezávislých *MAL* lokusů (*MAL1* – *MAL4* a *MAL6*) obsahuje až tři různé geny: *MALx1* kóduje přenašeč, *MALx2* maltázu a *MALx3* transkripční aktivátor obou předchozích genů, přičemž *x* je 1 – 4 nebo 6^(cit. 15-18). Svrchní kvasinky mají všechny z těchto genů a dále též geny *AGT1*, *MPH2* a *MPH3* kódující další membránové přenašeče¹⁹. Spodním kvasinkám chybí geny *MAL61* a *MPH3*. Tím lze vysvětlit rozdíly v kinetice transportu maltózy mezi těmito dvěma druhy^{20,21}.

Maltotrióza je využívána v pozdních fázích kvašení za pomoci *Agt1*, *Malx1*, *Mph2* a *Mph3*^(cit. 22). Gen *MTT1* kóduje další přenašeč maltotriózy a zesílení exprese tohoto genu (vnesením další kopie tohoto genu) u kmene spodního kvašení vedlo k výraznému nárůstu příjmu maltotriózy²³. *AGT1* geny u svrchních kvasinek kódují funkční přenašeče, ale u některých spodních kvasinek *AGT1* geny obsahují předčasný stop kodon²¹. Po vnesení jedné nebo několika kopií genu *AGT1* ze svrchních kvasinek do kmene spodních kvasinek došlo k nárůstu rychlosti transportu maltózy a maltotriózy do buňky. Transformanty v důsledku zkvašovaly vysokoprocenní mladinu rychleji a úplněji než původní kmen a pivo mělo také vyšší obsah alkoholu²¹.

Expresa *MAL* genů je indukována maltózou (dochází k aktivaci *MALx3*) a reprimována glukózou²⁴. Glukózová represe obecně zabraňuje využívání jiných cukrů než glukózy v přítomnosti glukózy v médiu a prodlužuje tak dobu kvašení. Za glukózovou represi je zodpovědných několik transkripčních represorů²⁵, utilizaci maltózy reguluje protein *Mig1* reprimující transkripci *MALx3* genů⁴. Vazebné domény pro *Mig1* byly nalezeny v promotorové oblasti řady genů regulovaných glukózou²⁶. Glukózová represe se dále projevuje i štěpením již syntetizovaných mRNA²⁷.

Deleci genu *MIG1* byla glukózová represe *MAL* genů zmírněna, ale pouze u laboratorního kmene. Delece genu *MIG1* byla provedena i u několika průmyslových kmenů, glukózová represe však byla ze zatím neznámých důvodů potlačena pouze při utilizaci sacharózy, nikoliv maltózy⁴. Bylo ale ukázáno, že deleci genu *MIG1* u průmyslových kmenů došlo ke zvýšení exprese genů *MALx1* a *MALx2*. Represe utilizace maltózy proto musí být realizována ještě nějakým jiným způsobem. Limitujícím faktorem může být inaktivace přenašeče maltózy v přítomnosti glukózy^{4,26}. Kromě delece genu *MIG1* existují i další možnosti, jak odstranit prodlevu při utilizaci maltózy v médiích s glukózou²⁸. Např., *MALx1* a *MALx2* lze umístit pod kontrolu konstitutivních promotorů²⁹.

Kromě úplnějšího zpracování zdrojů uhlíku je pozornost věnována asimilaci dusíkatých látek taktéž potřebných pro růst kvasinek. Hladovění na dusík může vést i k limitaci příjmu cukrů³⁰.

Aminokyseliny jsou v průběhu fermentace kvasinkami asimilovány v určitém pořadí. Aminokyseliny skupiny A (glutamát, aspartát, glutamin, asparagin, serin, threonin, lysin a arginin) a aminokyseliny skupiny B (histidin, valin, methionin, leucin a izoleucin) jsou přijímány okamžitě, přičemž aminokyseliny skupiny B jsou přijímány mnohem pomaleji než aminokyseliny skupiny A. Aminokyseliny skupiny C (glycin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan a alanin) a amoniak jsou asimilovány po úplném vyčerpání aminokyselin skupiny A. Prolin, nejvíce zastoupená aminokyselina mladiny, není během pивovarského kvašení asimilován téměř vůbec³¹.

U laboratorních kmenů jsou za transport prolinu do buňky zodpovědné zejména dvě dusíkem regulované permeázy – nespecifická permeáza Gap1 („general amino acid permease“) transportující všechny aminokyseliny³² a vysoce specifická prolinová permeáza Put4³³. U spodních kvasinek rostoucích v bohatém médiu jako je mladina je ale permeáza Put4 neaktivní. Řízenou mutací genu *PUT4* byla vytvořena stabilnější forma permeázy odolnější vůči degradaci a příslušné mutantní kmeny asimilovaly prolin bez negativního vlivu na kvalitu piva³⁴.

Optimalizace flokulace

Dalším příkladem zefektivnění výroby piva je usnadnění odstranění kvasnic z piva optimalizací flokulace. Flokulace je vratný, asexuální a na přítomnosti vápníku závislý proces, při kterém buňky vzájemně adherují a vytváří vločky skládající se z tisíců buněk³⁵. Flokulace kvasinek závisí na interakcích flokulinů (adhezínů) s manózovými zbytky mannanových řetězců. Polysacharid mannan je běžnou součástí kvasničné buněčné stěny, flokuliny jsou glykoproteiny (lektiny) buněčné stěny kvasinky. V ideálním případě jsou vzniklé vločky po vyčerpání živin (sacharidů) rychle odděleny od média, buď sedimentací (spodní kvasinky) nebo jsou vznikajícím oxidem uhličitým unášeny k hladině (svrchní kvasinky). Jedná se o ekonomicky výhodné a životní prostředí nezatěžující způsoby separace, protože flokulace je přirozenou vlastností kvasinek. Jednotlivé produkční kmeny kvasinek však vykazují rozdílné, často neoptimální, flokulační chování a některé kmeny kvasinek neflokulují vůbec^{35,36}. Výzkum se zaměřil zejména na optimalizaci síly a nástupu flokulace.

Je velmi důležité, aby flokulace začala během fermentace ve správný čas. Pokud flokulace začne příliš brzy, mladina není dostatečně prokvašená a důsledkem je abnormální aroma piva³⁵. Pozdní flokulace má za následek nedostatečné odstranění kvasnic³⁷. Flokulace je obecně spojena s nástupem stacionární fáze růstu, ale faktory kontrolující přesné načasování a stupeň flokulace nejsou úplně známy^{35,37}. Ví se ale, že flokulace závisí na mnoha vnějších podmínkách, např. na koncentraci etanolu, teplotě, osmotickém tlaku a dostupnosti živin³⁸⁻⁴¹. Dále jsou důležité pH, vápenaté a zinečnaté ionty, kyslík, růstová fáze a buněčná denzita³⁵. Flokulace je také řízena geneticky^{42,43}. Byly popsány tři flokulační fenotypy podle typu flokulinů buněčných stěn, citlivosti k inhibici cukru a

proteolytickými enzymy a závislosti na růstových podmínkách a pH. Jedná se o fenotypy Flo1, NewFlo a MI („mannose-insensitive“)^{44,45}. Flo1 fenotyp je inhibován pouze manózou, NewFlo fenotyp je inhibován též glukózou a maltózou. MI fenotyp nevykazuje specifické interakce proteinů s mannany a není inhibován žádným z uvedených cukrů⁴⁵. Většina svrchních kvasinek je fenotypu NewFlo, zatímco spodní kvasinky patří do skupiny s fenotypem Flo1 (cit. 46). MI fenotyp je vzácný a objevuje se u některých kmenů svrchních kvasinek³⁷.

Flokuliny jsou kódovány tzv. flokulačními geny – *FLO* geny³⁶. U laboratorního kmene S288C bylo identifikováno pět *FLO* genů: *FLO1*, *FLO5*, *FLO9*, *FLO10* a *FLO11* (cit. 47). Několik *FLO* pseudogenů (obsahují uvnitř sekvence kódující funkční protein stop kodon nebo posunutý čtecí rámec) bylo nalezeno poblíž telomer⁴⁸. Téměř každý kvasničný kmen však disponuje odlišnou sadou alel jednotlivých *FLO* genů, což je způsobeno velmi rychlou evolucí a diverzifikací *FLO* genů⁴⁹. Geny *FLO1* a *FLO5* byly izolovány a charakterizovány. Oba geny kódují integrální membránový protein^{50,51}. Neflokulující kmeny kvasinek získaly po transformaci genem *FLO1* nebo genem *FLO5* schopnost flokulace^{2,50,51}. Flo1 fenotyp je spojován s genem *FLO1*, zatímco flokulin fenotypu NewFlo je kódován genem *FLO10*, který je exprimován až s nástupem stacionární fáze růstu³⁷.

Hlavním rozdílem mezi druhy *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces pastorianus* je přítomnost proteinu Lg-Flo1 u spodních kvasinek (protein homologní k proteinu Flo1 svrchních kvasinek)⁵². Tento adhezin hraje v pivovarství významnou roli. Zajišťuje, že flokulace proběhne na konci fermentace po spotřebování sacharidů. Přítomné sacharidy se totiž na tento adhezin kompetitivně váží a inhibují tak flokulaci¹². V běžně používaných laboratorních kmech jsou *FLO* geny umlčeny z důvodu tzv. nonsense mutace v transkripčním aktivátoru *FLO8*. Nicméně zvýšením exprese každého z pěti *FLO* genů bylo ukázáno, že jednotlivé *FLO* geny propůjčují buňkám širokou škálu adhezivních vlastností, např. různou sílu flokulace⁵³. Expresi jednotlivých *FLO* genů lze dále účinně kontrolovat za cílem dosažení vhodného načasování flokulace⁵⁴.

Zvýšením exprese specifických *FLO* genů bylo dosaženo určitého zlepšení flokulace, kmeny však začaly flokulovat předčasně^{2,53}. Největším problémem z hlediska správného načasování flokulace je nedostatek promotorů, které mohou být indukovány v provozních podmínkách ve vhodný čas. Dobrymi kandidáty pro opožděnou genovou expresi ve stacionární fázi v podmínkách pivovarského kvašení jsou promotory proteinů tepelného šoku („heat shock proteins“) *HSP26* a *HSP30* (cit. 55). Po nahrazení nativního promotoru *FLO1* promotorem *HSP30* u laboratorního kmene flokulace skutečně proběhla ke konci fermentace^{54,56}. Umístěním genů *FLO5* a *FLO11* pod kontrolu promotoru *HSP30* bylo také dosaženo správného načasování flokulace. Flokulace však

v těchto případech nebyla tak intenzivní jako při využití genu *FLO1*, u konstruktů s genem *FLO11* se jednalo o vyloženě slabou flokulaci⁵⁴.

Optimalizace filtrace

Zlepšení filtrovatelnosti piva bylo též předmětem zájmu pivovarníků. Ječmen obsahuje v buněčných stěnách β -glukan. Tento polysacharid je tvořen glukózovými podjednotkami spojenými vazbami $\beta(1\rightarrow3)$ a $\beta(1\rightarrow4)$ a je degradován během sladovacího procesu příslušnými β -glukanázami, enzymy pocházejícími z ječmene. Tyto enzymy jsou však velmi termolabilní a během hvozdní sladu a částečně i pivovarského rmutování dochází k výrazné ztrátě β -glukanázové aktivity. Štěpení β -glukanu je tak často neúplné, β -glukan přechází až do piva a vytvářením vysoce viskózních roztoků až gelů ztěžuje filtraci piva. Kromě toho se β -glukan nachází i v hotovém produktu po filtraci, kde může přispívat k tvorbě zákalu^{57,58}. Pro usnadnění filtračního procesu tak byly do kmenů pivovarských kvasinek úspěšně klonovány geny bakteriálních, plísňových i rostlinných β -glukanáz¹². Cantwell a kol.⁵⁹ naklonovali gen pro β -glukanázu z bakterie *Bacillus subtilis* pod kontrolu *ADH1* promotoru pivovarské kvasinky. Sekrece enzymu do média ale byla téměř zanedbatelná. Lancashire a Wilde⁶⁰ expimovali v pivovarské kvasince gen pro β -glukanázu z téhož bacilu ve fúzi se signální sekvencí α -faktoru pod kontrolou kvasničního *PGK1* promotoru. Transformanty účinně sekretovaly β -glukanázu do média a obsah β -glukanu v mladině se během kvašení snižoval. Enari a kol.⁶¹ naklonovali gen pro β -glukanázu z plísně *Trichoderma reesei* pod kontrolu *PGK1* promotoru. Specifická kvasničná signální sekvence nebyla zapotřebí, protože plísňové extracelulární enzymy jsou kvasinkami snadno exkretovány⁶². V mladině přítomný β -glukan byl účinně degradován a filtrace piva byly díky tomu výrazně snazší^{61,63}. Dále byly ve fúzi se signální sekvencí myší α -amylázy do kmene pivovarských kvasinek naklonovány termolabilní β -glukanázy ječmene. Jackson a kol.⁶⁴ umístili konstrukt pod kontrolu promotoru *ADH1*, Olsen a Thomsen⁶⁵ použili promotor *PGK1*. Pivo vyrobené pomocí takto transformovaných kvasinek mělo snížený obsah β -glukanu^{64,65}. V dnešní době, kdy se používají vysoce modifikované slady a zavádějí účinnější filtrační techniky, již ale není takto upravených kvasinek zapotřebí⁶⁶.

Závěr

Genetická modifikace pivovarských kvasinek je velmi náročný proces, podařilo se však získat řadu transformantů, jejichž použití může zefektivnit proces výroby piva. Optimalizace kvasných schopností produkčního kmene umožňuje úplnější zpracování cukerných složek mladiny a její hlubší prokvašení. Optimalizace flokulace usnadňuje separaci kvasničné biomasy od prokvašené mladiny a tím do jisté míry i následnou filtraci. Dalšího zlepšení filtrovatelnosti piva lze dosáhnout použitím kvasinek s β -glukanázovou aktivitou.

Literatura

1. Pretorius, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675-729 (2000).
2. Dequin, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 577-588 (2001).
3. Randez-Gil, F., Sanz, P. & Prieto, J.A. Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends Biotechnol.* **17**, 237-244 (1999).
4. Klein, C.J.L., Olsson, L., Roennow, B., Mikkelsen, J.D. & Nielsen, J. Alleviation of glucose repression of maltose metabolism by MIG1 disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4441-4449 (1996).
5. Nevoigt, E. et al. Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEMS Yeast Res.* **2**, 225-232 (2002).
6. Nakao, Y. et al. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Res.* **16**, 115-129 (2009).
7. Tamai, Y., Momma, T., Yoshimoto, H. & Kaneko, Y. Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast* **14**, 923-933 (1998).
8. Yamagishi, H. & Ogata, T. Chromosomal structures of bottom fermenting yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 341-353 (1999).
9. Joubert, R. et al. Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. *Yeast* **16**, 511-522 (2000).
10. Rainieri, S. et al. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3968-3974 (2006).
11. Dunn, B. & Sherlock, G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res.* **18**, 1610-1623 (2008).
12. Saerens, S.M.G., Duong, C.T. & Nevoigt, E. Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1195-1212 (2010).
13. Jespersen, L., Cesar, L.B., Meaden, P.G. & Jakobsen, M. Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 450-456 (1999).
14. Federoff, H.J., Eccleshall, T.R. & Marmur, J. Carbon catabolite repression in maltase synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J. Bacteriol.* **156**, 301-7 (1983).
15. Goldenthal, M.J., Vanoni, M., Buchferer, B. & Marmur, J. Regulation of MAL gene expression in yeast: gene dosage effects. *MGG, Mol. Gen. Genet.* **209**, 508-17 (1987).
16. Charron, M.J. & Michels, C.A. The naturally occurring alleles of MAL1 in *Saccharomyces* species evolved by various mutagenic processes including chromosomal rearrangement. *Genetics* **120**, 83-93 (1988).

17. Charron, M.J., Read, E., Haut, S.R. & Michels, C.A. Molecular evolution of the telomere-associated MAL loci of *Saccharomyces*. *Genetics* **122**, 307-16 (1989).
18. Vanoni, M., Sollitti, P., Goldenthal, M. & Marmur, J. Structure and regulation of multigene family controlling maltose fermentation in budding yeast. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **37**, 281-322 (1989).
19. Day, R.E., Higgins, V.J., Rogers, P.J. & Dawes, I.W. Characterization of the putative maltose transporters encoded by YDL247w and YJR160c. *Yeast* **19**, 1015-1027 (2002).
20. Vidgren, V., Ruohonen, L. & Londesborough, J. Characterization and functional analysis of the MAL and MPH loci for maltose utilization in some ale and lager yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7846-7857 (2005).
21. Vidgren, V., Huuskonen, A., Virtanen, H., Ruohonen, L. & Londesborough, J. Improved fermentation performance of a lager yeast after repair of its AGT1 maltose and maltotriose transporter genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2333-2345 (2009).
22. Day, R.E., Rogers, P.J., Dawes, I.W. & Higgins, V.J. Molecular analysis of maltotriose transport and utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5326-5335 (2002).
23. Dietvorst, J., Londesborough, J. & Steensma, H.Y. Maltotriose utilization in lager yeast strains: MTTI encodes a maltotriose transporter. *Yeast* **22**, 775-788 (2005).
24. Charron, M.J., Dubin, R.A. & Michels, C.A. Structural and functional analysis of the MAL1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3891-9 (1986).
25. Treitel, M.A. & Carlson, M. Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3132-6 (1995).
26. Klein, C.J.L., Olsson, L. & Nielsen, J. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of MIG1 in metabolic functions. *Microbiology (Reading, U. K.)* **144**, 13-24 (1998).
27. Bro, C., Knudsen, S., Regenber, B., Olsson, L. & Nielsen, J. Improvement of galactose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* through overexpression of phosphoglucomutase: Example of transcript analysis as a tool in inverse metabolic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6465-6472 (2005).
28. Randez-Gil, F. et al. Baker's yeast: challenges and future prospects. *Top. Curr. Genet.* **2**, 57-97 (2003).
29. Osinga, K.A., Beudeker, R.F., Van, d.P.J.B. & De, H.J.A. Recombinant yeast for more efficient sugar fermentation. 43 pp. (Gist-Brocades N. V., Neth. . 1989).
30. Pretorius, I.S. The genetic analysis and tailoring of wine yeasts. *Top. Curr. Genet.* **2**, 99-142 (2003).
31. Jones, M. & Pierce, J.S. Absorption of amino acids from wort by yeasts. *J. Inst. Brew.* **70**, 307-15 (1964).

