



Sborník souhrnů a plných textů konference

KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2017

seminář - inovační výstupy využitelné v praxi

11. dubna 2017

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

Editor: Olga Mařátková

Praha 2017

Pořádající instituce:

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

CzechBio - asociace biotechnologických společností ČR

Sponzoři, spolupracující společnosti a hosté:

Bioinova s.r.o.

BioTech a.s.

Budějovický Budvar, n.p.

Contipro, a.s.

EPS, s.r.o.

Pivovar Kunratice s.r.o.

Pivovar Velké Popovice

Pivovar Zubr., a.s.

Státní zemědělská a potravinářská inspekce

Přípravný a organizační výbor:

Ing. Irena Kolouchová, Ph.D.

Ing. Olga Maťátková, Ph.D.

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

© Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2017

ISBN 978-80-7080-996-9

Obsah

Program konference.....	4
Sorpce mikropolutantů na řasovou biomasu	8
Ověření produkce sekundárních metabolitů v průběhu germinace <i>Streptomyces coelicolor</i>	13
Změna obsahu a distribuce přírodních látek s antioxidační aktivitou ve <i>Vitis vinifera</i> v průběhu vegetace a agrotechnických zásahů	20
Možnosti využití odhořčených chmelových materiálů v pivovarství.....	25
Působení anti-biofilmových látek na gramnegativní bakterie	26
Kultivace bakterie <i>Salinispora tropica</i> a biologická aktivita extraktu karotenoidů.....	31
Vliv nanočástic kovů na projevy oxidačního stresu u jednobuněčných mikroorganismů ...	38
Využití zemědělských odpadů pro biotechnologickou produkci biopaliv	45
Buněčná signalizace mikroorganismů a možnosti jejího ovlivnění	52
Vývoj chromatografické metody pro sledování těkavých aromatických sloučenin v pivu..	58
Využití konsorcia anaerobních bakterií a/nebo lignin modifikujících enzymů při produkci alkoholů nebo kyselin z pšeničné slámy.....	59
Identifikace sekundárních metabolitů u bakterií, které obsahují biosyntetické genové shluky pyrrolbenzodiazepinů	60
Produkce a biologická aktivita pigmentů tvořených houbou <i>Monascus purpureus</i>	61
Kultivace bakterií <i>Salinispora tropica</i> a testování biologické aktivity jejich karotenoidů ..	69
Vliv nízkoteplotního plazmatu na biofilm.....	70
Profil lipidů kvasinek rostoucích na netradičních zdrojích uhlíku	72

Program konference

8:00	-	9:00	Registrace účastníků
1. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL B+C			
9:00	-	9:10	Zahájení konference
9:10	-	9:20	Sorbce mikropolutantů na řasovou biomasu a její frakce <u>Ing. Anna Čadková</u> , Ing. Lukáš Jelínek Ph.D., prof. Ing. Tomáš Brányik Ph.D.
9:20	-	9:30	Změna obsahu a distribuce přírodních látek s antioxidační aktivitou ve <i>Vitis vinifera</i> v průběhu vegetace a agrotechnických zásahů <u>Ing. Lucia Gharwalová</u> , Ing. Irena Kolouchová Ph.D., prof. Ing. Jan Masák CSc.
9:30	-	9:40	Možnosti využití odhořčených chmelových materiálů v pivovarství <u>Ing. Vojtěch Hanko</u> , Ing. Lukáš Jelínek Ph.D., prof. Ing. Pavel Dostálek CSc.
9:40	-	9:50	Využití dvoufázových submerzních reaktorů pro čištění horkých odpadních plynů <u>Ing. Jan Chalupa</u> , doc. Ing. Martin Halecký Ph.D.
9:50	-	10:00	Kultivace bakterie <i>Salinispora tropica</i> a biologická aktivita extraktu karotenoidů <u>Mgr. Ježková Zuzana</u> , prof. Ing. Tomáš Brányik Ph.D., Dr. Ing. Michaela Rumlová
-			
10:00	-	10:20	PŘESTÁVKA
10:20	-	10:30	CzechBio: představení konsorcia biotechnologických společností <u>Ing. Petr Bažant</u> , CSc., MBA, CzechBio - asociace biotechnologických společností ČR, z. s. p. o.
10:30	-	10:40	Contipro: Příprava vysoce aktivní rekombinantní 1,3 hyaluronidázy z <i>Hirudinaria manillensis</i> <u>Jana Jílková</u> , Dzianis Smirnou, Lukáš Franke, Stanislav Pepeliaev, Zbyněk Černý
10:40	-	10:50	Vývoj chromatografické metody pro sledování těkavých aromatických sloučenin v pivu <u>Ing. Jakub Nešpor</u> , Ing. Marcel Karabín Ph.D., prof. Ing. Pavel Dostálek CSc.
10:50	-	11:00	Vliv tlaku na vznik a průběh přepěňování sycených nápojů <u>Bc. David Bandy</u> , prof. Ing. Tomáš Brányik Ph.D., doc. Ing. Marek Růžička CSc. DSc.
11:00	-	11:10	Aplikace pasterace pro zvýšení trvanlivosti nefiltrovaného piva <u>Bc. Filip Korda</u> , prof. Ing. Pavel Dostálek CSc.
11:10	-	11:20	Studium potenciálu upraveného dubového dřeva na zlepšení organoleptických vlastností piva <u>Bc. Kryštof Mačaj</u> , Ing. Lukáš Jelínek Ph.D.
11:20	-	11:30	Změny obsahu senzoricky aktivních látek v průběhu kvašení cideru <u>Bc. Jakub Ruffer</u> , Ing. Marcel Karabín Ph.D., Ing. Jakub Nešpor
11:30	-	11:40	Chemické metody zvyšování stability pивní pěny <u>Bc. Kamila Zítková</u> , Ing. Petr Košin Ph. D., prof. Ing. Tomáš Brányik Ph.D.

2. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL A	
9:10 - 10:10	CzechBio: B2B setkání výzkumných pracovníků a zástupců firem
10:10 - 10:30	PŘESTÁVKA
10:30 - 10:40	Využití zemědělských odpadů pro biotechnologickou produkci biopaliv <u>Bc. Romana Lokajová</u> , Ing. Barbora Branská Ph.D., Ing. Marek Drahokoupil
10:40 - 10:50	Využití konsorcia anaerobních bakterií a/nebo lignin modifikujících enzymů při produkci alkoholů nebo kyselin z pšeničné slámy <u>Bc. Jiří Novotný</u> , doc. Dr. Ing. Petra Patáková, Mgr. Jan Kolek RNDr.
10:50 - 11:00	Využití odpadů ze zemědělství a průmyslu jako suroviny pro biotechnologickou produkci obohacených krmiv <u>Bc. Nikola Zralá</u> , Dr. Ing. Leona Paulová
11:00 - 11:10	Tvorba biofilmu na biodegradovatelném náplňovém materiálu <u>Bc. Kateřina Staňková</u> , doc. Ing. Martin Halecký Ph.D., Ing. Věra Vlčková
11:10 - 11:20	Rizika mikropolutantů a možnosti jejich odstraňování z kontaminované vody <u>Bc. Natallia Yeudakimenka</u> , prof. Ing. Jan Páca DrSc.
11:20 - 11:30	Kultivace bakterií <i>Salinispora tropica</i> a testování biologické aktivity jejich karotenoidů <u>Bc. Tomáš Potočár</u> , Mgr. Zuzana Ježková, prof. Ing. Tomáš Brányik Ph.D.
11:30 - 11:40	Biologická aktivita rhamnolipidů <u>Bc. Šimon Břeský</u> , Ing. Richard Ježdík, prof. RNDr. Vladimír Jirků DrSc.
3. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL A	
13:00 - 13:10	Ověření produkce sekundárních metabolitů v průběhu germinace <i>Streptomyces coelicolor</i> <u>Bc. Matouš Čihák</u> , RNDr. Jan Bobek Ph.D., Mgr. Zdeněk Kameník Ph.D., prof. Ing. Jan Masák CSc.
13:10 - 13:20	Vliv teploty na profil mastných kyselin kvasinek izolovaných z vinařského průmyslu <u>Bc. Jana Doležalová</u> , Ing. Lucia Gharwalová, Ing. Irena Kolouchová Ph.D.
13:20 - 13:30	Mikroskopická analýza změn translačního aparátu vyvolaných působení nanočástic nZVI v <i>S. cerevisiae</i> <u>Bc. Dominik Eisner</u> , prof. Ing. Alena Čejková CSc.
13:30 - 13:40	Působení anti-biofilmových látek na gramnegativní bakterie <u>Bc. Nataliya Holovatska</u> , Ing. Martina Paldrychová, prof. Ing. Jan Masák CSc.
13:40 - 13:50	Vliv boswellových kyselin na mikrobiální populace oportunních patogenů <u>Bc. Zdeněk Kodeš</u> , Ing. Irena Kolouchová Ph.D., Ing. Martina Paldrychová
13:50 - 14:10	PŘESTÁVKA
14:10 - 14:20	Příprava lidských buněčných linií s fluorescenčními reportéry aktivace vybraných transkripčních faktorů <u>Bc. Lucia Kořínková</u> , Dr. Ing. Michaela Rumlová, Ing. Filip Kaufman
14:20 - 14:30	Antimikrobiální účinky nanočástic a jejich vliv na růstové a biochemické vlastnosti potenciálně patogenních mikroorganismů <u>Bc. Jana Novotná</u> , Ing. Karolína Pádrová, prof. Ing. Alena Čejková CSc.
14:30 - 14:40	Biologicky aktivní látky a jejich působení na oportunní patogeny <u>Bc. Michaela Míčová</u> , Ing. Olga Maťátková Ph.D., Ing. Eva Kvasničková
14:40 - 14:50	Buněčná signalizace mikroorganismů a možnosti jejího ovlivnění <u>Bc. Jana Michailidu</u> , Ing. Martina Paldrychová, prof. Ing. Alena Čejková CSc.