32. Jauniaux, J.C. & Grenson, M. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur. J. Biochem.* **190**, 39-44 (1990).
33. Vandenbol, M., Jauniaux, J.C. & Grenson, M. Nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* PUT4 proline-permease-encoding gene: similarities between CAN1, HIP1 and PUT4 permeases. *Gene* **83**, 153-9 (1989).
34. Omura, F., Fujita, A., Miyajima, K. & Fukui, N. Engineering of yeast Put4 permease and its application to lager yeast for efficient proline assimilation. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **69**, 1162-1171 (2005).
35. Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H. & Delvaux, F.R. Yeast flocculation: What brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 197-205 (2003).
36. Verstrepen, K.J. & Klis, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* **60**, 5-15 (2006).
37. Donalies, U.E.B., Nguyen, H.T.T., Stahl, U. & Nevoigt, E. Improvement of *Saccharomyces* yeast strains used in brewing, wine making and baking. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **111**, 67-98 (2008).
38. Claro, F.B., Rijsbrack, K. & Soares, E.V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of ethanol, heat and osmotic stress. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 693-700 (2007).
39. Sampermans, S., Mortier, J. & Soares, E.V. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: The role of nutrients. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 525-531 (2005).
40. Soares, E.V. & Vroman, A. Effect of different starvation conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* **95**, 325-30 (2003).
41. Soares, E.V., Vroman, A., Mortier, J., Rijsbrack, K. & Mota, M. Carbohydrate carbon sources induce loss of flocculation of an ale-brewing yeast strain. *J. Appl. Microbiol.* **96**, 1117-1123 (2004).
42. Hansen, J. & Kielland-Brandt, M.C. Brewer's yeast. 503-526 (Technomic, 1997).
43. Stratford, M. Yeast flocculation: reconciliation of physiological and genetic viewpoints. *Yeast* **8**, 25-38 (1992).
44. Stratford, M. & Assinder, S. Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast* **7**, 559-74 (1991).
45. Masy, C.L., Henquinet, A. & Mestdagh, M.M. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*: inhibition by sugars. *Can J Microbiol* **38**, 1298-306 (1992).
46. Stratford, M. Yeast flocculation: calcium specificity. *Yeast* **5**, 487-96 (1989).
47. Caro, L.H.P. et al. In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1477-1489 (1997).

48. Harrison, P. et al. A small reservoir of disabled ORFs in the yeast genome and its implications for the dynamics of proteome evolution. *J. Mol. Biol.* **316**, 409-419 (2002).
49. Hahn, M.W., De, B.T., Stajich, J.E., Nguyen, C. & Cristianini, N. Estimating the tempo and mode of gene family evolution from comparative genomic data. *Genome Res.* **15**, 1153-1160 (2005).
50. Watari, J. et al. Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene FLO1. *Yeast* **10**, 211-25 (1994).
51. Bidard, F., Blondin, B., Dequin, S., Vezinhet, F. & Barre, P. Cloning and analysis of a FLO5 flocculation gene from *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* **25**, 196-201 (1994).
52. Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R. & Sone, H. Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. *J. Bacteriol.* **180**, 6503-6510 (1998).
53. Van, M.S.E. et al. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **9**, 178-190 (2009).
54. Govender, P., Domingo, J.L., Bester, M.C., Pretorius, I.S. & Bauer, F.F. Controlled expression of the dominant flocculation genes FLO1, FLO5, and FLO11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6041-6052 (2008).
55. Donalies, U.E.B. & Stahl, U. Phase-specific gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*, using maltose as carbon source under oxygen-limiting conditions. *Curr. Genet.* **39**, 150-155 (2001).
56. Verstrepen, K.J. et al. Late fermentation expression of FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **59**, 69-76 (2001).
57. Berghof, K. & Stahl, U. Genetic engineering of brewing yeast. *BioEngineering (Graefelfing, Fed. Repub. Ger.)* **7**, 27-30, 32 (1991).
58. Jin, Y.-L., Speers, R.A., Paulson, A.T. & Stewart, R.J. Effect of β -glucans and process conditions on the membrane filtration performance of beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **62**, 117-124 (2004).
59. Cantwell, B., Brazil, G., Hurley, J. & McConnell, D. Expression of the gene for the endo- β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Congr. - Eur. Brew. Conv.* **20th**, 259-66 (1985).
60. Lancashire, W.E. & Wilde, R.J. Secretion of foreign proteins by brewing yeasts. *Proc. Congr. - Eur. Brew. Conv.* **21st**, 513-20 (1987).
61. Enari, T.M. et al. Glucanolytic brewer's yeast. *Proc. Congr. - Eur. Brew. Conv.* **21st**, 529-36 (1987).
62. Hammond, J.R.M. Brewing microbiology 100 years after Pasteur. *Cerevisia* **21**, 59-62 (1996).
63. Penttilä, M.E., Suihko, M.L., Lehtinen, U., Nikkola, M. & Knowles, J.K.C. Construction of brewers' yeasts secreting fungal endo- β -glucanase. *Curr. Genet.* **12**, 413-20 (1987).

64. Jackson, E.A., Ballance, G.M. & Thomsen, K.K. Construction of a yeast vector directing the synthesis and release of barley (1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4)- β -glucanase. *Carlsberg Res. Commun.* **51**, 445-58 (1986).
65. Olsen, O. & Thomsen, K.K. Processing and secretion of barley (1-3,1-4)- β -glucanase in yeast. *Carlsberg Res. Commun.* **54**, 29-39 (1989).
66. Lee, Y.-T. & Bamforth, C.W. Variations in solubility of barley β -glucan during malting and impact on levels of β -glucan in wort and beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **67**, 67-71 (2009).

Vliv nanočástic železa na mikrobiální buňku

Pádrová K., Čejková A.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Úvod

V současné době nacházejí nanočástice železa nulové valence (nZVI) uplatnění především při řešení problematiky remediací kontaminovaných vod a půd. Díky svým silným redukčním vlastnostem jsou schopné redukovat řadu běžných kontaminantů, například chlorovaných uhlovodíků nebo iontů těžkých kovů (Karn a kol., 2011). Vysoká reaktivita těchto nanočástic však zároveň představuje limitaci, která souvisí s toxicitou tohoto materiálu vůči živým organismům. To může působit komplikace během sanačních procesů, kdy dochází k narušení autochtonní mikroflory, která se tak nemůže podílet na remediačním procesu. Toxicita nZVI souvisí především s jejich schopností indukovat vznik oxidativního stresu. nZVI katalyzují tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), mezi které také patří vysoce reaktivní hydroxylový radikál. Jeho interakcí s biologickými molekulami dochází k jejich poškození, které může vést až k buněčné smrti (Sevcu a kol., 2012). ROS vznikají v cytosolu jako produkty oxidace nZVI intracelulárním kyslíkem, ale také na buněčném povrchu. V důsledku blízkého kontaktu nZVI s buňkou dochází k adsorpci nanočástic na povrch. Vznikající ROS atakují lipidy buněčné membrány, jejichž peroxidací dochází k narušení její permeability, ztrátě integrity a zároveň je tak umožněn průnik většího množství nZVI do buňky (Kasemets a kol., 2009). V souvislosti s touto problematikou jsou studovány protektivní účinky huminových látek, které jsou součástí přirozené organické hmoty a mají schopnost vázat se na povrch buněk i nanočástic. Na základě mechanismu elektrostérické repulze je omezena adsorpce nanočástic na buněčný povrch (Li a kol., 2010). U některých typů huminových látek byly rovněž popsány antioxidační vlastnosti (Aeschbacher a kol., 2012).

Metody

Toxicita NANOFER 25 a její modulace

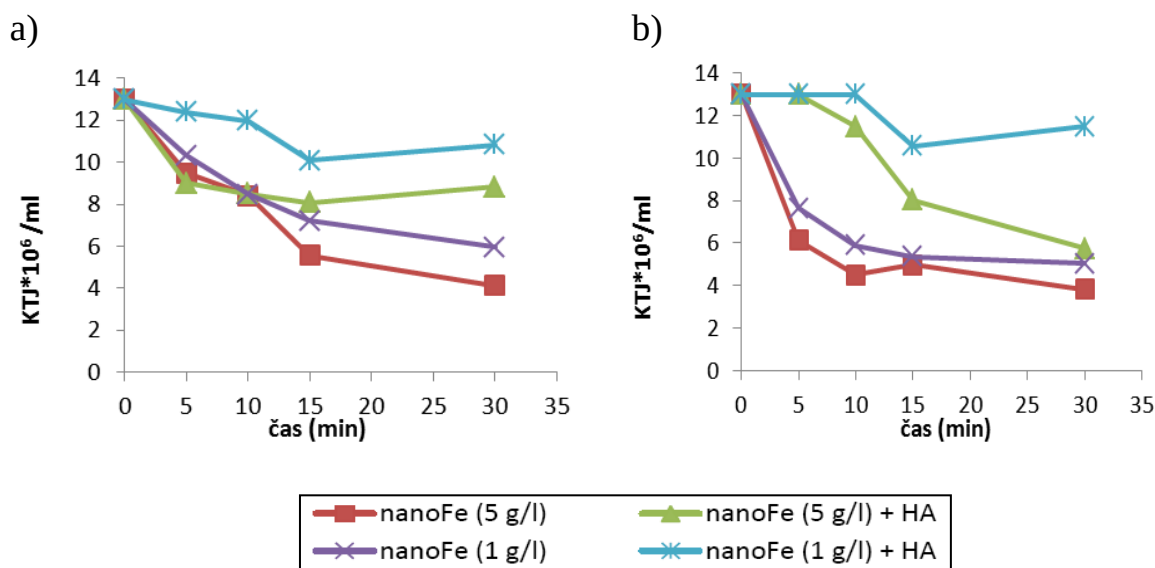
Byl zkoumán účinek komerčně dostupného preparátu povrchově nestabilizovaných nZVI NANOFER 25 (nanoFe) od firmy Nanoiron s.r.o. (Česká republika). Vliv nanoFe byl studován na modelovém eukaryotním mikroorganismu, kvasinka *Trichosporon cutaneum* (CCY 30.5.10). Protektanty vůči toxickému působení nanoFe byly použity huminové kyseliny (HA) SJ02b/oA a V00A1, u kterých byl již dříve prokázán pozitivní vliv. HA byly získány izolací z oxyhumolitu a distributorem je Výzkumný ústav anorganické chemie (VÚAnCh), a.s. Ústí nad Labem.

Buňčná populace byla vystavena účinkům studovaných látek vždy na konci exponenciální fáze buněčného růstu. Následně byly buňky odděleny centrifugací (9000g, 10 min) a promyty 0,15 mol/l fosfátovým pufrům (PBS). Odstředěné buňky byly resuspendovány v 5 ml PBS a použity k inokulaci (optická denzita $0,200 \pm 0,005$) připravených roztoků studovaných látek v 10 ml PBS. Během průběhu pokusu byly odebírány vzorky v intervalech 5, 10, 15, a 30 minut a počet životaschopných buněk byl stanoven pomocí metody KTJ (kolonie tvořící jednotku).

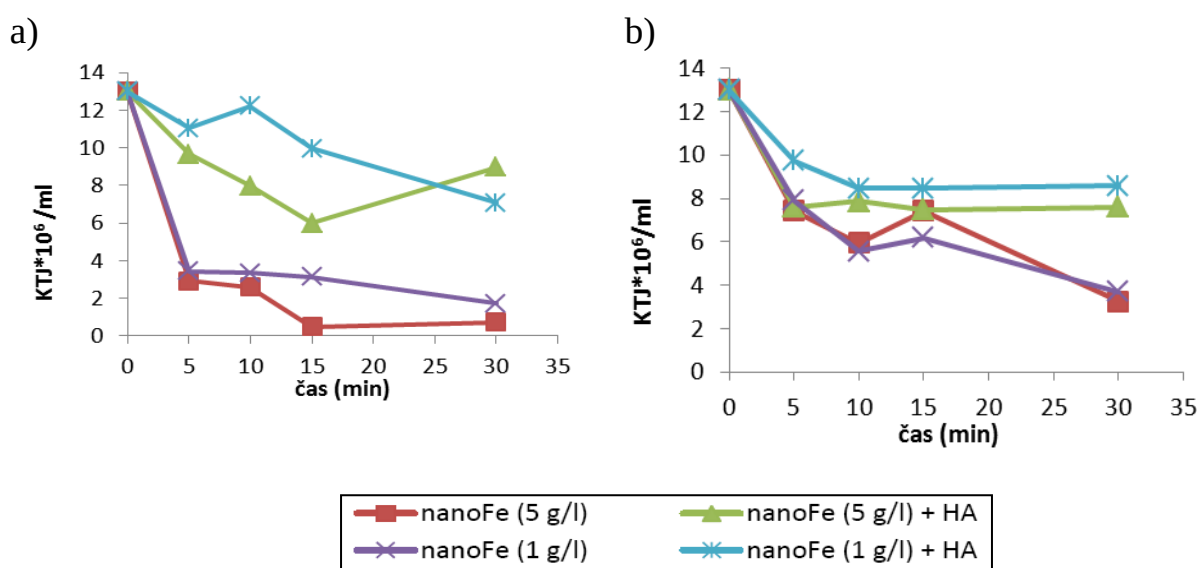
Cílem práce bylo zjistit, zda bude protektivita HA ovlivněna, pokud sledovaná buněčná populace bude vystavena účinkům nanočástic, které byly nejprve inkubovány v přítomnosti vybrané huminové látky, nebo bude nejprve inkubována v přítomnosti huminové látky buněčná populace a poté vystavena účinkům nanoželeza. Experimenty probíhaly vždy za stejných podmínek, použité koncentrace nanoFe byly 1 g/l a 5 g/l, koncentrace HA 0,3 g/l. Preinkubace buněk a nanoFe v přítomnosti HA (0,3 g/l) probíhala 15 min, poté byly buňky a nanočástice separovány (9000g, 10 min) a preinkubované buňky byly dvakrát promyty PBS.

Výsledky a diskuze

Změna pořadí přidání huminových látek měla výrazný vliv na ovlivnění protektivity. Preinkubace buněk s HA, měla pozitivní vliv na zachování životaschopnosti exponovaných buněk. Na obrázcích 1 (a, b) a 2 (a, b) jsou uvedeny grafy popisující závislost úbytku KTJ při současném působení nanoFe s HA a na preinkubované buňky. Nejvýraznější protektivní účinek se projevil u preinkubovaných buněk s HA SJ02b/oA (obr. 1 b) následně vystavených účinkům 1 g/l nanoFe. Největší pokles hodnoty KTJ byl zaznamenán po 15 minutách od počátku experimentu, 18 %. Poté se tato hodnota mírně zvýšila a na konci experimentu byl celkový počet životaschopných buněk nižší o 10 %. V přítomnosti nanoFe 1 g/l, byl pokles hodnoty KTJ po 30 minutách působení o 61 %. Rovněž v případě preinkubace buněk HA V00A1 (obr. 2 b) došlo k určitému omezení toxicity nanoFe. Při působení nanoFe 1 g/l došlo k poklesu hodnoty KTJ o 71 %, zatím co u populace preinkubované s HA V00A1 klesla hodnota KTJ po 10 minutách o 35 % a dále zůstala téměř konstantní. Snížení toxického působení nanoFe u preinkubované buněčné populace souvisí se schopností huminových látek vázat se na buněčný povrch a bránit tak vzájemným fyzickým interakcím nanočástice-buňka, které představují jeden z klíčových kroků v mechanismu toxického působení (Li a kol., 2010).

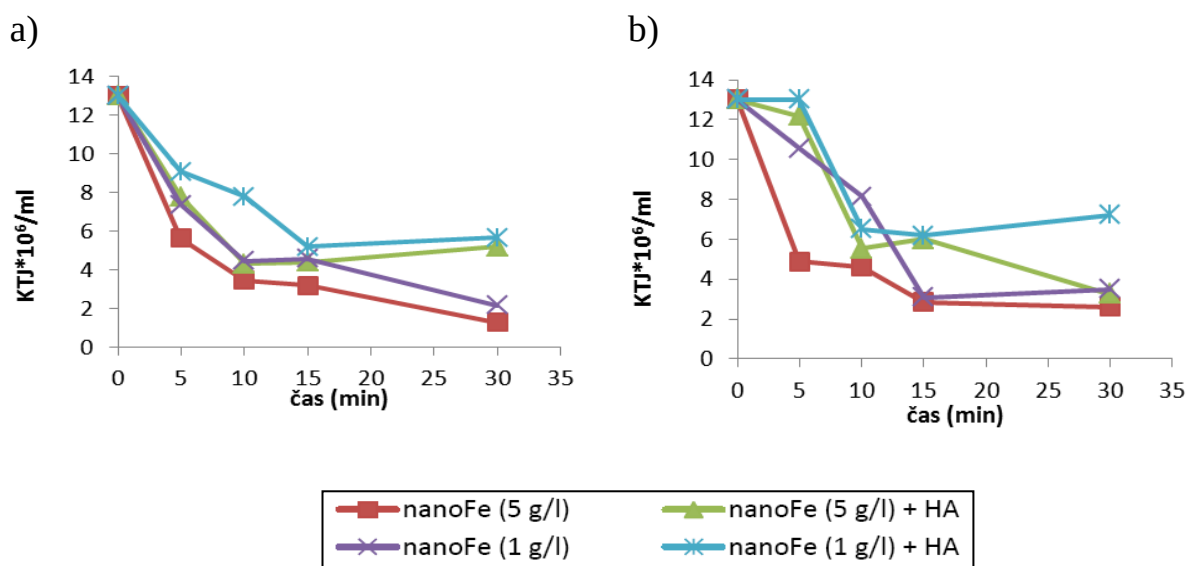


Obr. 1 a, b. Vliv huminové kyseliny (HA) Sjö2b/oA (0,3 g/l) na omezení toxického působení nZVI (1 g/l, 5 g/l). Protektivita HA při současném působení s nanoFe (a); Protektivita HA u preinkubovaných buněk (b).



Obr. 2 a, b. Vliv huminové kyseliny (HA) V00A1 (0,3 g/l) na omezení toxického působení nZVI (1 g/l, 5 g/l). Protektivita HA při současném působení s nanoFe (a); Protektivita HA u preinkubovaných buněk (b).

Při porovnání protektivity HA u preinkubovaných buněk s protektivitou HA při současném působení s nanoFe, nebyl zaznamenán výrazný rozdíl v počtu životaschopných buněk. Autoři Chen a kol. rovněž zaznamenali pozitivní vliv přítomnosti huminové látky na omezení toxicity nZVI. Ve své práci sledovali současné působení huminové látky a nZVI u gram-pozitivní bakterie *Bacillus subtilis* (Chen a kol., 2011).



Obr. 3a, b. Vliv huminové kyseliny (HA) (0,3 g/l) na omezení toxického působení nZVI (1 g/l, 5 g/l). Vliv preinkubace nanoFe s HA S02b/oA (a); Vliv preinkubace nanoFe s HA V00A1 (b).

Naopak preinkubace nanočástic s HA (obr. 3 a, b) neměla na omezení toxicity nanoFe výrazný vliv. Mírný protektivní účinek byl zaznamenán v případě HA S02b/oA (obr. 3 b). Při působení nanoFe 1 g/l klesla hodnota KTJ o 83 %. Po expozici buněčné populace modifikovanými nanoFe 1 g/l, byla tato hodnota nižší o 56%.

Modifikace nZVI huminovými látkami zvyšuje jejich stabilitu v prostředí a snižuje rychlost jejich aglomerace, která vede ke ztrátě vlastností daných jejich rozměry (Dong & Lo, 2013). Pravděpodobně vzhledem k této skutečnosti, samotná preinkubace nanoFe s HA neměla pozitivní vliv na protekci buněk vůči toxickému působení nanoFe.

Získané výsledky rozšiřují informace o protektivním působení huminových látek vůči toxickým účinkům nanočástic nulamocného železa.

Použitá literatura

Aeschbacher, M., Graf, C., Schwarzenbach, R. P., & Sander, M. (2012). Antioxidant properties of humic substances. *Environ Sci Technol*, 46(9), 4916-4925.

Dong, H., & Lo, I. M. (2013). Influence of humic acid on the colloidal stability of surface-modified nano zero-valent iron. *Water Res*, 47(1), 419-427.

Chen, J., Xiu, Z., Lowry, G. V., & Alvarez, P. J. (2011). Effect of natural organic matter on toxicity and reactivity of nano-scale zero-valent iron. *Water Res*, 45(5), 1995-2001.