4. PŘEDNÁŠKOVÁ SEKCE: SÁL B+C

13:00 - 13:10	Vliv nanočástic kovů na projevy oxidačního stresu u jednobuněčných mikroorganismů <u>Bc. Marcela Nováková</u> , Ing. Markéta Koukalová, Ing. Karolína Pádrová, prof. Ing. Alena Čejková CSc.
13:10 - 13:20	Vliv přírodních látek na regulaci tvorby biofilmu <i>Candida albicans</i> <u>Bc. Dávid Kunderát</u> , Ing. Olga Mařátková Ph.D., Ing. Eva Kvasničková
13:20 - 13:30	Identifikace sekundárních metabolitů u bakterií, které obsahují biosyntetické genové shluky pyrrolobenzodiazepinů <u>Bc. Lucie Palánová</u> , prof. Ing. Jan Masák CSc., Mgr. Zdeněk Kameník Ph.D.
13:30 - 13:40	Hodnocení fyziologického stavu a sporulačního cyklu bakterií rodu <i>Clostridium</i> <u>Bc. Zora Pecháčková</u> , Mgr. Maryna Vasylykivska, Ing. Barbora Branská Ph.D.
13:40 - 13:50	Produkce a antimikrobiální aktivita pigmentů tvořených houbou <i>Monascus purpureus</i> <u>Bc. Kristýna Šinová</u> , doc. Dr. Ing. Petra Patáková, Ing. Matěj Patrovský
13:50 - 14:10	PŘESTÁVKA
14:10 - 14:20	Charakterizace izolovaných termofilních bakterií <u>Bc. Martin Vácha</u> , doc. Ing. Martin Halecký Ph.D., Ing. Jan Chalupa
14:20 - 14:30	Vliv nízkoteplotního plazmatu na biofilm <u>Bc. Markéta Váľková</u> , Ing. Eva Kvasničková, doc. Ing. Vladimír Scholtz Ph.D., prof. Ing. Jan Masák CSc.
14:30 - 14:40	Zavedení a ověření lentivirového systému pro in vivo testování a charakterizaci inhibitorů skládání částic HIV-1 <u>Bc. Zuzana Vonková</u> , Ing. Ivana Křížová, Dr. Ing. Michaela Rumlová
14:40 - 14:50	Profil lipidů kvasinek rostoucích na netradičních zdrojích uhlíku <u>Bc. Michal Zimola</u> , Ing. Irena Kolouchová Ph.D., Ing. Lucia Gharwalová

SOUHRNY A PLNÉ TEXTY PŘÍSPĚVKŮ

Sorpce mikropolutantů na řasovou biomasu

A. Čadková, L. Jelínek, T. Brányik
Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Odpadní vody jsou kontaminovány širokou škálou škodlivých látek, včetně reziduí léčiv, chemikálií pocházející z kosmetiky, domácích přípravků či pesticidů. Jedna skupina z těchto problematických látek se nazývá mikropolutanty, látky znečišťující prostředí ve velmi nízkých koncentracích, často pod stanovitelnou mezí, v řádu ng/l až µg/l (Hušková a Beneš, 2015). Mikropolutanty mají často komplikovanou strukturu, která výrazně znesnadňuje jejich odstranění z odpadních vod v primárním a sekundárním stupni běžných čistíren odpadních vod. Patří mezi ně i endokrinní disruptory (EDC, z anglického endocrine disrupting compounds). EDC jsou látky, které mohou narušovat činnost živých organismů napadáním žláz produkujících hormony, nebo se jedná o látky napodobující účinky hormonů. Tato práce se zabývá sorpcí steroidních hormonů, mikropolutantů z řad EDC.

Biosorpce na řasovou biomasu nabízí alternativu pro odstraňování mikropolutantů z prostředí. V této studii byla jako modelová biomasa použita jednobuněčná řasa *Chlorella vulgaris*. Její buněčná stěna obsahuje velké množství variabilních míst, která mohou absorbovat různé chemické sloučeniny. Pro biosorpční testy byly zvoleny tři steroidní hormony, testosteron, estron a estradiol. Byly pozorovány různé sorpční efekty biomasy. Nejvyšší stupeň sorpce byl pozorován pro progesteron (5 µg / g biomasy).

Úvod

Biosorpce je jev kdy jsou komponenty ve vodném prostředí vázány na buněčnou stěnu živých i neživých mikroorganismů. Buněčná stěna zelených řas obsahuje velký počet funkčních skupin a tím pádem vazebních míst, na která lze navázat mnoho chemických sloučenin. Existuje zde mnoho oblastí bohatých na uronové kyseliny, glukosaminy a proteiny, které mohou reagovat s desítkou strukturně odlišných sloučenin, prostřednictvím vodíkových vazeb, π - π interakcí nebo hydrofobních interakcí. Velký počet studií se zabýval a zabývá především biosorpcí malých molekul na povrch řas. Mnoho autorů (Tüzün a kol., 2005; Gupta a Rastogi, 2008; Pavasant a kol., 2006; Romera a kol., 2007) poukazuje na schopnost vyvazovat pomocí řas významné množství těžkých kovů (Pb, Hg a Cd) z kontaminované vody. Biosorpce nabízí kromě využití v oblasti čištění životního prostředí i možnost výroby potravinových doplňků obohacených o elementární prvky jako jsou např. Se, Fe, Mn, Cr, Cu, Zn, nebo polyfenoly (Jelínek a kol, 2015). Takto obohacená biomasa se dále dá používat i pro krmné účely hospodářských zvířat a ryb.

Tato práce se zabývá zkoumáním využití biosorpce k odstraňování mikropolutantů z odpadních vod, konkrétněji k odstraňování steroidních hormonů. Ty byly vybrány pro tento projekt, protože už při nízkých koncentracích mohou narušovat endokrinní systém vodních organismů a představují proto závažný ekologický problém. Některé z nich mají schopnost negativně působit na hormonální systém živočichů a zapříčinit tak změny v pohlavních orgánech, v chování či v poměru pohlaví (Bendlová, 2013). Jedním z nejznámějších příkladů je celosvětově

pozorovaná feminizace samců ryb pod výpustěmi z ČOV, což může vést až k vymizení celé populace ryb, jako v případě pstruhů v jezeře Ontario v Kanadě (Jobling a Tyler, 2003).

EDC se do životního prostředí dostávají především antropogenním vlivem. Jsou přirozeným způsobem vylučovány lidmi, například hormony 17 β -estradiol a estron jsou vylučovány ženami (2-20 $\mu\text{g/osoba/den}$), stejně tak jako muži (5 $\mu\text{g/osoba/den}$) (Ying a kol., 2002). Odpad z městských aglomerací je odváděn kanalizací do čistíren odpadních vod (ČOV), které však nedokáží odstranit steroidní látky úplně. Část se tak může absorbovat do sedimentu nebo jiných pevných částic a část do odpadního kalu, který může opět vstoupit do vodní fáze, jestliže je rozpouštěn a použit ke hnojení půdy. Významnými zdroji steroidů jsou i hospodářská zvířata, a to jak velkochovy, tak i bodové zdroje jako odpouštění fekálií ze statků či dokonce vylučování zemědělských zvířat přímo do vodních toků. Množství vyloučených estrogenů v exkrementech dojnic může být až dvakrát větší než u člověka (Johnson a kol., 2005). Naměřená koncentrace steroidních hormonů v odpadních a povrchových vodách se pohybuje nejčastěji v řádu ng/l. Například koncentrace estronu byla v holandských vodách naměřena v rozmezí 0,1 – 3,4 ng/l. V itálské řece Tibera koncentrace estronu dosahovala 1,5 ng/l, v německých řekách 0,3 – 5,5 ng/l (Baronti a kol., 2000; Belfroid a kol., 1999; Kuch a Ballschmiter, 2001). U výpustě z ČOV v české Uhřetěbce byla naměřena koncentrace estrogenů v kalu až 345 ng/l (Pačes, 2015).

V současnosti používané metody jako sorpce na aktivní uhlí jsou investičně i provozně náročné s nutností regenerace nebo dokonce likvidace aktivního uhlí jako odpadu. Odstranění těchto látek pomocí sorpce na mikroskopické řasy se proto do budoucna jeví jako velmi lukrativní způsob levného a ekologicky nezávadného čištění odpadních vod.

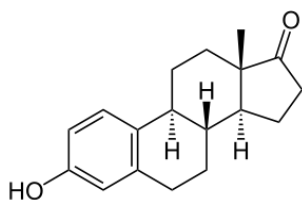
Materiály a metody

Biosorbent

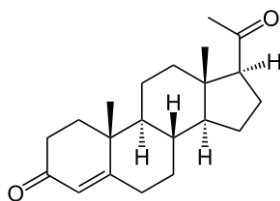
Jako modelový mikroorganismus byla použita jednobuněčná řasa *Chlorella vulgaris*, kultivována ve fotobioreaktorech Mikrobiologického ústavu akademie věd Třeboň (MBÚ AV Třeboň). Po kultivaci byla řasa promyta a lyofilizována. Takto upravená byla použita jako základní modelový biosorbent.

Mikropolutanty

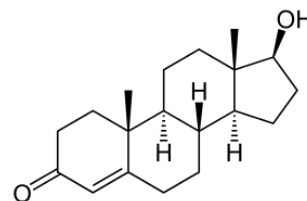
Z řad mikropolutantů v základní fázi tohoto projektu byly vybrány tři přírodní steroidní hormony: progesteron, testosteron a estron (SigmaAldrich, p.a. $\geq 99\%$). Struktury jednotlivých hormonů jsou zobrazeny na obr. č. 1-3.



Obr. 2 Estron



Obr. 1 Progesteron



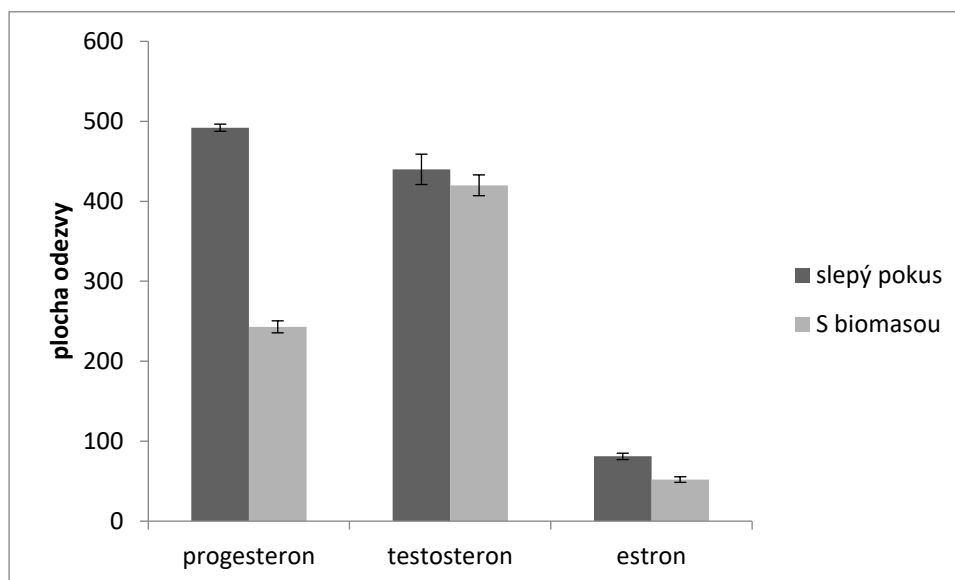
Obr. 3 Testosteron

Biosorbční testy

Absorpční testy byly prováděny jako vsádkové experimenty o objemu 750 ml. Použitá koncentrace hormonů činila 10 µg/l a koncentrace sorbentu 1 g/l. Absorpce probíhala 24 hodin, při 25 °C na třepačce (150 rpm). Následně byl sorbent odstředěn a supernatant zkoncentrován pomocí metody extrakce na tuhé fázy (SPE) za použití SPE kolon Strata C18 (55 µm, 70 Å, 500 mg/6ml). Určení přesné koncentrace probíhalo pomocí HPLC-DAD s následujícími parametry: kolona Agilent Eclipse XDB (5 µm; 4.6x150mm), gradientová eluce, mobilizační fáze: roztok A (0,01 % kyselina orthofosforečná ve vodě) a B (0,01 % kyselina orthofosforečná v acetonitrilu), průtok 0,8 ml/min, teplota 30°C, nástřik 20 µl. Absorbční testy byly pro každý z hormonů opakovány minimálně 5x.

Výsledky a diskuze

Při testování steroidního hormonu progesteronu došlo ke snížení koncentrace průměrně o 52 % oproti slepému pokusu (bez přidaného biosorbentu). Plocha naměřených píků slepých pokusů byla 492 (±10) a plocha pokusů s přidaným biosorbentem 243 (±16). U druhého testovaného steroidního hormonu estronu došlo ke snížení o 34 %. Naměřené plochy byly 81 (±8) a 52 (±8). Nejnižší účinnost sorpce byla zaznamenána u třetího z testovaných hormonů testosteronu a to jen o 5 %, odezvy byly 438 (±38) a 415 (±26).



Obr. 4 Graf naměřené plochy odezvy pro biosorpční testy

Rozdílné schopnosti sorpce na povrch lyofilizované biomasy *C. vulgaris* lze vysvětlit rozdílnou strukturou vybraných steroidních hormonů. Progesteron, u kterého byl naměřen nejvyšší rozdíl mezi pokusy s biomasou a bez přidané biomasy, má nejdelší rozvětvený postranní řetězec. Patrně nejvýznamnější rozdíl mezi strukturou estronu a testosteronu je aromatický kruh v struktuře estronu, který může mít vliv na sorpci. Právě vliv počtu aromatických kruhů v molekule označili jako hlavní rozhodující faktor Jelínek s spol. v práci z roku 2015, kde naměřili rozdílné schopnosti vázat se a to v závislosti na počet aromatických kruhů v molekule. Nejvyšší schopnost zaznamenali u quercetinu a xanthohumulon. Nejnížší pak například u kyseliny galové a kumarové (Jelínek a spol., 2015). Tento trend lze tedy vidět i u nás: estron dosáhl vyššího stupně sorpce než testosteron.

Závěr

I přes rozdílné schopnosti sorpce se biomasa *C.vulgaris* v námi provedených pokusech ukázala jako vhodný biosorbent pro snížení koncentrace některých z mikropolutantů ve vodném prostředí. Biomasa se tak ukazuje jako levný biodegradovatelný sorpční materiál, vhodný jako alternativa k dnes často používanému aktivnímu uhlí v čističkách odpadních vod. Po ztrátě klíčových vlastností, sorpčních a mechanických (částečný rozklad materiálu mikroorganismy), nabízí šetrnou likvidaci pomocí dekontaminačně-degradačního procesu (kompostování, metanogeneze).