Karn, B., Kuiken, T., & Otto, M. (2011). Nanotechnology and in situ remediation: a review of the benefits and potential risks. *Ciencia & Saude Coletiva*, 16(1), 165-178.

Kasemets, K., Ivask, A., Dubourgier, H. C., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol In Vitro*, 23(6), 1116-1122.

Li, Z., Greden, K., & Alvarez, P.J.J. . (2010). Adsorbed Polymer and NOM Limits Adhesion and Toxicity of Nano Scale Zerovalent Iron to *E. coli*. *Environ. Sci. Technol.*, 40(9), 3462-3467.

Sevcu, A., El-Temsah, Y. S., Joner, E. J., & Cernik, M. (2012). Oxidative Stress Induced in Microorganisms by Zero-valent Iron Nanoparticles (vol 26, pg 271, 2011). *Microbes and Environments*, 27(2), 215-215.

Biologická aktivita (toxicita) nanočástic a možnosti její modulace

Šíková M., Pádřová K., Čejková A.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Nanočástice nulmocného železa disponují silnými redukčními vlastnostmi, které jim umožňují degradovat široké množství kontaminantů. Nevýhodou nanočástic je jejich cytotoxicita, která je spojována se vznikem oxidativního stresu. Bylo zjištěno, že nanočástice mohou rovněž pozměnit morfologii některých mikroorganismů. Vzhledem k možnosti využití nanočástic v různých typech technologií, např. při bioremediaci podzemních vod, je velmi důležité znát jejich biologickou aktivitu. Experimentální část se zabývá studiem vlivu dvou typů nanočástic železa nulové valence (nestabilizovaná a stabilizovaná forma) na životaschopnost buněčné populace a na změnu buněčné morfologie kvasinky *Trichosporon cutaneum*. Vzhledem k cytotoxickým účinkům nanoželeza se hledají způsoby možné protekce mikroorganismů. Řešením by mohla být aplikace huminových látek, které jsou přirozenou součástí půdního prostředí a disponují schopností interagovat s mikroorganismy. Protektivní charakter byl sledován u dvou vybraných huminových látek a porovnán s kvasinkovou populací, která byla vystavena působení samotných nanočástic.

Heterotrofní kultivace jednobuněčných řas na alternativních zdrojích uhlíku a energie

Humhal T.¹, Brányik T.¹, Kaštánek P.²

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

²Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

1. Úvod

Jednobuněčné řasy a sinice neboli ve volné překladi mikrořasy (z ang. „microalgae“) představují pro biotechnologii velký potenciál. Vděčí tomu zejména velkou rozmanitostí produkujících metabolitů danou jejich ohromnou biodiverzitou. Většina z nich není zatím dostatečně prozkoumána a jejich předpokládaný potenciál zdaleka není využit. Množství druhů řas se odhaduje mezi 200 000 a několika milióny (Pulz a Gross, 2004). Většina biotechnologických aplikací jednobuněčných řas je zaměřena na autotrofní růst. Díky fotosyntetickému aparátu jsou schopné fotosyntézy, která jim umožňuje získávat zdroj uhlíku a energie ze vzdušného CO₂ za asistence světelné energie. Takto vedená kultivace řas probíhá ve fotobioreaktorech (FBR) (Carvalho a kol., 2006). Avšak některé jednobuněčné řasy jsou schopné i heterotrofního růstu, tj. získávat uhlík a energii z organických molekul či dokonce mixotrofního růstu, tj. současná kombinace obou předchozích režimů růstu. Heterotrofní růst nabízí několik výhod oproti autotrofnímu:

- vyšší růstová rychlost
- použití klasického bioreaktoru (snadnější ovládání, optimalizace a regulace)
- růst do větších koncentrací biomasy (nenastává problém vzájemného stínění buněk)
- vyšší produktivita kultivace
- není zapotřebí zdroj světelné energie.

Ovšem má i svoje limitace (Perez-Garcia a kol., 2011):

- omezení na zlomek druhů řas z celkové biodiverzity, které jsou schopné takto růst
- zvýšení provozních nákladů přidáním organického substrátu
- riziko kontaminace a kompetice s jiným mikroorganismy
- inhibice substrátem
- neschopnost produkce metabolitů indukovaných světlem.

Inhibice substrátem platí především pro batch kultivace. Při kultivaci v režimu fed-batch, kdy se zdroj uhlíku a energie dodává postupně, je efekt inhibice substrátem minimalizován a např. u rodů *Chlorella*, *Cryptocodinium* a *Galdieria* bylo dosaženo více než 100 g.l⁻¹ suché buněčné koncentrace (Bumbak a kol., 2011).

Při heterotrofním růstu dochází k aerobní respiraci, kdy je O₂ konzumován a CO₂ produkován. Nezávisle na zdroji uhlíku nebo druhu mikrořasy, růstová

rychlost se zvyšuje s růstem aerace a proto je dodávka O₂ klíčová (Perez-Garcia a kol., 2011). Jednobuněčné řasy vhodné pro heterotrofní kultivaci by měly mít tyto základní vlastnosti (Chen a Chen, 2006):

- schopnost růstu bez přítomnosti světla
- schopnost růstu na levném a snadno sterilovatelném médiu
- schopnost se rychle přizpůsobit novému prostředí
- schopnost odolávat hydrodynamickému tlaku v bioreaktoru.

2. Zdroj uhlíku a energie

Základní kultivační medium pro heterotrofní růst se oproti minerálnímu médiu pro autotrofní růst liší pouze přidáním organického substrátu – glukosa, glycerol, acetát, ethanol nebo jiné uhlíkové molekuly. Jako zdroj těchto substrátů může posloužit např. surový glycerol, odpadní vody, syrovátka nebo šťáva z čiroku cukrového (Liang a kol., 2010). Dále se do media může přidávat zdroj vitamínů a dusíku (např. kvasničný extrakt) pro lepší růst. Další zdroje uhlíku jako je sacharosa, laktosa a kyselina mléčná byly testovány, avšak s negativními výsledky růstu a produkce metabolitů (Perez-Garcia a kol., 2011).

2.1 Glukosa

U jednobuněčných řas byly pozorovány jen dvě cesty asimilace glukosy: Embden-Meyerhof- Parnas cesta (EMP) a Pentózofosfátový cyklus (PPP). Při heterotrofní kultivaci ve tmě probíhá v buňkách hlavně PPP, zatímco při světle EMP. Jednobuněčné řasy nejsou schopné glukosu asimilovat bez přítomnosti světla při anaerobních podmínkách (Perez-Garcia a kol., 2011).

Zajímavý alternativní zdroj glukosy pro heterotrofní kultivaci řas může představovat šťáva z čiroku cukrového. Tato C4 rostlina disponuje vysokou fotosyntetickou efektivitou a vysokým cukrovým výtěžkem. Liang a kol. (2010) použili tuto šťávu (50% koncentrát) jako substrát pro heterotrofní kultivaci *Schizochytrium limacinum* SR21 a dosáhli koncentrace 9,4 g.l⁻¹ suché biomasy přičemž obsah lipidů byl 73,4%. Z přítomných majoritních cukrů (glukosa, fruktosa a sacharosa) byla spotřebována na růst řas jen glukosa.

2.2 Glycerol

Glycerol je ekonomicky vhodný zdroj uhlíku a energie, kompatibilní a nemá na řasy žádné významné toxické účinky ani ve velkých koncentracích (Perez-Garcia a kol., 2011). Běžně se používá pro dlouhodobé uchovávání mikroorganismů při nízkých teplotách. Glycerol v dnešní době představuje nejzajímavější substrát pro heterotrofní kultivaci jednobuněčných řas především kvůli jeho nízké ceně. Cena glycerolu na světovém trhu se významně snížila v závislosti na dotačních programech výroby bionafty v USA a EU. Např. v roce 2004 byla cena glycerolu 2,2 \$.kg⁻¹ a v roce 2006 klesla na 0,22 – 0,44 \$.kg⁻¹ (Pyle a kol., 2008). Surový glycerol je totiž vedlejší produkt při výrobě bionafty vznikající transesterifikací. Složení surového glycerolu závisí na vstupní

surovině, způsobu transesterifikace a finální úpravě. Kvalitní surový glycerol obsahuje cca 80 – 86 % glycerolu a zbytek tvoří popeloviny (9%), voda (4 – 15%) a methanol (0,1 – 0,5 %) (ED & F Man, online). Dále může obsahovat použité hydroxidy, tukový podíl a netěkavé organické složky (J. Horák-HHcorporation, online). V případě využití surového glycerolu jako substrátu pro jednobuněčné řasy, záleží na jeho kvalitě, reps. na množství a složení příměsí. Především přítomný methanol má inhibiční účinky (Liang a kol., 2010).

Většina druhů řas, které využívají glycerol jako substrát, se přirozeně vyskytují ve slané vodě, kde je vyšší osmotický tlak. Při kultivaci na glycerolu dochází k zvýšení růstové rychlosti a indukují se specifické biochemické a strukturální změny ve fotosyntetickém systému jako je úbytek buněčného fytoeryhrinu, množství tylakoidů a velikosti částic fotosystému II (Perez-Garcia a kol., 2011). Glycerol vstupuje do buňky prostou difúzí a uvnitř buněk slouží jako osmoregulační molekula. Glycerol je první fosforylován pomocí ATP a glycerolfosfát je poté oxidován na triosafosfát. Aubert a kol. (1994) poukázali na to, že pentoso-fosfátová cesta je inhibována v případě, kdy je glycerol jediným zdrojem uhlíku.

Heterotrofní kultivace s glycerolem jako zdrojem uhlíku a energie byla demonstrována na těchto druzích: *Chlorella vulgaris* (Liang a kol., 2009), *Chlorella protothecoides* (O'Grady a Morgan, 2011) a *Schizochytrium limacinum* (Liang a kol., 2010b). O'Grady a Morgan (2011) za účelem produkce lipidů srovnávaly heterotrofní kultivaci řasy *Chlorella protothecoides* na glukose, surovém glycerolu a směsi glukosa a glycerol (9:1) a nejvyšší růstová rychlost a výtěžek vyšel při použití surového glycerolu. Glycerol může být také fotometabolizován (fotoheterotrofně) některými druhy řas, jako je *Agmenellum quadruplicatum*, *Goniotrichum elegans*, *Navicula pelliculosa*, *Nostoc sp.* Tyto řasy mohou jen asimilovat glycerol jako zdroj uhlíku při přítomnosti světla a bez externí dodávky CO₂ (Perez-Garcia a kol., 2011). *Nannochloropsis sp.*, *Rhodomonas reticulate* a *Cyclotella cryptica* jsou druhy, které preferují glycerol před glukosou a acetátem za použití mixotrofního metabolismu a dobře se přizpůsobují na změnu prostředí jako třeba přidáním nitrátů do media (Wood a kol., 1999).

2.3 Kyselina octová

Kyselina octová jako relativně dostupná a levná komodita se může využít v nízkých koncentracích jako substrát pro heterotrofní kultivaci některých jednobuněčných řas. Ve vysokých koncentracích je pro většinu mikroorganismů toxická, výjimkou je zelená řasa *Chlamydomonas mundana*, která vykazuje v její přítomnosti rychlý růst (Wood a kol., 1999). Udržení kyseliny octové při nízké koncentraci lze docílit fed-batch kultivací nebo pH-auxostat regulací (Wood a kol., 1999). Je známo několik příkladů růstu jednobuněčných řas na acetátu. *Euglena gracilis* kmen L efektivně využívá acetátu při světlených podmínkách, avšak nikoliv při tmě (Perez-Garcia a kol., 2011). Zatímco *E.*

gracilis varieta *bacillaris* využívá acetát ve tmě, když je jeho koncentrace pod 5 g.l⁻¹. Tento kmen je schopný asimilovat celou škálu substrátů, jako je acetát, sukcinát, ethanol, aminokyseliny, kys. máselnou. *Cryptothecodinium cohnii* heterotrofně kultivovaná (pH-auxostat regulace) pro účel produkce DHA rostla nejlépe při relativně vysoké koncentraci octanu sodného 8 g.l⁻¹ (Ratlidge a kol., 2001).

2.4 Ethanol

Stejně jako kyselina octová je ethanol v eukaryotech metabolizován přes acyl-coenzym A. Pro velkoobjemovou kultivaci je ethanol vhodnější zdroj uhlíku a energie než kyselina octová díky nižší ceně a také nižší korozivost (Swaaf a kol., 2003). Kultivace mikroskopických řas využívající ethanol jako zdroj uhlíku a energie byly testovány, avšak s negativními výsledky (Perez-Garcia a kol., 2011). Vyjimkou je *Cryptothecodinium cohnii*, která při heterotrofní fed-batch kultivaci na ethanolu vykazovala nejvyšší výtěžnost DHA ve srovnání s ostatními zdroji uhlíku a energie (viz. tab. III). Optimální koncentrace ethanolu byla 5 g.l⁻¹ (Swaaf a kol., 2003). Také *Euglena gracilis* vykazovala lepší výsledky při fed-batch kultivaci na ethanolou (viz. kap. 3.3).

3. Biotechnologické využití

3.1 Produkce lipidů

Několik druhů mikroskopických řas je schopných nadprodukce specifických mastných kyselin při relativně snadné změně fyzikálních nebo chemických podmínek jejich kultivačního média (Xu a kol., 2006, Xiong a kol., 2008). Kombinací této nadprodukce a bohaté biodiverzity představují jednobuněčné řasy významný zdroj neobvyklých a cenných lipidů a mastných kyselin pro mnohá průmyslová odvětví. Akumulace lipidů v buňkách závisí na různých podmínkách (Perez-Garcia a kol., 2011):

- teplota
- pH
- limitace určitého prvku (dusík, uhlík, fosfor nebo křemík)
- růstový režim (autotrofní, mixotrofní, heterotrofní)
- stáří kultury
- kmen

V tab. I je přehled vybraných heterotrofních kultivací jednobuněčných řas za účelem akumulace lipidů.

Chlorella protothecoides dokáže velice rychle akumulovat lipidy, roste na širokém spektru substrátů a je schopná růst na minimálním médiu a tím je rezistence proti kontaminaci větší než u ostatních druhů. Produktivita biomasy i lipidů je daleko vyšší než u ostatních autotrofních i heterotrofních mikrořas. Obsah lipidů v sušině dosahuje až 57 % při heterotrofním růstu, to je asi čtyřikrát více než při autotrofním růstu za podobných kultivačních podmínkách. Akumulace lipidů je indukovaná limitací dusíku. (Xu a kol., 2006, Xiong a kol.,

2008). Samozřejmostí je její netoxičita (podle FDA standardů - Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA) a tak se buněčný zbytek po extrakci lipidů může použít např. jako krmivo (O'Grady a Morgan, 2011).

Tab. I Obsah a produktivita lipidů u různých druhů jednobuněčných řas při heterotrofní kultivaci.

Druh	substrát	produktivita biomasy ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	obsah lipidů (% DCW ^a)	produktivita lipidů ($\text{mg l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Reference
<i>Chlorella protothecoides</i>	glukosa ^b	7,4	50,3	3722	Xiong a kol., 2008
<i>Chlorella protothecoides</i>	hydrolyzát z topinamburu	4,1	43	1700	Cheng a kol., 2009
<i>Schizochytrium limacinum</i>	surový glycerol	2,29	73,3	1680	Laing a kol., 2010b
<i>Schizochytrium limacinum</i>	šťáva z čiroku cukrového	1,87	73,4	1380	Laing a kol., 2010
<i>Chlorella protothecoides</i>	glukosa	2,2	57,8	1272	Xiong a kol., 2008
<i>Chlorella protothecoides</i>	glukosa	2,0	46,1	922	Xu a kol., 2006
<i>Chlorella protothecoides</i>	kukuřičný hydrolyzát	0,65	55,3	361	Xu a kol., 2006
<i>Chlorella saccharophila</i>	glukosa	0,165	37	58	Isleten-Hosoglu a kol., 2012
<i>Chlorella vulgaris</i>	glukosa	0,254	21	54	Liang a kol., 2009
<i>Chlorella vulgaris</i>	glycerol	0,091	34	31	Liang a kol., 2009
<i>Chlorella vulgaris</i>	acetát	0,079	36	29	Liang a kol., 2009

a sušina (dry cell weight)

^b fed-batch

3.1.1 Produkce bionafty

Řasy s vysokým obsahem lipidů mají značný potenciál pro výrobu bionafty. Jejich výtěžnosti jsou daleko vyšší než u konvenčních plodin (tab. II).

Olej z biomasy se získá extrakcí a dále v procesu transesterifikace reagují mezi sebou olej s nízkomolekulárním alkoholem většinou za homogenní katalýzy. Jako alkohol je nejvíce používá methanol, eventuálně ethanol. Jako homogenní katalyzátor slouží báze (KOH, NaOH) nebo kyselina (H_2SO_4). Existují i jiné metody transesterifikace pomocí heterogenní katalýzy, enzymatické katalýzy anebo bez katalyzátoru, kde methanol se nachází v superkritickém stavu. Produktem je bionafta (nízkomolekulární estery vyšších mastných kyselin s nízkomolekulárním alkoholem), která se používá jako náhrada za ropná paliva pro vznětové motory (Amin, 2009).

Tab. II Srovnání výtěžností oleje některých zdrojů (Chisti, 2007).

Zdroj	Výtěžnost (l.ha ⁻¹ .rok ⁻¹)	Potřebná plocha (Mha) ^a	Procent zemědělské plochy v USA ^a
kukuřice	172	1540	846
sója	446	594	326
brukev řepka	1190	223	122
dávivec (jatropha)	1892	140	77
kokosovník ořechoplodý	2689	99	54
palma olejná	5950	45	24
jednobuněčné řasy ^b	136900	2	1,1
jednobuněčné řasy ^c	58700	4,5	2,5

^a Pro splnění 50% spotřeby všech dopravních pohonných hmot v USA^b 70% hm. oleje v biomase^c 30% hm. oleje v biomase

Výzkum produkce bionafty je dnes nejdiskutovanější oblast v biotechnologii jednobuněčných řas. Většina zájmu se upíná na autotrofní kultivaci, avšak heterotrofní kultivace nabízí dobrý zdroj mastných kyselin s dlouhými řetězci („long-chain fatty acids“ LCFA), které jsou vhodné pro výrobu bionafty. Kandidáty pro komerční produkci jsou *Schizochytrium limacinum* a *Chlorella protothecoides* (až 55% lipidů v sušině). *Schizochytrium limacinum* dokáže produkovat kyselinu palmovou (C16:0) v množství ~40-60 % ve své sušině při kultivaci na glukose, fruktose nebo glycerolu (Chi a kol., 2007; Yokochi a kol., 1998). Pokusy byly vedeny také na surovém glycerolu pocházejícím z výroby bionafty a produkce kyseliny palmové nebyla výrazně omezena (Chi a kol., 2007).