Závislost sorpce na struktuře testovaných steroidních hormonů bude dále testována vhodným výběrem steroidních hormonů s rozdílnou strukturou jako je například desogestrel, ethinilestradiol, megestral acetát, kortison a použitím rozdílných sorbentů.

Literatura

- Baronti Ch., Curini R., D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Samperi R. (2000) Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water. *Environmental Science and Technology*. 34, 5059–5066.
- Belfroida A. C., der Horst V., Vethaak A. D., Schafer A. J., Rijsc G. B. J., Wegener J., Cofino W. P. (1999) Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of The Total Environment*. 255, 101-108.
- Bendlová B. (2013) Endokrinní disruptory – neviditelná hrozba – editorial. *Vnitřní lékařství*, 59(5), 334-336.
- Gupta V. K., Rastogi A. (2008). Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: kinetics and equilibrium studies. *Journal of Hazardous Materials*, 152(1), 407-414.

Hušková R., Beneš O. (2015) Aktuální pohled na mikropolutanty (ČR a EU) Sborník příspěvku z XIX. Mezinárodní Vodohospodářské Konference, Voda Zlín 2015, 47.

Jelínek L., Procházková G., Quintelas C., Beldíková E., Brányik T. (2015). *Chlorella vulgaris* biomass enriched by biosorption of polyphenols. *Algal Research*, 10, 1-7, 2015.

Johnson I., Harvey P. (2002) Study of the Scientific Evaluation of 12 Substances in the Context of Endocrine Disrupter Priority List of Actions, European Commission report No.:UC6052.[Online] dostupné z: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/wrc_report.pdf

Kuch H. M., Ballschmitte K. (2001) Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCI)-MS in the Picogram per Liter Range. *Environmental Science and Technology*. 35, 3201-3206.

Pačes, T. Estrogeny – ženské hormony ve vltavské a pitné vodě v Praze. [on line] Dostupné z: <http://www.kontrolyvody.cz/clanky/%C5%BDensk%C3%A9%20hormony%20v%20povrchov%C3%BDch%20vod%C3%A1ch,%20%C4%8Disti%C4%8Dk%C3%A1ch%20a%20pitn%C3%A9%20vod%C4%9B%20v%20Praze.pdf>

Pavasant P., Apiratikul R., Sungkhum V., Suthiparinyanont P., Wattanachira S., Marhaba T.F. (2006). Biosorption of Cu 2+, Cd 2+, Pb 2+, and Zn 2+ using dried marine green macroalga *Caulerpa lentillifera*. *Bioresource Technology*, 97(18), 2321-2329.

Romera E., González F., Ballester A., Blázquez M.L., Muñoz J.A. (2007). Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. *Bioresource Technology*, 98(17), 3344-3353.

Tüzün I., Bayramoğlu G., Yalçın E., Başaran G., Celik G., Arica, M.Y. (2005). Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg (II), Cd (II) and Pb (II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Environmental Management*, 77(2), 85-92.

Ying G. G., Kookana R. S., Ru Y. J. (2002) Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*. 6, 28.

Ověření produkce sekundárních metabolitů v průběhu germinace

Streptomyces coelicolor

M. Čihák^{1,2}, P. Pohl³, I. Musić³, Z. Kameník⁴, J. Bobek^{2,3}, J. Masák¹

¹Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

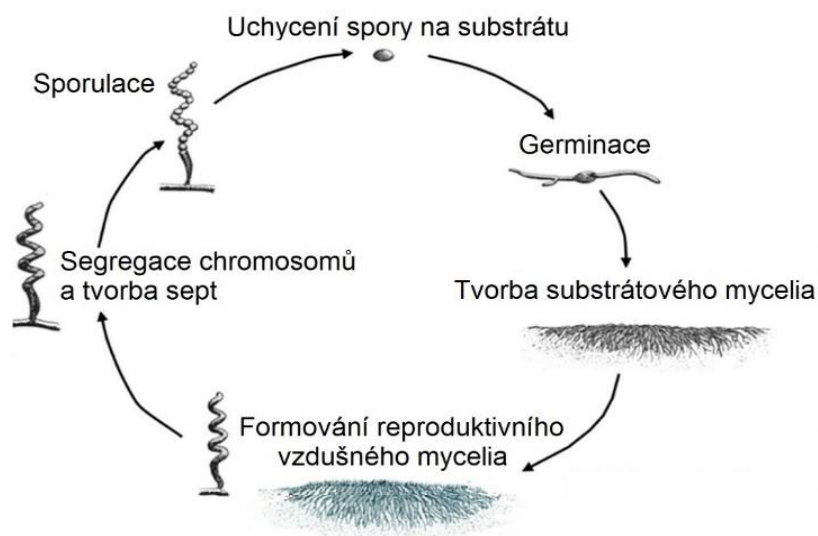
²Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK a VFN v Praze

³Přírodovědecká fakulta, UJEP v Ústí na Labem

⁴Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha

1. Úvod

Bakterie rodu *Streptomyces* ve svém vývojovém cyklu procházejí komplexní buněčnou diferenciací (Obr. 1). Z klidového stádia spor přecházejí procesem germinace do vegetativní fáze růstu substrátového mycelia. Přejít do stacionární fáze růstu naopak charakterizuje tvorba mycelia vzdušného a produkce sekundárních metabolitů, zejména klinicky významných antibiotik (Seipke a kol., 2011). Sekundární metabolity nejsou pro organismus esenciální, ale umožňují mu druhové interakce a poskytují konkurenční výhodu nebo ochranu před nepříznivými životními podmínkami (Keulen a Dyson, 2014). Přestože už bylo objeveno mnoho sekundárních metabolitů streptomycet, jednalo se nejčastěji o izolaci ze stacionární fáze růstu, tedy v souvislosti s tvorbou vzdušného mycelia. Z námi publikovaných dat genové exprese při germinaci *Streptomyces coelicolor* však vyplývá, že se v této fázi aktivují také geny řídící biosyntézu sekundárních metabolitů, např. coelimycinu P1 (Straková a kol., 2013). V naší práci se proto zaměřujeme na ověření produkce sekundárních metabolitů v průběhu germinace. Pro analýzu těchto látek používáme kapalinovou chromatografii s hmotnostně



Obr. 1: Schéma životního cyklu streptomycet, převzato a upraveno ze Seipke a kol. (2011)

spektrometrickou detekcí (UHPLC-MS). Produkce sekundárních metabolitů již v rané fázi vývoje by mohla mikroorganismu poskytovat výhodu v podobě monitorování a optimalizace podmínek pro růst, včetně synchronizace následného vývoje.

2. Materiál a metodika

2.1 Použitý mikroorganismus a podmínky kultivace

Pracujeme s kmenem *Streptomyces coelicolor* M145 uchovávaným ve formě sporových suspenzí při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vodou promyté spory resuspendujeme v R3, NMMP, nebo AM tekutém médiu (Kieser a kol., 2000; Straková a kol., 2013) v poměru 2 ml média na 0,3 g spor. Germinaci spor synchronizujeme tepelným šokem (10 min, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Připravenou sporovou suspenzí (10^8 spor na mililitr média) inokulujeme 50 ml média v 250ml Erlenmayerově baňce. Kultivujeme 6 h ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 rpm), nebo 48 h ($29\text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 rpm).

2.2 Extrakce sekundárních metabolitů a UHPLC-MS analýza

Po skončení kultivace kulturu odstředíme. Pro extrakci na pevnou fázi (SPE) použijeme 3 ml supernatantu (pH 3). Extrakce probíhá na SPE kolonce (Oasis HLB 3cc Vac Cartridge; Waters), kterou umístíme na manifold (SPE manifold, Phenomenex), u něhož regulujeme vakuum tak, aby průtok nepřekročil 2 ml min^{-1} . Provedeme kondicionaci kolonky 3 ml methanolu a následně ekvilibraci 3 ml Milli-Q vody (Millipore). Nanese 3 ml vzorku, promyjeme 3 ml Milli-Q vody a eluujeme 1,5 ml methanolu do mikrozkuřavky. Extrakt zakoncentrujeme na centrifugačním evaporátoru ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Residuum rozpustíme ve $100\text{ }\mu\text{l}$ 50% methanolu a připravíme vzorek pro UHPLC-MS analýzu (mobilní fáze: 0,1% kyselina mravenčí a 100% acetonitril) v pozitivním (ESI+) módu ionizace. Identifikaci známých sekundárních metabolitů *S. coelicolor* jsme založili na přesném měření m/z pomocí vysokorozlišujícího hmotnostního spektrometru. Kromě m/z byl k určení elementárního složení použit poměr detekovaných izotopických píků. U germicidinu A jsme navíc porovnali retenční chování dostupného standardu (Cayman Chemical) s detekovaným analytem.

2.3 Ověření biologických účinků germicidinu A a chalkonu

Biologický účinek sekundárních metabolitů produkovaných v germinaci jsme ověřili s využitím standardů germicidinu A (Cayman Chemical) a *trans*-chalkonu (Sigma-Aldrich). Ověření jsme provedli na kultivačních šestisektorových titračních destičkách s ONA médiem (Kieser a kol., 2000), a to ve dvou sériích v tripletech s negativní kontrolou (médiu bez testované látky). U obou látek byl použit lineární koncentrační gradient ($0\text{--}8\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$). Vyhodnocení jsme provedli z hlediska počtu jednotlivých buněk (spor) tvořících kolonie a fenotypových změn.

3. Výsledky a diskuze

Produkci sekundárních metabolitů *S. coelicolor* jsme ověřovali ve stacionární fázi růstu a v germinaci. Pro kontrolu, že detekované látky se skutečně tvoří při germinaci, jsme navíc měřili vzorek extraktu sekundárních metabolitů z vodou promytých dormantních spor. Tímto způsobem zmapovaná aktivita sekundárního metabolismu v průběhu germinace je zprehledněná v Tab. I. Nakonec jsme ověřili biologický účinek sekundárních metabolitů produkovaných *S. coelicolor* v průběhu germinace. V souladu s dosud publikovanými daty jsme zjistili, že nutričně bohatá média R3 a AM jsou z hlediska stimulace germinace a produkce sekundárních metabolitů vhodnější než minimální tekuté médium NMMP, a to zřejmě díky přítomnosti Ca^{2+} iontů či L-aminokyselin. Jako vhodný zdroj uhlíku z hlediska produkce sekundárních metabolitů se nám u R3 média osvědčil glycerol a mannitol, v případě NMMP mannitol a u AM glukosa a glycerol.

Tab. I. Výsledky *in vivo* analýzy produkce sekundárních metabolitů *S. coelicolor*. Přítomnost metabolitu byla sledována v dormantních sporách, v průběhu germinace (kultivace 6 h) a ve stacionární fázi růstu (kultivace 48 h). Symbol „+“ označuje detekci metabolitu, symbol „–“ negativní výsledek.

Sekundární metabolit	Dormantní spory	Germinace	Stacionární fáze
actinorhodin	+	+	+
albaflavenon	–	+	+
coelimycin P1	–	–	+
desferrioxaminy B, D ₁ , E, G ₁	–	–	+
germicidin A	–	+	+
germicidiny B a C	–	–	+
chalkon	–	+	+
kalafungin	–	–	+
kalcium-dependentní antibiotikum (CDA)	–	–	+
streptorubin B, undecylprodigiosin	–	–	+

Většinu sekundárních metabolitů jsme nedetkovali v germinaci (Tab. I.). Příčinou může být fyziologický stav populace na počátku vegetativní fáze růstu nebo kultivační podmínky vedoucí k nekompletní syntéze či její inhibici. Syntéza poměrně složitých struktur některých sekundárních metabolitů vyžaduje totiž kromě celé řady již vytvořených intermediátů i aktivitu velkého množství genů. Na základě našich výsledků se lze domnívat, že k syntéze intermediátů v germinaci teprve dochází, a proto tyto látky nemusí být nasyntetizovány v dostatečném množství pro detekci. Intermediáty mohou být v buňkách připraveny pro pozdnější fáze růstu, kdy poslouží jako substrát pro syntézu finálního produktu.

Sekundární metabolity *S. coelicolor* produkované v průběhu germinace

Nejnovější studie (Xu a Vetsigian, 2017) popisuje, že germinaci *S. coelicolor* mohou pozitivně i negativně ovlivňovat zatím neznámé produkty vlastních germinujících spor, ale také spor jiných druhů streptomycet. Z výsledků naší práce vyplývá, že *S. coelicolor* v průběhu germinace produkuje tři sekundární metabolity, které patří mezi terpenoidy a polyketidy. Vykazují celou řadu biologických účinků a snad napomáhají *S. coelicolor* již v rané fázi vývoje potlačovat konkurenční mikroflóru nebo koordinovat vlastní vývoj. Biosyntetické dráhy nalezených látek mají pouze několik reakčních kroků, nevyžadují složité prekurzory a řídí je geny, které se během germinace exprimují (Straková a kol., 2013).

Albaflavenon

Seskviterpenoid albaflavenon má zemitou vůni podobnou geosminu (Gürtler a kol., 1994) a jeho biosyntéza vyžaduje aktivitu pouze dvou genů z klastru *sco5222-5223* (Moody a kol., 2012). Doposud byla produkce albaflavenonu u streptomycet popsána pouze ve stacionární fázi růstu (Gürtler a kol., 1994; Moody a kol., 2012). Z analyzovaných dat genové exprese však vyplývá, že při germinaci dochází k aktivaci genu *sco5223* (Straková a kol., 2013), což poukazovalo na možnou tvorbu tohoto metabolitu již po šesti hodinách kultivace. Zde jsme látku odpovídající albaflavenonu skutečně detekovali stejně jako ve vzorku ze stacionární fáze růstu. V extraktu z dormantních spor se však nevyskytovala, což dokládá, že se nejedná o záchyt metabolitu pocházejícího ze sporulace. Lze se domnívat, že albaflavenon produkovaný během germinace organismu zřejmě poskytuje výhodu v silně konkurenčním půdním prostředí, neboť má prokazatelný antibakteriální účinek (Gürtler a kol., 1994). Antibakteriální účinek terpenoidních látek není ničím neobvyklým. Řada z nich má schopnost inkorporace do plazmatické membrány bakterií, čímž dochází k ovlivnění její permeability a k následnému unikání intracelulárního materiálu. Pokud by se albaflavenon začleňoval do hydrofobního obalu spor, podobně jako monoterpenoidní látky do lipofilní vrstvy membrány, lze se domnívat, že tím ovlivní propustnost obalu vedoucí k intenzivnímu influxu vody do spor, čímž by se germinace urychlila. Uvažujeme-li, že tloušťka hydrofobního pláště spory není unifikovaná potom influx vody do každé spory probíhá s odlišnou intenzitou a klíčení je tedy nesynchronní proces. Dříve vyklíčené spory by pak albaflavenon produkovaly jako signál, že podmínky vnějšího prostředí jsou vhodné pro růst.

Germicidin A

Germicidiny patří do bohatě zastoupené skupiny přírodních látek α -pyronů, které mají mnoho biologických účinků a lze mezi nimi nalézt i signální molekuly pro mezibuněčnou komunikaci