3.1.2 Produkce Omega-3 polynenasycených mastných kyselin

ω-3 (nebo *n*-3) polynenasycené mastné kyseliny (ω-3 PUFA; z ang. „polyunsaturated fatty acids“) je skupina nenasycených mastných kyselin, jejichž společným rysem je dvojná vazba mezi uhlíky na třetím místě (počítáno od koncového methyly). Klinické a epidemiologické testy prováděné od 50. let minulého století přiřadily *n*-3 PUFA léčebný význam. Pozitivní vliv mají především na kardiovaskulární systém, centrální nervový systém a imunitu (Kris-Etherton a kol., 2004; Ruxton a kol., 2005). Nejvíce významní zástupci *n*-3 PUFA jsou kyselina eikosapentaenová (EPA; 20:5 *n*-3) a kyselina dokosahexaenová (DHA; 22:6 *n*-3). Lidské tělo je schopné tyto kyseliny v malé míře syntetizovat z α-linolenové kyseliny (18:3 *n*-3), která již je esenciální mastná kyselina, neboť živočichové neumí zavádět dvojně vazby dále než na devátém uhlíku. Tato konverze je však mnohem nižší než absorpce EPA a DHA

ze stravy a tak se dají považovat za esenciální. (Kris-Etherton a kol., 2004; Ruxton a kol., 2005).

Při heterotrofních podmínkách jednobuněčné řasy produkují převážně nasycené mastné kyseliny, zatímco při autotrofních podmínkách ve vysoké míře produkují polynenasycené mastné kyseliny. Výjimkou jsou rozsivky (Diatomeae) *Tetraselmis* sp., *Nitzschia laevis* a *Nitzschia alba*, kde produkce polynenasycených mastných kyselin je vyšší při heterotrofní kultivaci ve tmě než při autotrofní kultivaci (Perez-Garcia a kol., 2011).

V tab. III je přehled několika heterotrofních produkcí EDA a DHA jednobuněčnými řasy. Komerční produkce DHA dosáhla firma Martek Biosciences Corporation založená v roce 1985. Produkce je založená na heterotrofní kultivaci *Cryptocodinium cohnii* ve fermentorech o velikosti 800 až 2600 hl. Roční příjem společnosti v roce 2005 dosáhl 217 milionů \$. Od roku 2011 je Martek Biosciences Corporation součástí skupiny DSM (Life DHA, online).

3.2 Produkce karotenoidů

Karotenoidy jsou skupinou v tučných rozpustných přírodních pigmentů nalézající se hlavně v rostlinách, řasách a fotosyntetických bakteriích, kde hrají klíčovou roli v procesu fotosyntéza. Karotenoidy se také vyskytují v nefotosyntetizujících mikroorganismech, kde vykonávají ochrannou funkci proti záření a reaktivnímu kyslíku. Karotenoidy sčítají víc než 600 různých variací pocházejících ze 40 uhlíkatého polyenového řetězce. Polyenový systém jim zajišťuje charakteristické chemické vlastnosti a absorpci světla. Uhlovodíkové karotenoidy bez kyslíku se nazývají karoteny, zatímco s kyslíkem xantofyly. Komerčně nejdůležitější karotenoidy jsou β -karotein, astaxanthin a lutein. Tyto karotenoidy se využívají v potravinářství a kosmetice, kde slouží jako přírodní barviva anebo jako vitamínová aditiva, ve farmacii jsou zdrojem přírodních vitamínů a antioxidantů a v neposlední řadě se přidávají do krmiv pro drůbež, skoty, ryby a korýše (Del Campo a kol., 2007).

Tab. III Heterotrofní produkce eikosanpentaenové kyseliny (EPA) a dokosahexaenové kyseliny (DHA).

Druh	Zařízení	Způsob kultivace	substrát	buněčná koncentrace (g l ⁻¹)	EPA/DHA koncentrace (mg l ⁻¹)	EPA/DHA produktivita (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	Reference
EPA							
<i>Nitzschia alba</i>	Fermentor	Fed-batch	glukosa	45	1125	422	Kyle a kol., 1993; Barclay a kol., 1994
<i>Nitzschia laevis</i>	Fermentor	perfúzní	glukosa	40	1112	58,5	Wen a Chen, 2002
<i>Nitzschia laevis</i>	Fermentor	Fed-batch	glukosa	22,1	695	49,7	Wen a kol., 2002
<i>Nitzschia laevis</i>	Baňka	Batch	glukosa	9	280	28	Wen a Chen, 2001
<i>Ulkenia sp.</i>	Baňka	Batch	glukosa	4,7	14	6,5	Fan a kol., 2001
DHA							
<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	Fermentor	Batch	glukosa	48,1	13300	3300	Yaguchi a kol., 1997
<i>Schizochytrium mangrovei</i>	Baňka	Batch	glukosa	13,3	2779	1283	Fan a kol., 2001
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Fermentor	Fed-batch	ethanol	83	11700	1276	Swaaf a kol., 2003
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Baňka	Batch	kyselina octová	30	3528	864	Ratledge a kol., 2001
<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	Baňka	Batch	glukosa ^a	9,38	2360	470	Liang a kol., 2010
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	Fermentor	Batch	glukosa	27,7	1600	422	Swaaf a kol., 1999

^a šťáva z čiroku cukrového

Výzkum produkce karotenoidů heterotrofní kultivací mikroskopických řas se zaměřil na dva cenné karotenoidy: astaxanthin a lutein. V tab. IV. je přehled jejich kultivace.

V temných podmínkách je tvorba sekundárních karotenoidů většinou závislá na poměru uhlíku a dusíku přítomných v medium (Ip a Chen, 2005a). Zvýšení produktivity sekundárních karotenoidů lze docílit aplikací intermediátu (např. peroxyinitril) (Ip a Chen, 2005b) nebo působením oxidačního stresu (např. pomocí H₂O₂) (Ip a Chen, 2005a). Nejvyšší produktivity astaxanthinu dosáhl Ip a Chen (2005c) pomocí batch kultivace *Chlorella zofingensis* za použití glukosy jako zdroje uhlíku a peroxyinitrilu jako biosyntetického induktoru (Ip a Chen, 2005).

Obecně zelené řasy rodu *Chlorella* obsahují velké množství fotochemikálií při autotrofním růstu, při temných heterotrofních podmínkách tyto látky produkují daleko méně. Jednou z výjimek je druh *Chlorella regularis* S-50, který vykazuje vysokou růstovou rychlost a vysoký výtěžek fotochemických látek při temných heterotrofních podmínkách. (Sanaswa a Endo, 2004). Sanaswa a Endo (2004) dosáhli extrémně vysoké produktivity luteinu pomocí fed-batch kultivace heterotrofní synchronizované kultury (HSC) *Chlorella regularis* S-50. Navíc ve srovnání ze zelenou a žlutou zeleninou bylo dosaženo 10-50x více obsahu fotochemikálií (karotenoidy, chlorofyl, tokoferoly, ubichynon a další). (Sanaswa a Endo, 2004).

Tab. IV Produkce astaxanthinu a luteinu pomocí heterotrofních jednobuněčných řas.

Druh	Zařízení	Způsob kultivace	buněčná koncentrace (g l ⁻¹)	Astaxanthin/lutein koncentrace (mg l ⁻¹)	Astaxanthin/lutein produktivita (mg l ⁻¹ d ⁻¹)	Reference
Astaxanthin						
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Baňka	Batch ^a	10,2	10,3	0,7	Ip a Chen, 2005a
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Baňka	Batch ^b	7,5	11,8	1,3	Ip a Chen, 2005b
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Baňka	Batch ^c	7,3	12,6	1,4	Ip a Chen, 2005c
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Baňka	Batch		9	1,1	Kobayashi a kol., 1997
Lutein						
<i>Chlorella protothecoides</i>	Fermentor	Batch	19,6	83,8	11,3	Shi a kol., 2000
<i>Chlorella protothecoides</i>	Fermentor	Fed-batch ^d	46,9	225,3	22,7	Shi a kol., 2002
<i>Chlorella regularis</i> S-50	Fermentor	Fed-batch ^e	84	309,1	247,3	Sanaswa a Endo, 2004

^a poměr C/N = 180

^b působení reaktivní formy dusíku (RNS) (Peroxynitrit)

^c působení reaktivní formy kyslíku (ROS) (H₂O₂)

^d limitace N

^e limitace glukosou

3.3 Ostatní využití

Ogbonna a kol. (1998) vedli pokusy heterotrofní kultivace *Euglena gracilis* pro produkci α -tokoferolu (vitamín E). Při fed-batch kultivaci, kdy zdroj uhlíku a energie byl ethanol, dosáhli vysoké koncentrace buněk 39,5 g.l⁻¹. Obsah α -tokoferolu byl 1200 μ g.g buněk⁻¹, což je blízká hodnota dosažená při fotoautotrofní kultivaci. Dosažená produktivita 102 μ g.l⁻¹.h⁻¹ dokazuje, že heterotrofní kultivace *Euglena gracilis* má potenciál nahradit současné metody, kdy se získává α -tokoferol extrakcí z rostlinných olejů (Ogbonna a kol., 1998). Čištění odpadních vod autotrofně rostoucími jednobuněčnými řasami je již běžná aplikace. Růst za heterotrofních podmínek do dneška nebyl dostatečně testován.

Nicméně *Chlorella* sp. a *Scenedesmus* byly izolovány z odpadních vod, které byly udržovány v temných oxidačních nádržích (Perez-Garcia a kol., 2011). Jiný výzkum studoval růstové vlastnosti a využívání živin bakterie *Rhodobacter sphaeroides*, jednobuněčné řasy *Chlorella sorokiniana* a cyanobakterie *Spirulina platensis* na syntetických odpadních vodách s vysokou koncentrací acetátu a propionátu v heterotrofním a mixotrofním režimu. Heterotrofní kultivace *R. sphaeroides* a *C. sorokiniana* vykazovala nejlepší výsledky ve tmě, zatímco *S. platensis* na světle. Růst a odstraňování nutrientů ze syntetické odpadní vody nebyl nijak ovlivněn ani při takto vysokých koncentracích - acetát: 10 000 mg.l⁻¹, propionát: 1000 mg.l⁻¹, dusičnany: 700 mg.l⁻¹, fosfáty: 100 mg.l⁻¹ (Ogbonna a kol., 2000).

4. Závěr

Jednobuněčné řasy již řadu let představují zajímavou oblast biotechnologie, avšak v komerční oblasti jejich potenciál nebyl naplno využit. Je to především způsobeno vstupními náklady a složitostí konstrukce FBR. Heterotrofní kultivace jednobuněčných řas nabízí relativně nízké vstupní náklady a již prověřenou kultivaci v klasických fermentorech. Takto vedená kultivace se hodí jak pro vysoce hodnotné produkty (HVP - high value products) (EPA, DHA, astaxanthin, lutein), tak pro masovou produkci biomasy pro krmivářské a energetické účely. Důkazem toho je společnost Martek Biosciences Corporation, která již řadu let úspěšně působí na světovém trhu s DHA (Life'DHA, online). Produkce je zajištěna právě heterotrofní kultivací jednobuněčných řas *Cryptocodinium cohnii* (Life'DHA, online). V dnešní době má velký potenciál heterotrofní kultivace jednobuněčných řas na odpadním surovém glycerolu pocházející z výroby bionafty, která je EU a USA dotačně podporována. Tím se glycerol stal velice levnou komoditou. Nejvhodnějšími kandidáty jsou *Chlorella vulgaris* (Liang a kol., 2009), *Chlorella protothecoides* (O'Grady a Morgan, 2011) a *Schizochytrium limacinum* (Liang a kol., 2010b). Tyto řasy dokážou využít glycerol jako zdroj uhlíku a energie a zároveň akumulovat značné množství lipidové frakce ve své sušině. Tato lipidová frakce může být např. znovu využita v procesu esterifikace k výrobě bionafty.

5. Literatura

Amin S. (2009) Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. Energy Conversion and Management 50:1834-1840.

Aubert, S., Gout, E., Bligny, R., Douce, R., 1994. Multiple effects of glycerol on plant cell metabolism: phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. J. Biol. Chem. 269:21420-21427.

Barclay W.R., Meager K.M., Abril J.R. (1994) Heterotrophic production of long-chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 6:123–129.

Bumbak F., Cook S., Zachleder V., Hauser S., Kovar K. (2011) Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:31-46.

Carvalho A.P., Meireles L.A., Malcata F.X. (2006) Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnology Progress* 22:1490-1506.

Del Campo J.A., García-González M., Guerrero M. G. (2007) Outdoor cultivation of microalgae for karotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:1163-1174.

ED & F Man [online]. [7.10.2012], dostupné z: <http://www.edfman.de/cs/vyrobky/glycerin/>

Fan K.W., Chen F., Jones E.B.G., Vrijmoed L.L.P. (2001) Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27: 199–202.

Hu Q., Sommerfield M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. *Plant J* 54:621–639.

Chen G., Chen F. (2006) Growing phototrophic cells without light. *Biotechnology Letters* 28: 607–616.

Chen, G.-Q., Jiang, Y., Chen, F., 2007. Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*. *Food Chem.* 104:1580-1585.

Cheng Y., Zhou W.G., Gao C.F., Lan K., Gao Y., Wu Q.Y., (2009) Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84:777–781.

Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C., Chen, S., 2007. A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodieselwaste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochem.* 42:1537-1545.

Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294–306.

Ip P.F., Chen F. (2005) Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Proc. Biochem.* 40:3491–3496.

Ip P.F., Chen F. (2005a) Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Proc. Biochem.* 40:733–738.

Ip P.F., Chen F. (2005b) Peroxynitrite and nitryl chloride enhance astaxanthin production by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Proc. Biochem.* 40:3595–3599.

Ip P.F., Chen F. (2005c) Employment of reactive oxygen species to enhance astaxanthin formation in *Chlorella zofingiensis* in heterotrophic culture. *Proc. Biochem.* 40:3491–3496.

Isleten-Hosoglu M., Gultepe I., Elibol M. (2012) Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal* 61:11– 19.

J. Horák – HHcorporation [online]. [7.10.2012], dostupné z: <http://www.hhcorp.cz/glycerinova-faze/>

Kobayashi M., Kurimura Y., Tsuji Y. (1997) Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnol. Lett.* 19:507–509.

Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Binkoski A.E. (2004) Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. *Nutr. Rev.* 62:414–426.

Kyle D.J., Gladue R. (1993) Eicosapentaenoic acids and methods for their production. United States Patent 5244921, Sep. 14, 1993.

Liang Y., Sarkany N., Cui Y. (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* 31:1043–1049.

Liang Y., Sarkany N., Cui Y., Blackburn J. W. (2010) Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresource Technology* 101:6745-6750.

Life's DHA [online]. [30.09.2012], dostupné z: <http://store.martek.com/about-us.aspx>

O'Grady J., Morgan J.A. (2011) Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. *Bioprocess Biosyst Eng* 34:121–125.

Ogbonna J.C., Yoshizawa H., Tanaka H. (2000) Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 12:277-284.

Ogbonna J.C., Tomiyama S., Tanaka H. (1998) Heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* Z for efficient production of α -tocopherol. *Journal of Applied Phycology* 10:67–74.

Pulz O., Gross W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol, Biotechnol.* 65:635–648.

Pyle D., Garcia R.A., Wen Z. (2008) Producing Docosahexaenoic Acid (DHA)-Rich Algae from Biodiesel-Derived Crude Glycerol: Effects of Impurities on DHA Production and Algal Biomass Composition. *J. Agric. Food Chem.* 56:3933–3939.

Ratledge, C., Kanagachandran, K., Anderson, A.J., Grantham, D.J., Stephenson, J.C. (2001) Production of docosahexaenoic acid by *Cryptocodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. *Lipids* 36:1241-1246.

Ruxton C.H.S., Calder P.C., Reed S.C., Simpson M.J.A. (2005) The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutr. Res. Rev.* 18: 113–129.

Sansawa H., Endo H. (2004) Production of Intracellular Phytochemicals in *Chlorella* under Heterotrophic Conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98:437-444.

Shi X.M., Jiang Y., Chen F. (2002) High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnol. Prog.* 18:723–727.

Shi X.M., Zhang X.W., Chen F. (2000) Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme Microb. Technol.* 27:312–318.

Swaaf de M.E., Rijk de T.C., Eggink G., Sijtsma L. (1999) Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. J. Biotechnol. 70:185–192.

Swaaf ME, Pronk JT, Sijtsma L (2003) Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61:40–43.

Vazhappilly R., Chen F. (1998) Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Production Potential of Microalgae and Their Heterotrophic Growth. JAOCS 75:393-397.

Wen Z.Y., Chen F. (2001) Application of statistically-based experimental designs for the optimization of eicosapentaenoic acid production by the diatom *Nitzschia laevis*. Biotechnol. Bioeng. 75:159–169.

Wen Z.Y., Chen F. (2002) Perfusion culture of the diatom *Nitzschia laevis* for ultra-high yield of eicosapentaenoic acid. Proc. Biochem. 38:523–529.

Wen Z.Y., Chen F. (2003) Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. Biotechnol. Adv. 21:273–294.

Wood B.J.B., Grimson P.H.K., German J.B., Turner M. (1999). Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. J. Biotechnol. 70:175-183.

Xiong W., Li X., Xiang J., Wu Q. (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. Appl Microbiol Biotechnol, 78:29–36.

Xu H., Miao X., Wu Q. (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. J. Biotechnol. 126:499-507.

Yaguchi T., Tanaka S., Yokochi T., Nakahara T., Higashihara T. (1997) Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21. JAOCS 74:1431-1434.

Yokochi T., Honda D., Higashihara T., Nakahara T. (1998) Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:72-76.

Rešerše v rámci projektu BIORAF - Centrum competence pro výzkum biorafinací byla vytvořena s finanční podporou TA ČR

Produkce butanolu z odpadních materiálů

Zikmundová V., Jaisamut K., Patáková P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Aceton-butanol-ethanolová fermentace je proces, při kterém je substrát přeměňován bakteriemi rodu *Clostridium* na rozpouštědla aceton, butanol a ethanol. Nejvyšší náklady na jejich výrobu (až 70%) jsou skryty v ceně vstupní suroviny, a proto se hledají způsoby, jak využít suroviny levnější. To je důvod, proč byla naše pozornost zaměřena na produkci rozpouštědel (zejména butanolu jakožto nejcennějšího produktu) z kyselého hydrolyzátu slámy a glycerolu, který vzniká jako vedlejší produkt při produkci bionafty. Z pokusů vyšlo najevo, že kyselý hydrolyzát slámy není, vzhledem k vysoké koncentraci inhibujících sloučenin, vhodným substrátem pro výrobu butanolu. Naopak surový glycerol skýtá velký potenciál, během vsádkové kultivace s kmenem *Clostridium pasteurianum* DSM 525 se podařilo dosáhnout koncentrace butanolu 13,72 g/l při výtěžnosti butanolu vztažené na utilizovaný substrát 0,38 g/g.