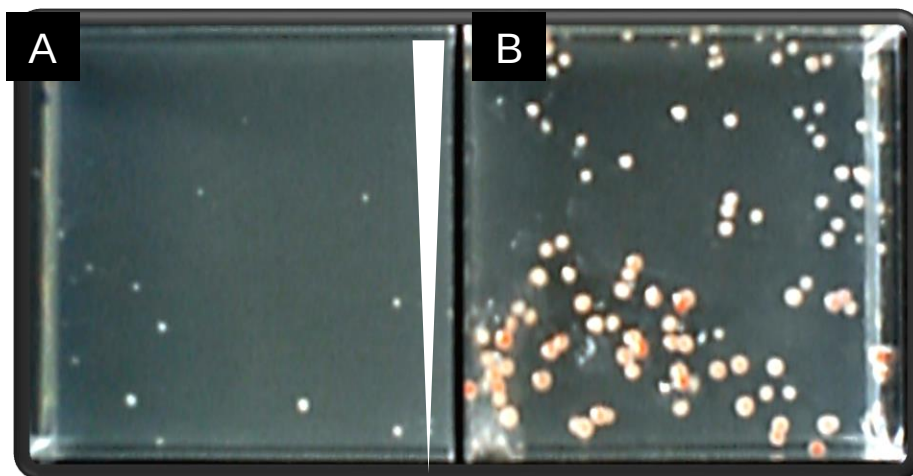
(*quorum sensing*). Na biosyntéze germicidinů se u *S. coelicolor* podílí polyketid-synthasa typu III – produkt genu *sco7221* (Chemier a kol., 2012). Nicméně exprese tohoto genu při germinaci nebyla zjištěna, nebo byla pod hranicí detekce (Straková a kol., 2013). Biosyntéza germicidinů by však mohla souviset s aktivitou genů *sco7670-7671*, jejichž exprese naopak byla v germinaci potvrzena (Straková a kol., 2013). Metabolickými produkty těchto genů jsou právě triketid pyrony (Chemier a kol., 2012). Produkce germicidinu A je popsána u klíčících spor a ve stacionární fázi růstu *S. viridochromogenes* (Petersen a kol., 1993). Izolován byl také po více než dvaceti čtyř hodinové submerzní kultivaci dalších streptomycet (Aoki a kol., 2011). Výsledky naší práce však vůbec poprvé dokazují, že germinující spory *S. coelicolor* produkují **germicidin A**.

Jelikož je germicidin A známým signálem pro inhibici germinace spor, ověřovali jsme dále jeho biologický účinek. Již při koncentraci nižší než $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ viditelně negativně ovlivňoval klíčení spor *S. coelicolor* M145. Germicidin A inhibuje respiraci spor a mycelia interakcí s membránovou Ca^{2+} ATPasou, kdy vzniká inaktivní systém neprodukující ATP. Tímto mechanismem germicidin nejen reverzibilně zabraňuje sporám vytvořit dostatečné množství energie pro průběh germinace, ale také inhibuje růst hyf (Aoki a kol., 2011; Grund a Ensign, 1985). Germicidin A rovněž vykazuje antibakteriální účinek (Grund a Ensign, 1985). Z výše zmíněných důvodů byla pro nás produkce germicidinu A při germinaci za optimálních laboratorních podmínek překvapivá. Jeho produkce klíčovými spory zřejmě napomáhá koordinaci germinace ve vlastní populaci, a lze tedy mluvit o autoregulační funkci. Produkci germicidinu by *S. coelicolor* mohla udržovat dosud nevyklíčené spory v dormantním stavu po delší dobu, jestliže se prostředí ukáže nepříznivým nebo z důvodu klíčení spor v blízkosti mateřských kolonií, které samy odčerpávají živiny z prostředí. Pokud germinující spory nenaleznou vhodné prostředí, odumrou, čímž se snižuje naděje na přežití druhu. Naopak s využitím germicidinů se mohou spory v prostředí dále šířit a po překonání reverzibilního inhibitoru vyklíčit. Výsledkem by tak mohly být úspěšně vyklíčené spory, které našly vhodné prostředí pro růst a rozmnožování.

Chalkon

Chalkony jsou intermediáty biosyntézy flavonoidů. V průběhu germinace *S. coelicolor* se exprimuje gen *sco1206* (Straková a kol., 2013), jehož produktem je polyketid-synthasa typu III, blízce příbuzná rostlinné chalkon-synthase (Izumikawa a kol., 2003). Přestože jsme produkci známých flavonoidních látek *S. coelicolor* neprokázali, detekovali jsme v supernatantu ze stacionární fáze a z germinace látku odpovídající chalkonu, jenž by mohl být

meziproduktem biosyntézy dosud nepopsaného flavonoidu. Chalkon je zřejmě nástrojem mezidruhové komunikace, neboť je mu v literatuře připisován antifungální, fytotoxický a insekticidní účinek (Díaz-Tielas a kol., 2016). Mohl by se také uplatňovat jako signální molekula v symbiotickém vztahu. Příkladem je 4,4'-dihydroxy-2'-methoxychalkon, který produkují luštěniny a indukují tak transkripci *nod* genů u rhizobakterií. Produkty těchto genů, Nod faktory, se podílejí na symbióze, při níž rhizobakterie pro rostliny produkují dusík (Maxwell a kol., 1989). Rostliny a streptomycety jsou si v mnoha ohledech podobné, přestože patří k odlišným skupinám organismů. Zajímavá je například popsání produkce flavonoidu naringerinu u grapefruitu a *Streptomyces clavuligerus*. Jedním z prekurzorů biosyntézy naringerinu je právě naringerin-chalkon (Álvarez-Álvarez a kol., 2015). Předpokládali jsme, že by mohly za příznivých podmínek okolního prostředí chalkony a flavonoidy produkované sporami stimulovat germinaci u streptomycet. Experimentálně jsme však ověřili opak, protože chalkon germinaci *S. coelicolor* prokazatelně inhiboval (Obr. 2). Při koncentraci 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ zcela potlačoval růst a při 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a nižší viditelně inhiboval klíčení spor, diferenciaci kolonií a produkci actinorhodinu.



Obr. 2 Biologický účinek chalkonu na růst *S. coelicolor* M145 po 48 h kultivace při 29 °C: (A) ONA médium s lineárním koncentračním gradientem chalkonu (rozpuštěný v DMSO). Gradient je znázorněn bílým klínem, jehož širší část označuje místo nejvyšší koncentrace chalkonu (8 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a užší část koncentraci blízkou 0 $\mu\text{g ml}^{-1}$. (B) ONA médium s DMSO (negativní kontrola bez chalkonu).

4. Závěr

Provedli jsme první systematickou analýzu produkce sekundárních metabolitů při germinaci streptomycet. K tomuto pozorování nás vedla hypotéza o potřebnosti jednak mezidruhové komunikace, jednak koordinace vlastního vývoje populace v rané fázi růstu. Tuto hypotézu podporovaly předešlé transkriptomové analýzy germinace u streptomycet (Straková a kol., 2013), které prokázaly expresi genů sekundárního metabolismu. Pomocí UHPLC-MS jsme

z fáze klíčení *S. coelicolor* detekovali produkci třech pro germinaci potenciálně důležitých sekundárních metabolitů – germicidinu A, albaflavenonu, a chalkonu. U albaflavenonu, jehož biologický efekt jsme blíže netestovali, nelze vyloučit ani aktivující ani inhibující účinek na germinaci. U zbylých metabolitů může být jejich detekce při germinaci překvapivá, a to vzhledem k následně zjištěným inhibičním účinkům chalkonu a germicidinu A na klíčící spory. Z těchto dat je zřejmé, že u *S. coelicolor* (který germinuje pomaleji a asynchronně na rozdíl od některých druhů streptomycet, např. *S. viridochromogenes*) produkce germinačních inhibitorů do média převládá, což je v souladu se známým inhibičním účinkem supernatantu tohoto druhu na vlastní germinaci (Xu a Vetsigian, 2017).

Poděkování

Financováno z projektů PROGRES Q26/LF1, SVV 260 369 a UJEP-SGS-173-07-01.

Literatura

- Álvarez-Álvarez R., Botas A., Albillos S. M., Rumero A., Martín J. F., Liras P. (2015) Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Microbial Cell Factories*, 14, v tisku, DOI 10.1186/s12934-015-0373-7.
- Aoki Y., Matsumoto D., Kawaide H., Natsume M. (2011) Physiological role of germicidins in spore germination and hyphal elongation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Antibiotics*, 64, str. 607-611.
- Chemier J. A., Buchholz T. J., Geders T. W., Akey D. L., Rath C. M., Chlipala G. E., Smith J. L., Sherman D. H. (2012) Biochemical and structural characterization of germicidin synthase: analysis of a type III polyketide synthase that employs acyl-ACP as a starter unit donor. *Journal of the American Chemical Society*, 134, str. 7359-7366.
- Díaz-Tielas C., Graña E., Reigosa M. J., Sánchez-Moreiras A. M. (2016) Biological activities and novel applications of chalcones. *Planta Daninha*, 34, str. 607-616.
- Grund A. D., Ensign J. C. (1985) Properties of the germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* spores. *Journal of General Microbiology*, 131, str. 833-847.
- Gürtler H., Pedersen R., Anthoni U., Christophersen C., Nielsen P. H., Wellington E. M., Pedersen C., Bock K. (1994) Albaflavenone, a sesquiterpene ketone with a zizaene skeleton produced by a streptomycete with a new rope morphology. *Journal of Antibiotics*, 47, str. 434-439.
- Izumikawa M., Shipley P. R., Hopke J. N., O'Hare T., Xiang L. K., Noel J. P., Moore B. S. (2003) Expression and characterization of the type III polyketide synthase 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene synthase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, str. 510-515.
- Keulen G. van, Dyson P. J. (2014) Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Advances in Applied Microbiology*, 89, str. 217-266.
- Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A. (2000) *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, UK, 613 stran.
- Maxwell C. A., Hartwig U. A., Joseph C. M., Phillips D. A. (1989) Chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce *nod* genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology*, 91, str. 842-847.
- Moody S. C., Zhao B., Lei L., Nelson D. R., Mullins J. G. L., Waterman M. R., Kelly S. L., Lamb D. C. (2012) Investigating conservation of the albaflavenone biosynthetic pathway and CYP170 bifunctionality in streptomycetes. *FEBS Journal*, 279, str. 1640-1649.
- Petersen F., Zahner H., Metzger J. W., Freund S., Hummel R. P. (1993) Germicidin, an autoregulative germination inhibitor of *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1551. *Journal of Antibiotics*, 46, str. 1126-1138.
- Seipke R. F., Kaltenpoth M., Hutchings M. (2011) *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? *FEMS Microbiology Reviews*, 36, str. 862-876.
- Straková E., Bobek J., Ziková A., Řehulka P., Benada O., Řehulková H., Kofroňová O., Vohradský J. (2013) Global features of gene expression on the proteome and transcriptome levels in *S. coelicolor* during germination. *PLoS ONE*, 8, v tisku, DOI 10.1371/journal.pone.0072842.
- Xu Y., Vetsigian K. (2017) Phenotypic variability and community interactions of germinating *Streptomyces* spores. *Scientific Reports*, 7, v tisku, DOI 10.1038/s41598-017-00792-7.

Změna obsahu a distribuce přírodních látek s antioxidační aktivitou ve *Vitis vinifera* v průběhu vegetace a agrotechnických zásahů

L. Gharwalová, I. Kolouchová, J. Masák

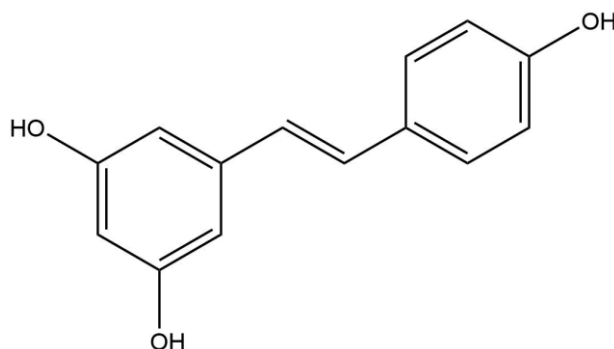
Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Pro co nejlepší využití odpadu, vznikajícího zelenými pracemi na vinohradu, je potřebné znát kdy je akumulace antioxidantů v rostlině nejvyšší. V průběhu vegetace produkují vinohrady nezanedbatelné množství odpadu, které by mohlo být levným zdrojem významných antioxidantů pro potravinářství nebo farmacii. Obsah těchto látek se ovšem v průběhu vegetace a vlivem agrotechnických zásahů mění. Rovněž je obsah fenolických antioxidantů v rostlině *Vitis vinifera* závislý na různých klimatických a agrotechnických faktorech. Cílem práce bude sledovat a vyhodnotit změny v obsahu a distribuci přírodních antioxidantů v rostlině *Vitis vinifera* v průběhu vegetace a během agrotechnických zásahů.

1. Úvod

Réva vinná (*Vitis vinifera*) je popínavá rostlina, jejíž plody se využívají k přímé konzumaci ale především pro výrobu vína. Vzhledem na to, že réva vinná obsahuje nezanedbatelná množství přírodních látek s antioxidačním charakterem, je i víno cenným zdrojem těchto látek. Nejrozšířenějšími přírodními antioxidanty jsou fenolové látky, mezi které radíme i flavonoidy a stilbenoidy. Stilbenoidy disponují významnými biologickými účinky a mezi jejich nejvýznamnější zástupce patří resveratrol (Obr. 1) a jeho glykosidická forma polydatin.



Obr. 1 Struktura resveratrolu

Obsah těchto látek v rostlině je závislý především na klimatických podmínkách ale může být ovlivněn i agrotechnickými zásahy pěstitelů během roku. Také části, které byly vystaveny živému či neživému stresu obsahují více antioxidantů. Mezi stresy, které zvyšují obsah

antioxidantů v révě, se řadí např. některé infekce (především plísňové), expozice ultrafialovému záření, ozónový stres nebo mechanické poškození.

Během roku vinařství produkuje odpady a to při výrobě vína jako i při zelených pracích na vinici. Při zpracování vinných hroznů dochází k produkci vedlejších produktů, jako jsou třapiny, kaly a matoliny. Vedlejší produkty ze zpracování révy vinné během zelených prací vznikají především při osečkování vinohradu a při řezu révy v zimních měsících. Tyhle odpady nemají další využití a můžou představovat zátěž pro životné prostředí. Tenhle odpad by ovšem mohl představovat významný zdroj fenolických sloučenin, které by mohly být dál využívány, například jako přísada do potravin, nejčastěji za účelem prodloužení jejich trvanlivosti.

2. Odpad z vinic

Období vegetace u *Vitis vinifera* tvoří období slzení, rašení, růst letorostů, kvetení, vývoj a zrání hroznů a končí vyzráváním dřeva. Období vegetace tedy začíná od začátku jara a končí na podzim, kdy klesnou teploty pod 10°C. Během vegetačního období vzniká zelenými pracemi (ometání kmínků, redukce počtu letorostů, vylamování fazochů, osečkování, redukce násady hroznů) na vinohradu nezanedbatelné množství odpadu, především letorostů a listů, který je nejčastěji kompostován.

V případě letorostů je možno je zpracovat na štěpky, které mohou být dále využité. Díky svému složení se v současné době naskýtá možnost využít letorosty jako potenciální zdroj antioxidantů. Ve výhonech byl potvrzen výskyt nejen bílkovin, sacharidů a minerálních látek, ale právě i řady biologicky aktivních polyfenolů (Çetin a kol., 2011, Karacabey a Mazza, 2010, Soral a kol., 2015). Neméně významný obsah těchto látek byl rovněž potvrzen v listech révy vinné (Farhadi a kol., 2016, Melzoch a kol., 2001).

Dle Evropské unie by se s vinohradnickým odpadem mělo hospodařit tak, aby se chránila voda, půda, krajina a její biodiverzita (EC 491/2009). Jako následek byl poslední roky zaznamenaný vzrůstající zájem o alternativní řešení pro využití a valorizaci vedlejších produktů, čímž by se dosáhlo ekonomických, sociálních i environmentálních výhod (Devesa-Rey a kol., 2011, Chouchouli a kol., 2013, Lavelli a kol., 2014).

3. Výskyt antioxidantů

Části rostliny, které byly vystaveny živému, či neživému stresu obsahují více antioxidantů. Obsah fenolických antioxidantů ve víně a rostlině *Vitis vinifera* je také závislý na odrůdě (Cantos a kol., 2002, Ortega a kol., 2008) a podmínkách pro růst rostliny. Antokyany jsou především obsaženy ve vakuolách a buněčné stěně slupky bobulí a jsou zodpovědné za barvu hroznů. Slupky obsahují i další antioxidanty z jiných skupin, jako například resveratrol

nebo kyselinu gallovou, které se extrahují během macerace hroznů do vína (Farhadi a kol., 2016). Resveratrol se nachází například i v letorostech a listech, které mohou být, místo kompostování, využity jako zdroj antioxidantů v doplňcích stravy pro člověka (Çetin a kol., 2011).

Wang a kol. (2010) sledovali expresi genu pro STS u mladé rostliny révy vinné, čímž zjistili, že k biosyntéze stilbenoidů dochází zejména v bobulích, v menším množství i v listech a ostatních orgánech rostliny. Maximální obsah resveratrolu byl nalezen ve floému letorostů, následovaný pupeny, kořeny, xylémem letorostů, výhonky a řapíky; v minimálním množství byl nalezen v listech, což naznačuje, že místo syntézy fenolů nemusí být shodný s místem jejich výskytu.