Mikrobiální produkce rhamnolipidů a jejich využití

Ježdík R., Masák J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Surfaktanty jsou amfifilní molekuly obsahující hydrofilní a hydrofobní část molekuly. Amfifilní struktura umožňuje surfaktantům vázat se na fázové rozhraní dvou nemísitelných kapalin jako například olej/voda, vzduch/voda. Díky těmto vlastnostem jsou surfaktanty schopné snižovat povrchové a mezifázové napětí a tím tvořit mikroemulze dvou kapalin (Desai a kol., 1997). Chemické surfaktanty jsou převážně produkovány jako vedlejší produkty petrochemického průmyslu, převážně obsahují anionické alkylbenzen sulfonáty, nebo neionické alkylphenol ethoxyláty. Takovéto surfaktanty jsou velice rozšířené jako čisticí prostředky. Ačkoli jsou chemické surfaktanty účinné a levné mají negativní dopad na životní prostředí (Gutnick a kol., 2011). Biosurfaktanty jsou strukturně velice rozmanitá skupina povrchově aktivních látek produkována širokou škálou mikroorganismů. Oproti chemickým surfaktantům mají mnoho výhod, například nízká toxicita, vysoká degradabilita, stability v širším rozmezí pH a salinity, což umocňuje jejich potenciál pro využití v životním prostředí (Desai a Banat, 1997). Díky těmto vlastnostem se zvyšují možnosti aplikace biosurfaktantů v mnoha odvětvích (Sarkar a kol., 1989). Nejznámějšími zástupci bisurfaktantů jsou glykolipidy, které se skládají z mastných alifatických či hydroxyalifatických kyselin a jedné popřípadě více molekul sacharidu (Desai a Banat, 1997). Nejvýznamnějšími glykolipidy jsou rhamnolipidy. Rhamnolipidy jsou obvykle tvořeny dimerem 3-hydroxy mastné kyseliny spojené přes glykosidickou vazbu s jednou nebo dvěma molekulami rhamnosy (Soberon-Chavez a kol., 2005). Produkce rhamnolipidů je nejčastěji spojována s bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Mezi producenty však také patří například *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Nocardioidea* sp., *Pseudoxanthomonas*. Tyto bakteriální druhy mohou být potencionálními producenty rhamnolipidů, především *Enterobacter asburiae*, který na rozdíl od bakterie *Pseudomonas aeruginosa* není lidským patogenem (Rooney a kol., 2009). Produkce rhamnolipidů je silně závislá na environmentálních podmínkách, hlavně na zdrojích uhlíku a dusíku (Santos a kol., 2002).

Tento výzkum je zaměřen na produkci rhamnolipidů bakteriálními kmeny a na ovlivnění produkce těchto biosurfaktantů kompozicí kultivačního média a vedením kultivačního procesu.

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.

Použitá média**Tab. I.** Složení kultivačních médií pro produkci rhamnolipidů

	M1	M2	M3	M4	M5
KH ₂ PO ₄	0,17	0,34	4	0,5	3,4
K ₂ HPO ₄	0,13	0,26	6	1	4,4
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,71	2,84	-	-	-
NaNO ₃	-	-	3	4	15
NaCl	-	-	1,1	-	1,1
KCl	-	-	1,1	0,1	1,1
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	-	-	0,2	0,5	0,5
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	0,34	0,34	-	-	-
CaCl ₂	$1,96 \cdot 10^{-4}$	$1,96 \cdot 10^{-4}$	0,2	0,01	$9 \cdot 10^{-4}$
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	$6 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-2}$	0,01	$2,8 \cdot 10^{-4}$
kvasničný extract	-	-	-	0,1	0,5
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	-	$7,56 \cdot 10^{-6}$	-
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	-	-	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,54 \cdot 10^{-4}$	$1,45 \cdot 10^{-3}$
CoSO ₄ ·7 H ₂ O	-	-	$5 \cdot 10^{-3}$	-	-
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	-	-	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$8,4 \cdot 10^{-4}$
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	-	-	-	$9,82 \cdot 10^{-5}$	$1,25 \cdot 10^{-3}$
H ₃ BO ₃	-	-	-	$7,44 \cdot 10^{-5}$	-

Bylo upraveno pH média na hodnotu 7

Kultivace v bioreaktoru

Produkce rhamnolipidů probíhala v 3 l reaktoru Biostat A (B. Braun Biotech International) pracující se zařízením na recyklaci pěny. Pracovní objem byl 1,7 l. Reaktor byl aerován pomocí aeračního věnce, 0,25 VVM. Míchání bylo zajištěno dvěma rushtonovými turbínami, které byly nastaveny na otáčky 200

1/min. Kultivační podmínky v reaktoru byly kontrolovány kyslíkovou a pH elektrodou. Teplota byla udržována na 30,0°C, pomocí ohřívacího pásu. Počáteční pH kultivačního média bylo upraveno na pH 7,0 a během experimentu nebylo regulováno. Jako zdroj uhlíku byl zvolen citrát sodný (1%). Kultivační médium bylo zaočkováno 24 hodin starým inokulem na optickou densitu OD₄₀₀ 0,3.

Sledování produkce rhamnolipidu

Pro stanovení rhamnolipidu v kultivační směsi bylo použito vyjádření koncentrace rhamnosy, která je přímo úměrná koncentrace 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 absorpance je lineární v rozmezí 0 - 80 mg/l sacharidu.

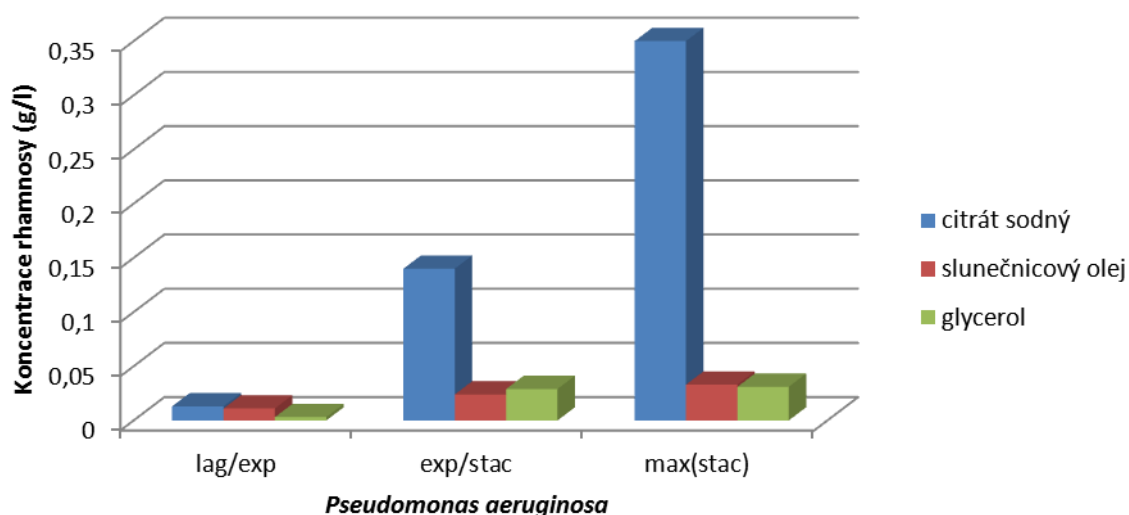
Izolace rhamnolipidu

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.

Výsledky a diskuze

Výběr zdroje uhlíku

Obr. 1. ilustruje vliv zdroje uhlíku na produkci rhamnolipidu bakterií *Pseudomonas aeruginosa* B59-188. Z grafu je patrné, že citrát sodný se jeví jako nejvýhodnější zdroj uhlíku pro produkci rhamnolipidu touto bakterií, ačkoli se jedná o hydrofilní zdroj uhlíku, což nekořesponduje s literaturou (Sim a kol., 1997). Na základě těchto výsledků byl citrát sodný zvolen jako zdroj uhlíku pro produkci rhamnolipidů v následných kultivacích.

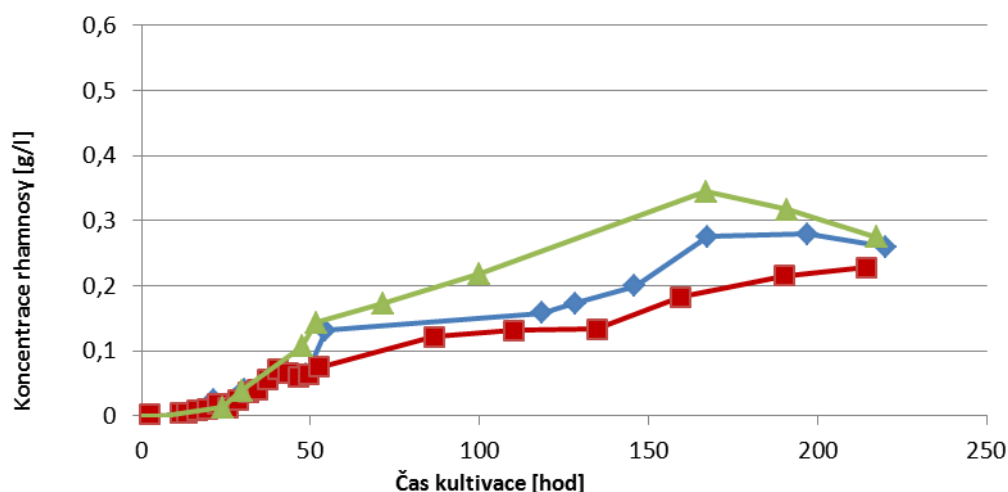


Obr. 1 Vliv zdroje uhlíku na produkci rhamnolipidu bakterií *Pseudomonas aeruginosa*

B59-188 v médiu M1 (tab. I.). Modrá - citrát sodný 20 g/l, červená - slunečnicový olej 20g/l, zelená - glycerol 20g/l. Kultivace v erlenmayerových baňkách, 30°C, 100 ot./min.

Produkce rhamnolipidu v závislosti na produkčním kmeni

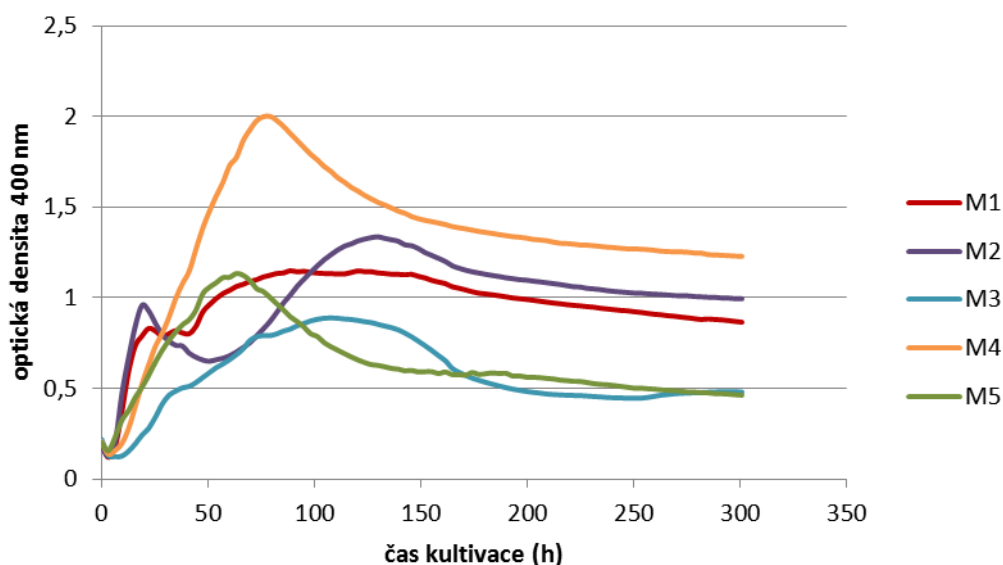
Produkce rhamnolipidu je závislá na druhu bakteriálního producenta. Dle grafického znázornění na obr. 2 je patrné, že *Pseudomonas aeruginosa* B59-188 dosahuje vyššího produkčního maxima (0,34 g/l) ve stejném časovém intervalu jako ostatní studované mikroorganismy. Nicméně je nutné uvažovat nad volbou producenta z hlediska patogenity, *Pseudomonas aeruginosa* je známým lidským patogenem a proto by produkce bakteriemi *Enterobacter asburiae* nebo *Acinetobacter calcoaceticus* mohla být vhodnou alternativou (Rooney, 2009 #21)



Obr. 2. 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 (tab. I.), zdroj uhlíku citrát sodný 20 g/l.

Vliv kompozice kultivačního média

Vliv kompozice kultivačního média na produkci rhamnolipidů byl sledován v mikrokultivačním zařízení BIOSCREEN C, kde byly sledovány růstové křivky (obr. 3) a po ukončení kultivace bylo stanoveno množství rhamnolipidu (koncentrace rhamnosy) (tab. II.). Obr. 3 ilustruje růstové křivky bakterie *Pseudomonas aeruginosa* v závislosti na složení kultivačního média především zdroje dusíku a fosforu (tab. I.). Porovnání růstových křivek (obr. 3) a výsledných koncentrací rhamnosy (tab. II.) zřetelně ilustruje, že produkce rhamnolipidů není závislá na růstu buněk. Přestože médium M4 je nejvhodnější médium pro dosažení maximálního množství buněk, produkce rhamnolipidu zdaleka nedosahuje koncentrací jako je tomu u média M5, kde je dosaženo koncentrace přibližně 3 g rhamnosy /l rhamnosy.



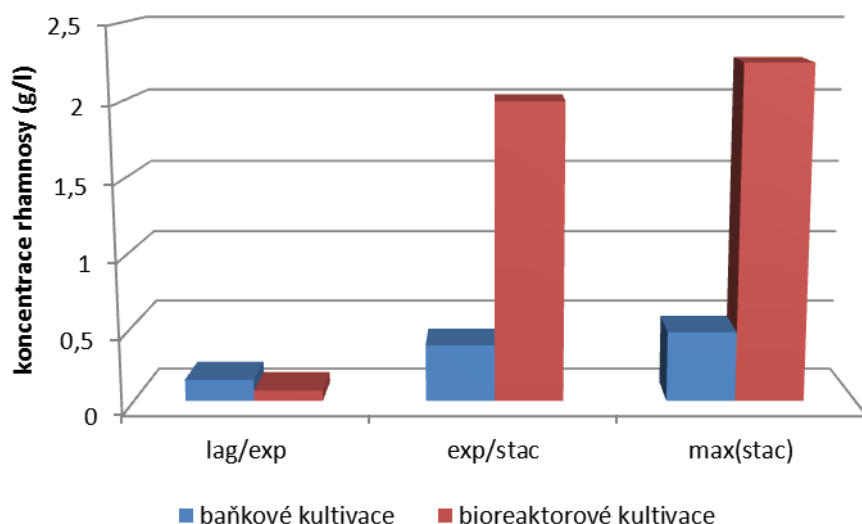
Obr. 3. Závislost růstu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* B59-188 na kompozici kultivačního média (tab. I.). Kultivace probíhala v mikrotitračním zařízení BIOSCREEN C, zdroj uhlíku citrát sodný 20 g/l.

Tab II. Koncentrace rhamnosy po ukončení kultivace v mikrotitračním zařízení BIOSCREEN C. složení médií viz tab. I.

Médium	konc. Rhamnosa (g/l)
M1	0,177
M2	0,221
M3	0,156
M4	0,356
M5	3,023

Vliv vedení kultivačního procesu

Z obr. 4 je patrné, že v počátečních stádiích kultivace (přechod z lag fáze do exponenciální fáze růstu) je produkce rhamnolipidů velmi nízká. Po dosažení konce exponenciální fáze se produkce výrazně navýší a maxima je dosaženo ke konci stacionární fáze. Obr. 4 současně prezentuje srovnání kultivace v baňkách a kultivace v bioreaktoru, kde se dosahuje několikanásobné koncentrace rhamnolipidu. Z těchto výsledků vyplývá, že produkce rhamnolipidů je výhodnější v bioreaktoru, jelikož uspořádání bioreaktoru umožňuje udržovat optimální kultivační podmínky (Mukherjee a kol., 2006) a udržet tak buňky ve stacionární fázi po delší dobu a tím dosáhnout vyšších koncentrací rhamnolipidu.



Obr. 4 Vliv vedení kultivačního procesu na produkci rhamnolipidů bakterií *Pseudomonas aeruginosa*.

Závěr

Produkce rhamnolipidů je závislá na řadě faktorů. Vedle vedení kultivačního procesu je jedním z hlavních faktorů volba vhodného zdroje uhlíku. Významná je také kompozice kultivačního média, především zdroj a množství dusíku a fosforu může značně ovlivnit výtěžek produkce rhamnolipidu. Všechny tyto faktory je nutné před produkcí rhamnolipidů uvážit s ohledem na zvolené bakteriální kmeny.

Literatura

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. H. (2009). Characterization of Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 329-345.
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47- &.
- Gutnick, D. L., & Bach, H. (2011). Biosurfactants. *Comprehensive Biotechnology*, 3, 699-715.
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24(11), 509-515.
- Rooney, A. P., Price, N. P., Ray, K. J., & Kuo, T. M. (2009). Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiol Lett*, 295(1), 82-87.

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

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

Sim, L., Ward, O. P., & Li, Z. Y. (1997). Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19(4), 232-238.

Soberon-Chavez, G., Lepine, F., & Deziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 718-725.

Vliv rhamnolipidů na tvorbu biofilmu jednobuněčných eukaryot

Holler J., Hošková M., Ježdík R., Masák J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Rhamnolipidy jsou povrchově aktivní přírodní látky produkované některými mikroorganismy. V této práci byly testovány směsi rhamnolipidů, které byly vyprodukovány bakteriemi *Enterobacter asburiae* (NRRL B-59189), *Acinetobacter calcoaceticus* (NRRL B-59190) a dvěma kmeny *Pseudomonas aeruginosa* (NRRL B-59184 a NRRL B-59188). Tvorba biofilmu, který často představuje zdroj perzistentní kontaminace, může být ovlivňována (potlačována) přidávkem různých aditivních látek. Vliv rhamnolipidů na počáteční fázi jeho tvorby, tedy na adhezi mikroorganismů, byl testován u zástupců tří kvasinek, a to konkrétně *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* a *Trichosporon cutaneum*. Všechny tři mikroorganismy jsou běžně přítomné na povrchu kůže a sliznic a všechny tři jsou podmíněnými patogeny. Hydrofobita materiálu je jedním z nejčastěji zmiňovaných faktorů ovlivňujících schopnost mikroorganismu přisednout na povrch a vytvořit na něm biofilm. Součástí prováděných experimentů byl také testován podíl rhamnolipidů na změně tohoto parametru u polystyrenových destiček.

Úvod

Mikrobiální surfaktanty jsou velmi rozmanitou skupinou amfifilních povrchově aktivních látek. Svou pozornost upoutaly díky své netoxické povaze, biodegradabilitě a možnosti produkce z obnovitelných zdrojů. Poprvé byly studovány v 60. letech, kdy byly použity jako rozpouštěcí činidlo nepolárních uhlovodíků. Od té doby se jejich využití značně rozšířilo. Odhaduje se, že celková produkce syntetických a biologických surfaktantů v USA dosahuje 5 milionů tun za rok (Cameotra a Makkar, 2004).

Nesporné výhody biosurfaktantů, jako třeba mírné produkční podmínky, biodegradabilita, nízká toxicita a kompatibilita s přírodou, je předurčily k využití nejen v potravinářském, farmaceutickém nebo kosmetickém průmyslu, ale i v ochraně životního prostředí a při bioremediacích.

Rhamnolipidy jsou povrchově aktivní látky. Mají dvě hydrofilní polární části, karboxylovou skupinu, která jim dává anionický charakter, a rhamnosylovou, která přispívá k objemnosti polární části molekuly. Hydrofobní mastné kyseliny mohou být přítomny ve dvou kopiích a většinou se jedná o β -hydroxydekanové kyseliny, které jsou spojeny esterovou vazbou a k cukerné složce jsou připojeny glykosidickou vazbou. Pokud kultivujeme producenta rhamnolipidů na glukose, produkuje směs několika kongenerů rhamnolipidů. Kultivace stejného

mikroorganismu, ale na rozdílném kultivačním mediu, povede k produkci směsi rhamnolipidů o rozdílném složení (Hošková a kol., 2013).

V poslední době byly rhamnolipidy předmětem velkého zájmu. V současnosti je většina povrchově aktivních látek chemického původu, nicméně se zvyšujícím se zájmem o životní prostředí, roste i zájem o biologicky degradovatelné látky („zelené chemikálie“), mezi které rhamnolipidy patří.

Biofil je předmětem intenzivního zájmu v poslední době, neboť je zdrojem perzistentní kontaminace, což v medicíně zapříčiňuje chornická těžko léčitelná onemocnění.

Fyzikálně-chemické vlastnosti povrchů mohou být modifikovány změnou složení materiálu nebo teoreticky snazší prekondicionací těchto materiálů pomocí surfaktantů. Touto metodou dochází k zabránění adheze buněk na povrch, tedy inhibici tvorby biofilmu v raných stádiích. Zezzi do Valle Gomes a Nitschke (2012) dokázali touto technikou dosáhnout až 68% inhibice adheze *Listeria monocytogenes* na povrch polystyrenových destiček.

Metodika

Vliv prekondicionace pevného povrchu na adhezi mikroorganismů byl testován na kvasinkách *Candida krusei* DS 39, *Candida parapsilosis* DS 15, které byly izolovány ze vzorku potravin a *Trichosporon cutaneum* CCY 30.5.10, která pochází ze sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Krátkodobě byly všechny mikroorganismy uchovány v Petriho miskách se sladidlovým agarem při 10 °C. Biomasa k samotnému testování byla nejprve kultivována 24 hodin na komplexním (sladidlovém) mediu. Poté byla odstředěna, propláchnuta minimálním mediem, ve kterém byla následně dalších 24 hodin kultivována. Jako jediný zdroj uhlíku a energie byla použita glukosa (10 g/l).

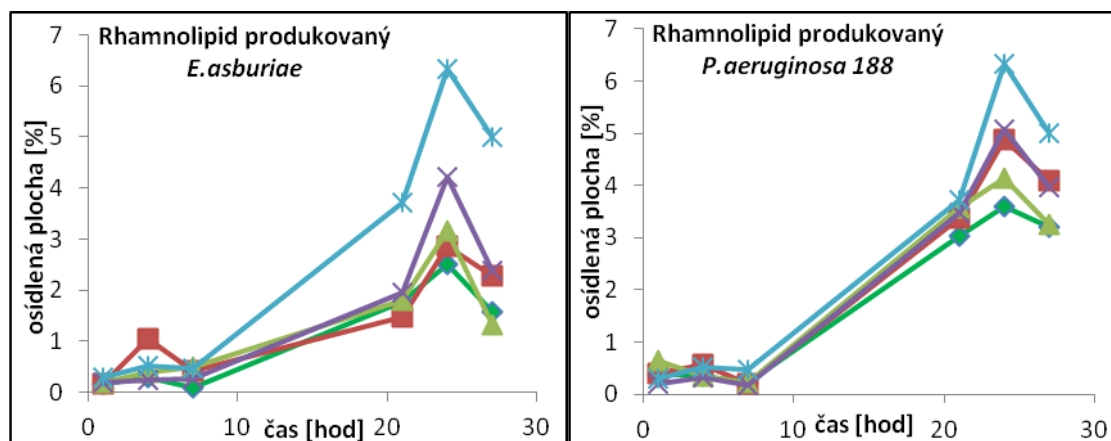
Testované rhamnolipidy byly produkovány čtyřmi produkčními mikroorganismy, konkrétně *Enterobacter asburiae* (NRRL B-59189), *Acinetobacter calcoaceticus* (NRRL B-59190) a dvěma kmeny *Pseudomonas aeruginosa* (NRRL B-59184 a B-59188). Všechny zmíněné produkční mikroorganismy produkují vždy směs několika kongenerů, přičemž tyto směsi nebyly separovány na jednotlivá chemická individua.

Prekondicionace byla testována v polystyrenových mikrotitračních destičkách. Inkubace s roztoky rhamnolipidů byla prováděna při 30 °C a po dobu 24 hodin. Testovány byly 0,5% , 0,25% 0,125% roztoky rhamnolipidů a KMK jednotlivých roztoků.

Míra adheze byla snímána a vyhodnocována systémem Cellavista – inverzní automatizovaný mikroskop s fotoaparátem a dodávaným softwarem pro multiparametrickou obrazovou analýzu. Buněčná suspenze byla v minimálním mediu s glukosou (10 g/l) v jamkách ponechána nanejvýš 27 hodin. V jednotlivých intervalech měření (1., 4., 7., 21., 24., 27. hodina) byla suspenze odstraněna a adherované buňky byly snímány a vyhodnocovány systémem

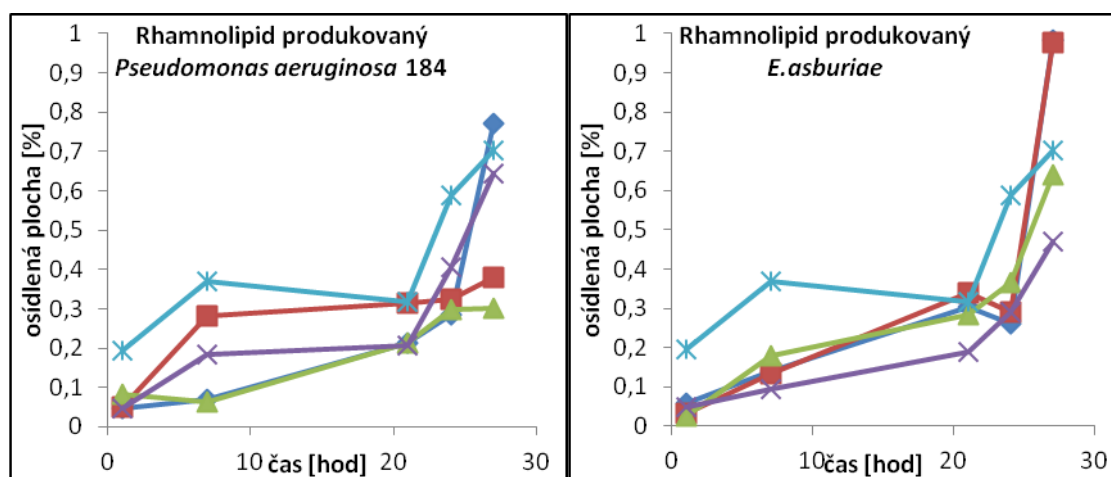
Cellavista, sledovým parametrem byla osídlená plocha. Pokus byl prováděn v 5 paralelách. Na získaná data byl aplikován Dixonův test extrémních odchylek vylučující odlehlé hodnoty.

Výsledky



Obr. 1: Vliv prekondicionace povrchu pomocí roztoků rhamnolipidů na adhezi kvasinky *Candida krusei* — 0,50% — 0,25% — 0,13% — KMK — bez RL

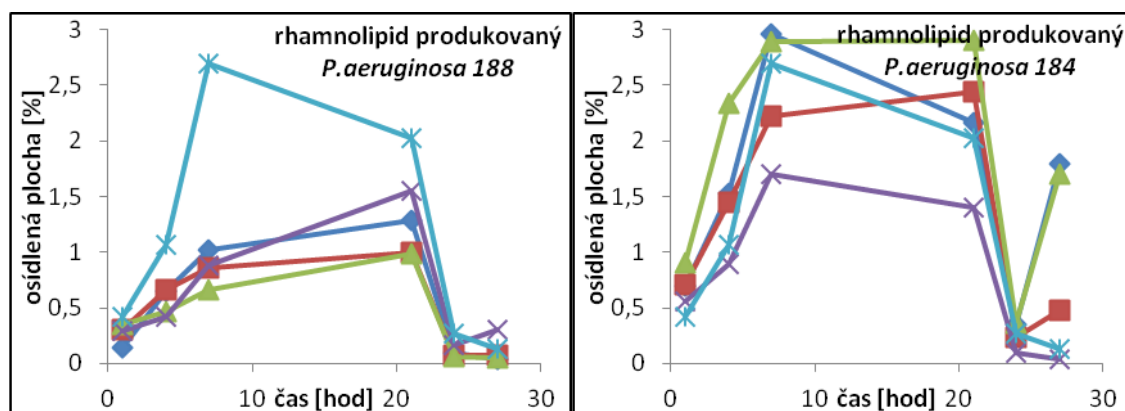
Zde jsou vyobrazeny příklady vývoje osídlené plochy pro kvasinku *Candida krusei*, která v první polovině měření (1., 4. a 7. hodina měření) adherovala velmi málo, čemuž odpovídá osídlená plocha, která nepřesáhla 1 % osídlené plochy. Po uplynutí 21 hodin došlo k výraznému nárůstu osídlené plochy, přičemž maximum bylo dosaženo ve 24. hodině měření pro kontrolní pokus. Všechny použité koncentrace roztoků rhamnolipidů adheze snižovaly.



Obr. 2: Vliv prekondicionace povrchu pomocí roztoků rhamnolipidů na adhezi kvasinky *Trichosporon cutaneum* — 0,50% — 0,25% — 0,13% — KMK — bez RL

Kvasinka *Trichosporon cutaneum* adherovala ze všech testovaných mikroorganismů nejméně, její maximální osídlená plocha dosahuje hodnot

kolem 1 %. V závěru měření byl pozorován nárůst osídlené plochy přibližně o 200-300 %.



Obr. 3: Vliv prekondicionace povrchu pomocí roztoků rhamnolipidů na adhezi kvasinky *Candida parapsilosis* — 0,50% — 0,25% — 0,13% — KMK — bez RL

Adheze kvasinky *Candida parapsilosis* byla inhibována v průběhu celého měření, nejvýraznější vliv vykazovala prekondicionace povrchu pomocí rhamnolipidu produkovaného *Pseudomonas aeruginosa* 188, která snížila osídlenou plochu přibližně o 50-70 %. Vliv prekondicionace na adhezi závislý na koncentraci vykazovala směs produkovaná *Pseudomonas aeruginosa* 184, kdy nízké koncentrace adhezi inhibovaly, zatímco vyšší ji podporovaly.

Diskuze

Byl testován vliv prekondicionace povrchu pomocí roztoků rhamnolipidů na adhezi mikroorganismů. Pro počáteční fázi tvorby biofilmu je charakteristické volné přichycení buněk na povrchu – adheze buněk pomocí van der Waalových sil. Prekondicionace povrchu pomocí roztoků rhamnolipidů může vést ke změně hydrofobity daného povrchu, což v důsledku může zapříčinit slabší adhezi mikroorganismů na daný povrch.

Jednotlivé testované koncentrace roztoků rhamnolipidů neměly výrazný vliv na adhezi kvasinky *Candida krusei* v jejích počátečních fázích tvorby biofilmu, oproti kontrole byl sledován minimální rozdíl v osídlené ploše. Po 21. hodině došlo k nárůstu osídlené plochy až na maximum 6 % v případě kontroly. Všechny testované koncentrace osídlenou plochu snížily, nicméně bez prokazatelné závislosti míry inhibice adheze na koncentraci použitého rhamnolipidu.

Kvasinka *Candida parapsilosis* adherovala v porovnání se svou příbuznou kvasinkou *Candida krusei* přibližně v poloviční míře. Vlivy jednotlivých směsí rhamnolipidů měly podobný průběh. Adhezi inhibovaly v průběhu celé kultivace této kvasinky. Jedinou výjimkou byl rhamnolipid produkovaný *Pseudomonas aeruginosa* 184, který jako jediný testovaný při použití vyšších koncentrací adhezi také podpořil. Toto pozorování je v souladu s výsledky měření

hydrofobity destiček po předchozí prekondicionaci rhamnolipidy, kdy při použití rhamnolipidu RL-PA184 došlo k výraznému snížení hydrofobity povrchu. Tato vlastnost materiálu může být jedním z možných faktorů ovlivňující adhezi mikroorganismu na daný povrch.

Použitá literatura

Cameotra S. C., Makkar R. S. (2004): Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules; *Current Opinion in Microbiology* 7:262-266

Hošková M., Schreiberová O., Ježdík R., Chudoba J., Masák J., Sigler K., Řezanka T. (2013). Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Acinetobacter* and *Enterobacter* bacteria; *Bioresource Technology* 130:510-516

Zezzi do Valle Gomes M., Nitschke M. (2012): Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria; *Food Control* 25:441-447

Vliv magnetického pole na reprodukční a metabolickou aktivitu jednobuněčného organismu

Vaicenbauerová L., Pospíšilová D., Jirků V.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo navrhnout elektromagnetický obvod umožňující expozici statické nebo recyklující (bakteriální / kvasinkové) buněčné populace homogennímu magnetickému poli, které je definováno hodnotou magnetické indukce (mT). V případě buněčných populací *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas fluorescens* a *Trichosporon cutaneum* exponovaných EMP (50mT; 100mT) byla sledována stimulace růstové utilizace fenolu (0.3 g/l - 1.2 g/l), resorcinolu, katecholu, p-chlorofenolu, hydrochinonu, p-nitrofenolu, bisfenolu A a p-hydroxybenzoátu (0,3 g /l), s nálezem, že možná stimulace je výrazně substrátově-specifická. Utilizace těchto substrátů byla rovněž sledována pod binárním vlivem EMP / dvojmocný kationt (Ca^{2+} 0,026 g/l, Al^{3+} 0,002 g/l a Fe^{2+} 0,06 g/l). Vzhledem ke skutečnosti, že buněčné upoutání vždy nějak ovlivňuje funkci a vlastnosti biodegradérů a přirozené biofilmy jsou častou formou jejich aplikace, byl (s použitím buněčných populací uvedených kmenů) sledován vliv EMP na vývoj modelového biofilmu (kvantifikace kolonizace skleněného nosiče byla provedena obrazovou analýzou). Nalezená stimulace buněčné adhezenční dispozice byla konfrontována s výsledkem analýzy hydrofobity a kompozice buněčného povrchu.

Fyzikální a biologické faktory ovlivňující přepěňování piva

Vitoušová K., Novák P., Poštulková M., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Gushing je negativní jev, při kterém dochází ke spontánnímu přepěňování piva po otevření lahve či plechovky. I přes dlouholetý výzkum se stále nedaří výskyt gushingu jednoznačně předpovědět ani jej potlačit. Cílem práce bylo nejprve nalézt jednoduchou gushingově-aktivní matici, na které by bylo možno pozorovat vliv fyzikálních faktorů a vliv přídavku chmelových látek. Jako nejvhodnější matrice byl stanoven roztok hovězího sérového albuminu o koncentraci 0,5 g/l. Albumin v tomto roztoku tvoří micely, které se chovají jako nukleační zárodky pro vznik gushingové pěny. Na tomto roztoku byl proměřen vliv jeho pH a supresivní vliv zvýšeného tlaku nad roztokem na gushing. Dále byl zkoumán vliv hořkých látek chmele a linaloolu na přepěňovaný objem. Veškeré měření probíhalo ve speciálně navržené aparatuře složené z tlakové kolony, rychloběžné kamery a tlakové sondy.

Mikrobní produkce jantarové kyseliny a dalších kyselin citrátového cyklu u kvasinek druhu *Yarrowia lipolytica* a vybraných anaerobních bakterií

Kvasničková E., Patáková P., Čížková H., Rychtera M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Ke studiu byly vybrány čtyři kmeny kvasinky *Yarrowia lipolytica* ze sbírky Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha a dále dva kmeny anaerobních kapnofilních bakterií *Actinobacillus succinogenes* a *Basfia succiniciproducens* z Německé sbírky mikroorganismů (DSMZ). S těmito mikroorganismy byly provedeny fermentační zkoušky jak v Erlenmeyerových baňkách, tak i v laboratorním bioreaktoru na produkci jantarové kyseliny a dalších kyselin citrátového cyklu. U kvasinky *Yarrowia lipolytica* byl použit jako uhlíkatý zdroj glycerol a etanol, anaerobní bakterie využívaly jako substrát glukosu. Zkoušky s kvasinkou *Yarrowia lipolytica* však neprokázaly zvýšenou produkci jantarové (max. 4,45 g/L) a α -oxoglutarové kyseliny (max. 4,78 g/L). Nejvyšší koncentrace jantarové kyseliny, 19,47 g/L, bylo dosaženo u bakterie *Actinobacillus succinogenes*. Bakterie *Basfia succiniciproducens* byla zkoušena jen informativně, jantarovou kyselinu produkuje, ale nedosahuje zatím hodnot dosažených u bakterie *A. succinogenes*. Zde bude nutné se věnovat optimalizaci složení média a podmínek kultivace.

Příprava vybraných ligandů pro testování galaktosyltransferas pomocí SPR

Kašáková M., Hlaváčková M., Moravcová J.

Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Měření rezonance povrchového plazmonu je nezastupitelná metoda pro studium interakcí proteinů s ligandy, ale málo se využívá pro sledování selektivity enzymů. Cílem této diplomové práce bylo připravit 6-O-(ω -amino)alkylderivát d-galaktopyranosy, který by bylo možno ukotvit na povrchu zlaté destičky pro testování substrátové specifity galaktosyltransferas. Zvolena byla struktura 6-O-(ω -amino)alkylderivátu d-galaktopyranosy. Výchozí 6-brom-6-deoxy-1,2;3,4-di-O-isopropyliden-d-galaktopyranosa byla připravena ve dvou krocích z d-galaktosy a byla vyzkoušena nukleofilní substituce benzyl-N-(5-hydroxypentyl)karbamátem za různých podmínek. Výtěžek této reakce byl ale velmi nízký a následné odstranění chránicích skupin nebylo selektivní. Další zkoušenou výchozí látkou byl methyl-3,4-O-cyklohexyliden-(α) β -d-galaktopyranosid, ale při jeho přípravě podle publikovaného postupu byl izolován i 2,3-O-isomer v nezanedbatelném výtěžku. Optimální strategie nakonec vycházela z methyl- α -d-galaktopyranosidu, který byl selektivně silylován v poloze 6, sekundární hydroxylové skupiny byly poté alkylovány 4-methoxybenzylbromidem a reakcí s tetrabutylamonium fluoridem byla uvolněna hydroxylová skupina v poloze 6. Takto připravený nukleofil byl úspěšně použit pro substituci brómu v benzyl-N-(5-brompentyl)karbamátu za katalýzy hydridem sodným v orientačním pokusu.

***Alicyclobacillus* – kontaminant ovocných nápojů a původce jejich kažení**

Strejc J., Vondra V., Šiříšťová L., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Obchod s ovocnými nápoji zaujímá v dnešním světě významnou část trhu. Pro výrobce je proto žádoucí zamezit mikrobiální kontaminaci výrobku, která vede jak k nespokojenosti zákazníků, tak i ke značným ekonomickým ztrátám. Ačkoli jsou ovocné nápoje díky nízkému pH odolnější vůči mikrobiální kontaminaci oproti jiným potravinářským výrobkům, mohou být přesto znehodnoceny kvasinkami, plísněmi, mléčnými bakteriemi či obávaným bakteriálním rodem *Alicyclobacillus*. Acidofilní a termofilní charakter předurčuje tento rod jako vhodného kandidáta pro kontaminaci ovocných nápojů. Hlavním jeho nežádoucím metabolitem je guajakol, který uděluje ovocným nápojům medicínální či kouřový zápach, což má za následek významné zhoršení senzorických vlastností.

Studie kmenů rodu *Alicyclobacillus* kontaminujících ovocné nápoje

Vondra V., Strejc J., Šiříšřová L., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Rod *Alicyclobacillus* na sebe soustředí pozornost zejména jako kontaminant ovocných nápojů, které poškozuje tvorbou nežádoucích metabolitů, v nejvyšší míře guajakolem. V rámci diplomové práce byli studováni tři zástupci: *A. acidoterrestris* CCM 4660, *A. sacchari* DSM 17974 a *A. fastidiosus* DSM 17978. Kultivační zkoušky s přidavkem vanilinu, kyseliny vanilové, 4-vinylguajakolu, kyseliny ferulové a tyrosinu do růstových médií vedly ke zjištění, že tyto kmeny tvoří guajakol ve významných koncentracích z kyseliny vanilové, kmen CCM 4660 ještě navíc z vanilinu. Další část práce byla věnována fyzikálně-chemickým parametrům vegetativních buněk vybraných kmenů s cílem vyhodnotit jejich adhezivní vlastnosti na základě XDLVO modelu. Měřeny byly kontaktní úhly a zeta potenciály jak buněk, tak skleněných nosičů s modifikovanými povrchy (kyselá hydrolýza, silanizace, použití 3-aminopropyltriethoxysilanu). Výstupem byly vypočtené hodnoty volných interakčních energií, které předpověděly, že energeticky výhodná by měla být adheze buněk na hydrofobní povrchy, tj. nosiče upravené silanizací nebo použitím 3-aminopropyltriethoxysilanu.

Parametry sladování a jejich vliv na technologické vlastnosti sladu

Karachevtsev A., Jelínek L., Karabín M.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Cílem této práce na téma „Parametry sladování a jejich vliv na technologické vlastnosti sladu“ bylo sledování vlivu vybraných sladovacích podmínek (pH máčecí vody, teplota při klíčení a hvozdní, vliv extrémně vlhkého a teplého prostředí v závěrečné fázi klíčení a kontaminace plísněmi) na zvolené fyziologické a fyzikálně-chemické vlastnosti sladu a z nich připravených sladin. Bylo zjištěno, že rozhodujícím faktorem ovlivňujícím sledované technologické parametry sladu je pH máčecí vody, ovlivňující hlavně rychlost klíčení, obsah polyfenolových látek (zejména zákalotvorných flavan-3-olů) a také antioxidační kapacitu sladin. Určitý význam je možno přisoudit též teplotě klíčení a hvozdní, které ovlivňují především hodnoty extraktu. V neposlední řadě byl prokázán vliv plísněvé kontaminace na většinu sledovaných parametrů.

Biologicky aktivní látky chmele a jejich využití

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

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Tato práce je věnována studiu biologicky aktivních látek chmele, jejich testování a využití ve farmaceutickém průmyslu. Cílem první části práce bylo nalezení vhodných isomeračních podmínek pro maximalizaci výtěžku silného fytoestrogenu 8-prenylnaringenin. Na základě získaných dat byl vyhodnocen vliv jednotlivých parametrů na koncentraci 8-prenylnaringeninu ve výsledném materiálu a tyto poznatky byly využity ve vývoji doplňku stravy určeného k potlačení vedlejších symptomů menopauzy. Materiál, získaný isomerací výchozího materiálu podstoupeného vhodným podmínkám pro vznik 8-prenylnaringeninu, byl testován na antikancerogenní a estrogenní účinky. Bylo potvrzeno, že xanthohumol a isoxanthohumol inhibují proliferaci buněk testovaných linií kolorektálního karcinomu i ve velmi nízkých koncentracích (μM).

Experimentální metody kvantifikace tvorby mikrobiálních biofilmů

Podolová N., Bittner M., Brányik T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Úvod

Mikrobiální biofilmy jsou tvořeny jedním, nebo více druhy mikroorganismů shlukovaných do mnohobuněčných vysoce organizovaných konsorcií, kde jsou buňky imobilizovány pomocí fyzikálně-chemických sil a extracelulárních polymerních substancí (EPS) tvořících extracelulární matrix. Tato konsorcia bývají přisednuta k pevnému povrchu (substrátu), a tudíž je nutným předpokladem pro tvorbu mikrobiálních biofilmů schopnost adheze k pevnému povrchu i koadheze buněk. Výhody buněk situovaných v biofilmech jsou vzájemná koordinace, ochrana před působením vnějších negativních faktorů a chemikálií, schopnost přežít v prostředí s nedostatkem živin a mezibuněčná komunikace umožňující např. regulaci genové exprese (Branda a kol., 2005; Davey a O'Toole, 2000; Garrett a kol., 2008).

Kvantifikace tvorby mikrobiálních biofilmů

Studium vzniku a vývoje biofilmů probíhá pomocí tzv. adhezních testů. Ty se dělí na dvě skupiny: 1.) statické testy - systém ve vsádkovém režimu (tj. batch), 2.) dynamické - systém se (semi)kontinuálním přítokem či odtokem. Během těchto testů jsou buňky (ve formě inokula, nebo již nakultivované populace) vneseny do systému obsahujícího médium a nosič (popř. testovaný materiál), na který buňky adherují. Poté dochází k charakterizaci a kvantifikaci adherovaných buněk za užití různých metod. Při kvantifikaci biofilmů bývá posuzována průměrná tloušťka biofilmu, drsnost, členitost, porozita, hustota, specifický povrch a osídlení plochy (Heydorn a kol., 2000a). Pro provedení adhezních testů - výzkum vzniku a vývoje biofilmů či jejich vlastností slouží mnoho *in vitro* zařízení. Biofilmy jsou tvořeny za podmínek vsádkového (batch) systému - statické podmínky adheze nebo v průtokových (flow) systémech - dynamické podmínky adheze. (Coenye a Nelis, 2010).

Modelové systémy s mikrotitračními destičkami

Modely založené na principu mikrotitračních destiček (MTP - microtiter plates) jsou jedny z nejpoužívanějších. Existuje více druhů mikrotitračních destiček, přičemž v této metodě jsou používány destičky speciálně vyrobené pro kultivaci biofilmů, většinou je jako materiál použit polystyren. Dno jamek může být ve tvaru U nebo V nebo ploché. V aplikaci biofilmů se nejčastěji používají dna plochá (Stepanovic a kol., 2007). Biofilmy rostou na dně a stěnách jamek nebo na předmětech vložených do jamek jako v uzavřeném systému (batch) - bez

jakéhokoliv přítoku nebo odtoku, přičemž podmínky kultivace jsou statické, ale s průběhem růstu se mění koncentrace substrátu a metabolitů v médiu. Testování růstu biofilmu je rychlé, reprodukovatelné, vhodné pro pathogenní organismy a za použití minimálního vybavení. Výhodou mikrotitračních destiček je, že jsou předem sterilované, jednorázové a dostupné ve více formátech (www.biofilms.biz, 2010, online), použití malého objemu chemikálií, možnost testovat velké množství vzorků (metoda vhodná pro screening), snadná změna parametrů kultivace, možné studium adheze na nátěry či impregnace (Coneye a Nelis, 2010). Po ukončení kultivace biofilmu v jamkách musí být jamky propláchnuty, aby došlo k odstranění neadherujících buněk, poté probíhá fixace teplem (po nanesení Bouinova činidla nebo methanolu), barvení (např. krystalovou violetí, fluorescenčními barvivy) a spektrofotometrické stanovení (Djordjevic a kol., 2002; Stepanovic a kol., 2007).

MBEC Assay

Jednou z modifikací MTP metody je metoda rychlého stanovení efektu antimikrobiálních látek na degradaci biofilmů nazvaná MBEC Assay (Minimal Biofilm Eradication Concentration Assay), známou také jako „The Calgary Biofilm Device. Na víčka mikrotitračních destiček jsou upevněny kolíky, které se při přiložení víka k destičce do jamek ponoří. Dojde k nárůstu biofilmu na kolících, víko je přemístěno na jinou MTP obsahující v jamkách jiný roztok (např. roztok antibiotika). Poté může být celé víko přemístěno do nové MTP obsahující kultivační médium pro bakterie, které zde rostou v závislosti na citlivosti na použité antibiotikum nebo mohou být kolíky odinstalovány z víka a mohou být použity klasické metody kvantifikace jako počítání živých buněk po kultivaci na Petriho miskách s agarem (metoda CFU) nebo mikroskopování (např. SEM) (Ceri a kol., 1999; Coneye a Nelis, 2010).

Biofilm Ring test

Další levnou a běžně dostupnou metodou založenou na principu MTP je Biofilm Ring Test®. V této metodě je v MTP sledována integrace inertních paramagnetických částic, přidávaných do kultivačního média před začátkem experimentu. Po inkubační době jsou jamky MTP analyzovány přístrojem Scan Plate Reader, poté dojde k magnetizaci - externím magnetem jsou separovány volné magnetické částice z média, následuje další analýza a vyhodnocení (program BIOFILM CONTROL ELEMENT) kvantity integrovaných částic do biofilmu. Schopnost adheze je zde vyjádřena jako Biofilm Index (BFI). Tato metoda může být použita na příklad ke zjištění kinetiky tvorby biofilmu, ke srovnání tvorby biofilmu mezi dvěma a více mikroorganismy atd. (Coneye a Nelis, 2010; Sulaeman a kol., 2010).

Modely průtokových systémů

Průtokové systémy jsou v porovnání s předchozími otevřené, kde dochází k semikontinuálnímu přítoku a odtoku či ke kontinuálnímu průtoku média. Tyto systémy mohou být rozděleny do dvou skupin - model míchaného tankového reaktoru s kontinuálním tokem (CFSTR) a model reaktoru s pístovým tokem (PFR). CFSTR je ideálně míchaný systém, kde rychlost přítoku média je rovna rychlosti odtoku a je v něm po celou dobu dosaženo ustáleného stavu (nemění se koncentrace média s časem). Pokud je zředovací rychlost vyšší než doba zdvojení, planktonické buňky jsou vyplavovány a v reaktoru zůstávají a množí se pouze přisedlé buňky. V modelu PFR se podmínky v reaktoru spojitě mění se vzdáleností od vstupu média do reaktoru. Reaktor typu PFR může být oproti CFSTR naplněn např. pískem nebo skleněnými kuličkami za účelem zvýšení povrchu dostupného pro tvorbu biofilmu (Heersink J., 2003). Mezi PFR patří v následujícím textu průtoková cela a MRZ.

Průtoková cela

Průtoková cela je zařízení s kontinuálním průtokem a nehomogenními podmínkami uvnitř celého zařízení. Podmínky se mění se vzdáleností od vstupu média a buněk do cely. Existují dva základní typy průtokové cely pro pozorování biofilmů. Kapilární průtoková cela je vhodná pro studium růstu biofilmů za působení malých či velkých střižných sil. Plošná průtoková cela má tu výhodu, že do ní mohou být místo skla umístěny i jiné materiály -keramika, plast, kov (www.centerfor genomisciences.org, 2008, online). Biofilm v průtokové cele může být pozorován pomocí konfokálního skenovacího laserového mikroskopu (CSLM) tak, že konfokální systém je připojen k inverznímu mikroskopu a tudíž je umožněno online/*in situ* sledování. Vyhodnocování - obrazová analýza - probíhá za využití počítačového programu (Stoodley a kol., 1998). Ke kvantifikaci biofilmu, studiu morfologie a dynamického chování biofilmu bakterií *Pseudomonas aeruginosa* byla použita metoda Digital time-lapse microscopy (DTLM). Biofilm byl sledován *in situ* transmisí mikroskopií, prostorové a texturové parametry biofilmu byly zkoumány za užití softwaru Image Structure Analyzer (ISA). (Purevdorj a kol., 2001). Pro trojrozměrnou kvantifikaci biofilmů po mikroskopování technikou CSLM byl použit program COMSTAT, přičemž bakterie rodu *Pseudomonas aureuginosa* byly barveny zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Tento experiment byl prováděn za účelem zjištění reprodukovatelnosti, důraz byl kladen na pozorování biofilmu v místech o přibližné vzdálenosti 5 - 10 mm od vstupu do cely, jelikož u výstupu bývají biofilmy tenčí, tudíž jsou zde značné rozdíly v prostoru průtokové cely. Při vyhodnocování může být sledováno mnoho proměnných, nejběžnější je však sledovat střední tloušťku biofilmu (Heydorn a kol., 2000a; Heydorn a kol., 2000b).

Modifikované Robbinsovo zařízení

Průtoková cela neumožňuje provozovat experimenty studia tvorby biofilmů za použití různých materiálů a zároveň stejné buněčné suspenze (Linton a kol., 1998). Proto byl vymyšlen systém modifikovaného Robbinsova zařízení (MRZ - modifikované Robbinsonovo zařízení). Jedná se o systém s pístovým tokem (PFR). Zařízení je tvořeno několika paralelními kanály se zasunutými kolíky majícími vstup pro vzorkování, těsnění a vložený vyměnitelný disk (ze studovaného materiálu), který je v kontaktu s médiem a buňkami. Po vyjmutí disku je na něm studován biofilm. MRZ je užíváno nejvíce pro screening kolonizace a tvorby biofilmů. Výhodou je kontrola reprodukovatelnosti, jelikož se jedná o systém zařízení pro více paralelních vzorků (Jass a kol., 1995).

CDC biofilmový reaktor

Dále byl vyvinut CDC (centers for disease control) biofilmový reaktor - zkráceně CBR. Skládá se ze skleněné nádoby s polypropylenovým víkem, ve kterém je umístěno osm polypropylenových tyčí, každá z nich nese 3 odnímatelné disky na nichž je studována adheze. Vzorkování probíhá jednoduše vytažením tyče ze systému (www.biofilms.biz, 2010, online). V reaktoru je umístěno magnetické míchadlo, které zajišťuje rovnoměrnou distribuci nutrientů kolem sledovaných disků. Také pomocí něj můžeme modelovat působení různých velkých střížných sil. V tomto typu reaktoru je zajištěn kontinuální přítok a odtok. Jedná se tedy o reaktor typu CFSTR (Coney a Nelis, 2010).

Rotační diskový reaktor

Rotační diskový reaktor obsahuje teflonový disk, který rotuje na základě působení magnetických sil. Na teflonovém disku je umístěno 6 malých disků z určeného materiálu pro studium adheze. Ke vzniku střížných sil, které jsou středně velké, dochází při rotaci pohybem kapaliny přes malé disky s biofilmem. Při vzorkování musí být z reaktoru asepticky vyjmut celý teflonový disk (Coney a Nelis, 2010).

Kruhový biofilmový reaktor

Kruhový reaktor (annular reactor) se skládá ze dvou válců - vnějšího nehybného a vnitřního rotačního, na jehož vnějším plášti je upevněno několik destiček. Suspenze buněk v médiu se tudíž vyskytuje v mezikruží dvou válců. Střížné síly vznikají na rozhraní otáčejícího se válce a okolní kapaliny a jsou velmi snadno regulovatelné pomocí nastavení otáček vnitřního válce (Coney a Nelis, 2010; www.biofilms.biz, 2010, online).

Reaktor s průtokem kapáním

V tomto reaktoru (drip flow reactor) jsou kultivovány biofilmy v tenkých vrstvách na discích, na které skapává médium obsahující buňky. Působí zde velmi malé střížné síly a dochází k vysokému přestupu plynu mezi prostředím a

biofilmem. Bývají zde testovány např. povrchové úpravy materiálů, EPS, proteomika, fyziologie biofilmů, atd. (Coneye a Nelis, 2010; www.biofilms.biz, 2010, online).

Mikrofluidní zařízení

Mikrofluidní zařízení umožňuje studium vývoje biofilmů za snadno kontrolovatelných podmínek velmi blízkých fyziologickým (nízké rychlosti průtoku, nízký poměr objemu kapaliny k buňce). Velikost kanálků se pohybuje v desítkách až stovkách mikrometrů. Bývá zde dosaženo velmi nízkého průtoku, tudíž laminárního proudění. Vhodnou screeningovou metodou pro studium biofilmů za průtokových podmínek je umístění mikrofluidních kanálků do MTP. V systému je kontrolována teplota i prostředí plynu (Coneye a Nelis, 2010; www.cellasic.com/Pearl-microfluidics.html, 2010, online). V systému BioFlux (mikrofluidní kanálky v MTP byl například studován vliv antimikrobiálních látek na biofilm bakterie *Pseudomonas aureuginosa*. Ke studiu byly použity kmeny produkující GFP a biofilm byl také barven propidium jodidem. Destička byla vložena do analyzátoru, kde byla vyhodnocena míra zelené a červené fluorescence (rozlišení živých a mrtvých buněk). (Benoit a kol., 2010).

Caenorhabditis elegans model

Caenorhabditis elegans je hlístice, na které byl v prvním *in vivo* experimentu sledujícím biofilmy studován vliv bakterie *Yersinia pestis*. Lokalizace a kvantifikace biofilmů byla provedena tak, že bakterie exprimující GFP byly požití hlístic, uchyceny v biofilmu trávícího traktu hlístice tvořeném bakterií *Y. pestis*. Poté následovalo vyhodnocení fluorescence (Darby a kol., 2002).

Modely pro obratlovce

Biofilmy jsou zkoumány na různých zvířatech (krysa, myš, králík, morče, křeček, činčila, poník, prase) a různých cílech - například na centrálním žilním katéttru, na cizím podkožním tělisku (aplikace především pro implantáty), na tělisku v podbřišnicové dutině, v močových cestách, v uších, nose a hrdle, v dýchacím traktu, na kostech, zubech atd. Biofilmy jsou poté zkoumány různými metodami, ovšem ty se od každého konkrétního případu velmi liší, většinou totiž jde o velmi specifické aplikace (Coneye a Nelis, 2010).

Srovnání metod

Ke kvantifikaci buněk může dojít metodami nepřímými, kdy jsou buňky nejprve odstraněny z povrchu (seškrábnutím, sonifikací nebo vortexováním) a poté spočteny (počítání litím desek, CFU). Samotná kultivace anaerobních bakterií ve vhodných médiích je potom jako metoda detekce těchto bakterií velmi zdoluhavá a závislá na specifitě růstových médií (Sakamoto a Konings, 2003). Dále tato metoda zahrnuje počítání všech živých buněk, z nichž ale všechny nemusí být schopné další kultivace. Metody, které kvantifikují množství celé

biomasy (buněk živých, mrtvých i extracelulárního matrix) jsou např. barvení krystalovou violetí nebo barvivem Syto9. Některé metody jsou také schopny odlišovat množství extracelulárního matrix - např. barvení dimethylenovou modří. Další nepřímé metody (radioaktivně značené bakterie, ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay, biologické testy) určují množství přichycených organismů *in situ* měřením vlastnosti typické pro daný mikroorganismus. Přímé metody pozorování zahrnující mikroskopii optickou, konfokální (CLSM), transmisní elektronovou metodu (TEM) a skenovací elektronovou metodu (SEM) umožňují pozorovat mikrobiální populaci přímo. Epifluorescenční mikroskopie podhodnocuje tloušťku biofilmu a nadhodnocuje plochu, jelikož je zbarvena i extracelulární matrix. Pomocí CSLM bylo určeno, že po vortexování a sonifikaci jsou odstraněny extracelulární polymery i spolu s vrchními vrstvami buněk vázaných do biofilmu, ale přisedlé vrstvy zůstávají na místě (Coney a Nelis., 2010; Djordjevic a kol., 2002). V poslední době jsou metody neustále zdokonalovány a modifikovány. Jako nedestruktivní metoda online sledování biofilmu je v posledních letech často využívána průtoková cela ve spojení s CLSM. Průtoková cela je klasickou metodou kultivace biofilmu za kvantifikace mikroskopických fluorescenčních obrazů nebo počítáním tvorby kolonií. Obě metody jsou časově náročné, navíc počítání kolonií je považováno za obtížně proveditelnou metodu vzhledem k nesnadnému přemístění všech buněk z průtokové cely. Oproti tomu systém BioFlux (mikrofluidní kanálky v MTP) umožňuje paralelní studium vysokého počtu biofilmů (96) za dobře kontrolovatelných podmínek (Benoit a kol., 2010). V případě nemožnosti film sledovat online - např. v případech nekompatibility biofilmového modelu s mikroskopem nebo problémy s dlouhotrvající vizualizací je nutno film spolu se substrátem přemístit k potřebnému zařízení, někdy je dokonce třeba biofilm stabilizovat (agarosa). Dále je možno použít metodu AFM (mikroskopie atomárních sil), která využívá mikrosondu pro skenování povrchu, plocha je rozeznávána na úrovni molekul. Tato metoda je silným nástrojem k určování fyzikálně-chemických a mechanických vlastností buněčného povrchu, umožňuje vyhodnocení kvantitativní i kvalitativní a především topografické, tudíž je tato metoda vhodná pro studium tvorby biofilmů. Nevýhody AFM spočívají v omezení velikosti (70 μm) a času snímání vzorku (10 min). Další metody jsou například kryogenní AFM (poskytuje informace o povrchových membránách bakterií), SNOM (optická skenovací mikroskopie v blízkém poli), MRFM - magnetická rezonanční mikroskopie umožňuje nedestruktivní trojrozměrnou analýzu makromolekul jako EPS (Beech a kol., 2002; Fang a kol., 2000).

Závěr

Metody zkoumání biofilmů jsou neustále rozvíjeny a obohacovány, jelikož jejich znalost nám může velmi usnadnit život ať už v boji s problematickým čištěním a odstraňováním biofilmů přes znalost vzniku rezistence některých

patogenních mikroorganismů v biofilmech k aplikacím jako např. bioremediace či kontinuální fermentace.

Seznam použité literatury

Beech I. B., Smith J. R., Steele A. A., Penegar I., Campbell S. A. (2002) The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23, str. 231-247.

Benoit M. R., Conant C. G., Ionesce-Zanetti C., Schwartz M., Martin A. (2010) New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (13), str. 4136-4142.

Branda S. S., Vik A., Friedman L., Kolter R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13 (1), str. 20-26.

Ceri H., Olson M. E., Stremick C., Read R. R., Morck D., Buret A. (1999) The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (6), str. 1771-1776.

Coenye T., De Prijck K., De Wever B., Nelis H. J. (2008) Use of the modified Robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of NitrAdine™, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices. *Journal of Applied Microbiology*, 105, str. 733-740.

Coneye T., Nelis H. J. (2010) In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological methods*, 83, str. 89-105.

Davey M. E., O'Toole G. A. (2000) Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), str. 847-867.

Darby C., Hsu J. W., Ghorri N., Falkow S. (2002) *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Department of Microbiology and Immunology*, 417, str. 243-244.

Djordjevic D., Wiedmann M., McLandsborough L. A. (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (6), str. 2950-2958.

Fang H. H. P., Chan K.-Y., Xu L.-Ch. (2000) Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *Journal of Microbiological Methods*, 40, str. 89-97.

Garrett T. R., Bhakoo M., Zhang Z. (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18, str. 1049-1056.

Heersink J. (2003) Reactor design consideration (The Biofilm Laboratory: Step-by-step protocols for experimental design, analysis, and data interpretation, Hamilton M., Heersink J.,

Buckingham-Meyer K., Goeres D.), Cytergy publishing, Bozeman, str. 12-13.
Heydorn A., Ersbøll B. K., Hentzer M., Parsek M. R., Givskov M., Molin S. (2000b) Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. *Microbiology*, 146, str. 2049-2415.

Heydorn A., Nielsen A. T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., Ersbøll B. K., Molin S. (2000a) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146, str. 2395-2407.

Jass J., Costerton J. W., Lappin-Scott J. M. (1995) Assessment of a chemostat-coupled modified Robbins device to study biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, str. 283-289.

Linton C. J., Sherriff A., Millar M. R. (1999) Use of a modified Robbins Device to directly compare the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* RP62A to surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 86, str. 194-202.

Purevdorj B., Costerton J. W., Stoodley P. (2001) Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9), str. 4457-4464.

Sakamoto K., Konings W. N. (2003) Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89, str. 105-124.

Stoodley P., Lewandowski Z., Boyle J. D., Lappin-Scott H. M. (1998) Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnology and Bioengineering*, 57 (5), str. 536-544.

Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukic S., Cirkovic I., Ruzicka F. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of

testing conditions and practical recommendations of assessment of biofilm production by staphylococci. Acta

Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 115, str. 891-899.

Sulaeman S., Le Bihan G., Rossero A., Federighi M., Dé E., Tresse O. (2010) Comparison between the biofilm initiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains to an inert surface using BioFilm Ring Test®. Journal of Applied Microbiology, 108, str. 1303-1312.

Biofilm reactors [online]. Vytvořeno: 2010 [22.11.2012]. Dostupné z: <http://www.biofilms.biz/biofilm-reactors>.

Pearl Microfluidic Plate [online]. Vytvořeno: 2010 [6.12.2012]. Dostupné z: <http://www.cellasic.com/Pearl-microfluidics.html>.

Vliv podmínek skladování bylin na koncentraci jejich účinných látek

Kolková H.¹, Bryzgal T.², Fiala J.¹

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

²Jan Becher – Karlovarská Becherovka, a.s.

Byla sledována závislost kvality koření, skořice a hřebíčku, na podmínkách skladování. Vzorky byly skladovány po dobu devíti týdnů v papírových, igelitových a vakuových sáčcích a volně ložené ve skladu vzorků při teplotě průměrně 22 °C pro zjištění vlivu obalového materiálu. Pro zjištění vlivu teploty byly vzorky v papírových sáčcích uloženy v mrazícím zařízení (-11 °C), lednici (4 °C), skladu aromat (9 °C), skladu vzorků (22 °C) a v sušárně (30 °C). Kontrolována byla změna vlhkosti, změna barvy spektrofotometricky a změna obsahu cinnamaldehydu ve skořici a eugenolu v hřebíčku, která byla měřena metodou HPLC.

Během skladování nebyla pozorována změna v obsahu aktivních látek, výjimku tvořil vzorek hřebíčku skladovaný v sušárně. Obsah cinnamaldehydu stanovený ve skořicovém macerátu byl 8 mg/g sušiny skořice a obsah eugenolu stanovený v hřebíčkovém macerátu byl 100 mg/g sušiny hřebíčku. Barva odpovídala množství aktivních látek, tudíž byla po celou dobu neměnná.

Degradace směsi par styren/aceton v odpadním vzduchu v probublávaném reaktoru

Kuchař J., Vaněk T., Páca J.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Práce se zabývala zjištěním charakteristik probublávaného bioreaktoru jak v ustálených stavech, tak při dynamických zátěžích. Byl změřen vliv složení médiu na objemový koeficient přestupu kyslíku a dále charakterizováno chování bioreaktoru v ustálených stavech při různých průtocích vzduchu. Ze srovnání charakteristik vyplynulo, že při průtoku vzduchu $1,5 \text{ l.min}^{-1}$ rozpuštěný kyslík v reaktoru při žádné zátěži neklesl na nulu a charakteristiky degradace byly též lepší než u nižších průtoků vzduchu. Degradace ve vodě dobře rozpustného acetonu zde dosahovala s výjimkou přetížení vždy vyšších účinností než degradace styrenu. Dále bylo zkoumáno chování systému po přerušení provozu a zjištěna značná citlivost biomasy k dlouhodobým odstávkám a dlouhá doba obnovení původních degradačních charakteristik.

Možnosti zvýšení trvanlivosti piva

Kotlíková B., Jelínek L., Dostálek P.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Pivo je celosvětově oblíbený nápoj a na jeho kvalitu jsou přirozeně kladeny vysoké nároky. Stejně jako ostatní potraviny, má však i pivo omezenou trvanlivost, se kterou velmi úzce souvisí jeho koloidní stabilita. Po celou dobu své trvanlivosti by mělo být čiré, jiskrné, mělo by mít odpovídající chuť, vůni i říz a neméně významnou roli hraje i kvalita a stabilita pěny. Běžný zákazník dnes očekává dokonale čiré pivo, protože to je pro něj zárukou čerstvosti. Přítomnost jakýchkoli pevných částic je vnímána jako vada tohoto nápoje (Dienstbier a kol., 2010).

V minulosti existovaly spíše menší, regionální pivovary, které dodávaly pivo jen do nejbližšího okolí a nebylo tedy potřeba, aby toto pivo vydrželo stále několik měsíců. Dnes je běžná garance čirosti po dobu až jednoho roku od stočení, přičemž dlouhé trvanlivosti je nutné dosáhnout především u piv určených na export. Takovéto nároky na délku doby trvanlivosti nutí pivovary používat nejrůznější prostředky pro její dlouhodobé zajištění.

Zvýšit trvanlivost piva je možné několika způsoby. Prvním stupněm je jeho přefiltrování, což pomůže prodloužit biologickou stabilitu. Pokud filtrace nestačí, je možné pivo ještě zpasterovat. Pro zajištění koloidní stability pak existuje mnoho prostředků a metod fungujících na různých principech. Pivo, které opouští ležácké tanky, je hotové a je tedy možné ho konzumovat. Mnoho lidí, především z oboru, považuje takovéto pivo za to nejlepší, co je na trhu k dostání. Ovšem platí zde pravidlo něco za něco. Nefiltrované pivo je výborné chuťově, navíc má vysokou výživovou hodnotu, ovšem nízkou trvanlivost, zvláště při nevhodném skladování, protože obsahuje živé kvasničné buňky, příp. i jiné mikroorganismy, které pivu ve většině případů škodí. Nefiltrovaná piva lze ochutnat hlavně v restauračních zařízeních patřících k většině minipivovarů, kde jsou řádně uskladněna a velmi rychle zkonsumována, proto zde není nutnost garance vysoké trvanlivosti.

Větší pivovary, které dodávají pivo do mnoha hospod nejen ve svém regionu, musí svůj výrobek řádně ošetřit. K tomu se téměř vždy využívá nejprve filtrace. Při filtraci se z piva oddělují zbylé kvasničné buňky a další mikročástice. To se nejčastěji provádí pomocí naplavovacích filtrů, které můžeme rozdělit na deskové, svíčkové a síťové. V pivovarech je dnes nejpoužívanějším křemelinovým filtrem svíčkový filtr. Je to tlaková nádoba s kónickým dnem a odnímatelným horním víkem, na kterém jsou filtrační svíčky. Ty jsou v podstatě filtrační přepážkou a na ně se naplavuje křemelina, což je jemný prášek skládající se z drobných skořápek rozsivek a oxidu křemičitého. Filtrační

přepážky mají mnohem větší póry než je velikost částic křemeliny a velikost kalových částic v pivu, které je nutno odfiltrvat. Proto se nejprve musí provést základní náplav a ten upraví hustotu pórů tak, aby kalové částice obsažené v pivu byly na přepážce zachyceny. Základní náplav se provádí hrubou křemelinou, která se naplavuje vodou nebo zfiltrovaným pivem. Na přepážce se vytvoří souvislá vrstva, na kterou se dále naplavuje další vrstva jemnější křemeliny, která obvykle mívá složení jako křemelina určená k celé filtraci. Naplavuje se opět vodou nebo zfiltrovaným pivem a cílem je, aby zfiltrované pivo mělo od samého začátku filtrace požadovanou čistotu. Důležité je, aby naplavená křemelina rovnoměrně pokrývala celou plochu filtrační přepážky. Po naplavení základní vrstvy křemeliny se může přejít k samotné filtraci. Filtrát musí po celou dobu filtrace procházet základním náplavem. Proto se do filtrovaného piva přidává po celou dobu směs (musí být zvolen správný poměr) středně hrubé a jemné křemeliny, což se provádí dávkovačem křemeliny, který je umístěn na začátku filtrační linky (Kunze W., 2004).

Filtrované pivo má trvanlivost už výrazně vyšší, ovšem k dosažení až roční záruky pouze filtrace nestačí. Proto mnoho pivovarů používá ještě pasteraci. Jedná se o tepelné ošetření piva, jehož cílem je zvýšení biologické trvanlivosti (Basařová a kol., 2010). Pro kvantifikaci pasterace byla zavedena tzv. pasterační jednotka (PJ, PU), která je definována jako pasterační účinek tepla působící při teplotě 60 °C 1 minutu. K zajištění biologické stability piva se normálně používá 20 až 30 PJ (Janoušek a Basařová, 2002).

Pasterace se provádí pomocí pasterů a to buď průtokových nebo tunelových. Hlavní rozdíly mezi nimi jsou v přenosu tepla, délce pasteračního účinku, v pasterační teplotě, ploše a v ceně. Rozdílné jsou i nároky na energii a vodu. Při průtokové pasteraci se pasteruje jen pivo a je tedy energeticky méně náročná, protože odpadá energie potřebná k ohřátí celého obalu. Na druhou stranu je zde však vyšší riziko kontaminace při plnění obalů, ať už nedokonale čistou lahví nebo nečistým plničem či korunkovačkou. Teplota pasterace se pohybuje od 68 do 70 °C a záhřev piva trvá pouze 30-40 sekund. Pokud se tato doba jen nepatrně prodlouží, dojde k přepasterování, což mívá negativní vliv na chuť a vůni piva. (Basařová a kol., 2010)

Při tunelové pasteraci se pasterují již celé uzavřené láhve naplněné pivem. Tato metoda je spolehlivější, odpadá zde riziko kontaminace a vzhledem k používaným teplotám, které bývají zhruba o 10 °C nižší než u průtokové pasterace, klesá i nebezpečí negativního vlivu na chuť a vůni piva. Tato metoda je ale energeticky náročnější, doba průchodu piva pasterem je 40 až 60 minut, je zde vyšší spotřeba vody, elektřiny i tepla a pastér zabírá mnohem více místa (Basařová a kol., 2010).

K dosažení dlouhodobé trvanlivosti piva je důležité zajistit nejen jeho biologickou stabilitu, ale také stabilitu koloidní. Ta je definována jako rovnováha mezi zákalotvornými bílkovinami a polyfenoly, které mají schopnost společně tvořit komplexy, které se z piva vylučují ve formě zákalu (Bamforth,

1999). 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 a především odstraněním jednoho nebo obou hlavních zákalotvorných prekurzorů (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 stabilizace během konečných úprav piva (při filtraci), ovšem některé prostředky se do piva dávkuje již na varně nebo v ležáckém sklepě a z piva se odstraní buď sedimentací, nebo při již zmíněné filtraci (Freeman, 2006). V současné době jsou nejpoužívanějšími stabilizačními prostředky tzv. adsorbenty dusíkatých a polyfenolových látek. K dostání jsou buď křemičité gely, které se používají pro odstranění zákalotvorných bílkovin, nebo přípravky na bázi PVPP pro odstranění polyfenolů. Výhodou těchto prostředků je kromě vysoké účinnosti také jejich nerozpustnost v pivu, plná odstranitelnost a snadná manipulace. Nevýhodou je poměrně vysoká cena, protože s vyššími nároky na trvanlivost piva přirozeně roste jejich spotřeba (Siebert a Lynn, 1997).

Mezi další metody, dnes však využívané jen minimálně, patří použití taninů či proteolytických enzymů. Taniny fungují na principu srážení, ale jsou v pivu rozpustné a při předávkování se zvyšuje hladina polyfenolů. Enzymy jsou v pivu také rozpustné a navíc působí neselektivně a tím mohou zhoršit stabilitu pивní pěny (Briggs a kol., 2004).

Další nabízející se variantou, jak zvýšit koloidní stabilitu piva, je využití fyzikálně-chemických metod (využití dochlazovače, ultrazvuku, tlakových rázů). Ne všechny bílkoviny a polyfenoly jsou totiž zákalotvorné, některé poměrně významně ovlivňují senzorický profil piva, a odstranění těchto pozitivně působících látek je proto nežádoucí. Zavedením těchto metod do provozu by se 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. Pokud se část zákalotvorných látek, které spolu reagují, odstraní z piva ještě během jeho výroby, dojde k prodloužení

koloidní stability, protože takto upravené pivo poté obsahuje nižší koncentraci těchto nežádoucích látek.

Jednou z možností je použití dochlazovače. Toto zařízení (deskový chladič) slouží k ochlazení piva na požadovanou teplotu (nejčastěji teploty blízké 0 °C), čímž dojde k tvorbě chladového zákalu ještě před konečnou filtrací. Další možností je využití ultrazvuku, jehož vlivem dochází k tvorbě kavit, následně k denaturaci bílkovin a k tvorbě vazeb mezi bílkoviny a polyfenoly, což se projeví vznikem zákalu. Další možností se jeví použití tlakových rázů. 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 opět odstraní během filtrace (Karel V, 1980).

Potenciální přínos fyzikálně-chemických metod tkví v tom, že do piva není nutné nic přidávat a následně z něj odstraňovat a tudíž vzniká minimum odpadů. Skrývají tedy možnosti, jak ošetřit pivo bez přídavku chemických látek a zároveň mu významně prodloužit trvanlivost. Jejich zavedení do provozu by tak bylo, s pomnutím nákladů na běžný provoz, jednorázovou investicí. Oblast aplikace těchto metod stabilizace piva však nebyla doposud prozkoumána vyčerpávajícím způsobem a tím pádem nebyly ani použity v provozním měřítku, protože nebyla překonána určitá úskalí, která jejich zavedení do průmyslového měřítka přímo brání.

Při výběru způsobu zvýšení trvanlivosti piva je nutné zvážit, pro jaký trh je pivo vyráběno, jak dlouho může trvat, než se finální produkt dostane ke spotřebiteli a zda je pivovar schopen zajistit dostatečně vhodné podmínky skladování piva. Poté je nutné přistoupit ke zhodnocení bilance, zda investice do nově zavedených zařízení a náklady na jejich provoz mohou v určitém časovém horizontu ušetřit náklady na nákup klasických stabilizačních prostředků.

Použitá literatura

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

Basařová G. Šavel J., Basař P., Lejsek T. (2010) Pivovarství – teorie a praxe výroby piva. 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.

Dienstbier M., Janková L., Sladký P., Dostálek P. (2010) Metody předpovědi koloidní stability piva, Chemické listy, 104, 2, str. 86-92.

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

Janoušek J., Basařová G. (2002) Význam pojmu „pasterační jednotka“ v moderním pivovarství, Kvasný průmysl, 48, str. 82 – 86.

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

Kunze W. (2004) Beer production (Technology Brewing and Malting, Kunze W.), VLB Berlin, Germany, str. 367 - 525.

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) Taylor&Francis Group, London, New York, str. 715 - 727.

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č.20/2013).

Pivní styly

Humhal T.

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

V České republice se na základě legislativy piva rozděluje podle extraktu původní mladiny, obsahu alkoholu a způsobu konečné úpravy na sedm skupin a čtyři podskupiny. Tento způsob dělení však neumožňuje žádné další rozčlenění značně variabilních skupin spodně a svrchně kvašených pív. Je to dáno především tradicí a všeobecnou oblibou spodně kvašeného piva plzeňského typu v naší zemi, která na dlouhou dobu zastínila ostatní typy pív. V dnešní době, kdy především restaurační pivovary začaly vařit dosud u nás nevšední typy pív, toto rozdělení není zcela dostatečné, a proto se často kombinuje nebo někdy zcela nahrazuje "mezinárodním rozdělením". Těchto mezinárodních systémů dělení piva existuje celá řada a většinou bývají závislé na národnosti autora. Náš klíč dělení piva je kombinací českého rozdělení a "mezinárodního" vycházejícího z práce autorů Horsta Dornbuche, Michaela Jacksona a Jana Kočky.