4. Vliv vnějších podmínek a změny během vegetace

Obsah některých polyfenolů odráží klimatické podmínky během vegetačního období jako i plísňové onemocnění, kterého riziko je vyšší ve vlhkých podmínkách (Melzoch a kol., 2001). Tak například dlouhodobé sucho způsobilo pokles fenolických kyselin (kyselina kávová, p-kumarová a kyselina ferulová) v listech a kořenech révy vinné (Król a kol., 2014).

Ovlivnit obsah antioxidantů v rostlině může také aplikace rostlinných hormonů a pesticidů. Přídavkem kyseliny gibberelové, regulátoru růstu rostlin, se zvýšil obsah fenolických látek a flavonoidů v listech, stoncích a úponcích rostliny, zatímco jejich obsah ve slupkách bobulí se snížil (Tian a kol., 2011). Hodnoty antioxidační aktivity, měřené pomocí metod ABTS a DPPH, se prokázaly vyšší u chorvatských biovín ve srovnání s konvenčními víny (Vrček a kol., 2011). Konvenční vína vznikají tradičním přístupem, kdy se v případě prvního výskytu mikrobiálního napadení používají postřiky pesticidy zatímco biovína vznikají autentickým (bio) přístupem, kdy není réva ošetřována postřikem pesticidy, ale jen alternativními biopřípravky.

Odpad vznikající během vegetačního období na vinici má rozdílný obsah fenolových látek. Mnohé práce (Fornara a kol., 2008, Obreque-Slier a kol., 2010) se již zabývaly obsahem antioxidantů ve *Vitis vinifera* během zrání bobulí. Zrání ovšem tvoří jen malou část vegetačního období rostliny a odpad, který by mohl být dál využitý je produkovaný od jara až po podzim.

5. Vlastní plán práce

V projektu se zaměříme na sledování a vyhodnocování změn obsahu a distribuce přírodních antioxidantů v rostlině *Vitis vinifera* v průběhu vegetace a během agrotechnických zásahů (postřiky). Z pohledu vedení révy vinné a přístupu k jejímu ošetřování existují dva základní přístupy. V projektu budou sledovány obsahy stilbenoidů (resveratrol a jeho analogy)

ve vzorcích pocházejících z vinohradů s oběma typy přístupů ošetřování révy. Zjištěním změn v obsahu a distribuci přírodních látek s antioxidační aktivitou ve *Vitis vinifera* bychom mohli přispět k využití vedlejších produktů zemědělské produkce.

V projektu se zaměříme na sledování obsahu látek v letorostech ze zimního řezu révy a v rašících letorostech při ometání kmínků. Také bude sledována distribuce vybraných látek při vlivu agrotechnických zásahů (postřiky). Pro posouzení schopnosti reakce révy vinné na postřikové látky z pohledu obsahu antioxidantů budou analyzovány vzorky z vinohradů s konvenčním přístupem pěstování révy a s ekologickým přístupem. V analýzách bude sledován obsah celkových polyfenolů, antiradikálová aktivita (DPPH) a koncentrace vybraných polyfenolů s antioxidační aktivitou.

6. Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2017).

7. Literatura

- Cantos, E., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. (2002) Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by lc–dad–ms–ms, *J Agric Food Chem*, 50, str. 5691-5696.
- Çetin, E.S., Altinöz, D., Tarçan, E., Göktürk Baydar, N. (2011) Chemical composition of grape canes, *Industrial Crops and Products*, 34, str. 994-998.
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J.L., Barral, M.T., Cruz, J.M., Moldes, A.B. (2011) Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling, *Waste Management*, 31, str. 2327-2335.
- European Committee for Standardization (2008) EN 14214.
- Farhadi, K., Esmailzadeh, F., Hatami, M., Forough, M., Molaie, R. (2016) Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran, *Food Chem*, 199, str. 847-855.
- Fornara, V., Onelli, E., Sparvoli, F., Rossoni, M., Aina, R., Marino, G., Citterio, S. (2008) Localization of stilbene synthase in *Vitis vinifera* L. during berry development, *Protoplasma*, 233, str. 83-93.
- Chouchouli, V., Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Karvela, E., Makris, D.P., Karathanos, V.T. (2013) Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts, *LWT - Food Sci Techno*, 53, str. 522-529.
- Karacabey, E., Mazza, G. (2010) Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology, *Food Chemistry*, 119, str. 343-348.
- Król, A., Amarowicz, R., Weidner, S. (2014) Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress, *Acta Physiol Plant*, 36, str. 1491-1499.
- Lavelli, V., Sri Harsha, P.S., Torri, L., Zeppa, G. (2014) Use of winemaking by-products as an ingredient for tomato puree: the effect of particle size on product quality, *Food Chem*, 152, str. 162-168.
- Melzoch, K., Hanzlíková, I., Filip, V., Buckiová, D., Šmidrkal, J. (2001) Resveratrol in parts of vine and wine originating from Bohemian and Moravian vineyard regions, *Agric conspec sci*, 66, str. 53-57.

- Obreque-Slier, E., Pena-Neira, A., Lopez-Solis, R., Zamora-Marin, F., Ricardo-da Silva, J.M., Laureano, O. (2010) Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carmenere and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening, *J Agric Food Chem*, 58, str. 3591-3599.
- Ortega, T., De La Hera, E., Carretero, M.E., Gómez-Serranillos, P., Naval, M.V., Villar, A.M., Prodanov, M., Vacas, V., Arroyo, T., Hernández, T., Estrella, I. (2008) Influence of grape variety and their phenolic composition on vasorelaxing activity of young red wines, *Eur Food Res Technol*, 227, str. 1641.
- Soural, I., Vrchotová, N., Tříška, J., Balík, J., Horník, Š., Cuřínová, P., Sýkora, J. (2015) Various extraction methods for obtaining stilbenes from grape cane of *Vitis vinifera* L, *Molecules*, 20, str. 6093-6112.
- Tian, S.F., Wang, Y., Du, G., Li, Y.X. (2011) Changes in contents and antioxidant activity of phenolic compounds during gibberellin-induced development in *Vitis vinifera* L. 'Muscat', *Acta Physiol Plant*, 33, str. 2467-2475.
- Vrček, I.V., Bojić, M., Žuntar, I., Mendaš, G., Medić-Šarić, M. (2011) Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes, *Food Chem*, 124, str. 354-361.
- Wang, W., Tang, K., Yang, H.-R., Wen, P.-F., Zhang, P., Wang, H.-L., Huang, W.-D. (2010) Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation, *Plant Physiol Biochem*, 48, str. 142-152.

Možnosti využití odhořčených chmelových materiálů v pivovarství

V. Hanko, L. Jelínek, P. Dostálek

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Zbytky po výrobě chmelových produktů (granulí či extraktů), nemají v současnosti žádné širší technologické využití. Vzhledem k tomu, že je těchto odhořčených chmelových materiálů produkováno relativně velké množství, je v poslední době zájem o nalezení způsobů jejich uplatnění v průmyslu.

Bylo zjištěno, že některé tyto materiály obsahují, v porovnání s chmelovými extrakty a peletami, velké množství polyfenolů a prenylovaných flavonoidů, které vykazují pozitivní technologické vlastnosti i příznivé účinky na lidské zdraví. Díky nim lze tyto zbytky využít nejen v pivovarství, ale například i ve farmaceutickém či kosmetickém průmyslu.

Odhořčené chmelové materiály lze využít v různých podobách (pevná forma či extrakty) pro urychlení některých technologických kroků horké i studené fáze výroby piva (scezování sladiny či sedimentace kvasinek), což ve výsledku může vést ke snížení finanční náročnosti výroby a prodloužení doby trvanlivosti piva. Jejich aplikací v procesu výroby piva lze navíc zvýšit antioxidační kapacitu piva a pravděpodobně také obsah zdraví prospěšných prenylovaných flavonoidů. Zásadní výhodou použití odhořčeného chmelového materiálu je skutečnost, že by nemělo porušovat legislativní omezení, například chráněné zeměpisné označení „České pivo“. Vzhledem k tomu, že použití odhořčených chmelových materiálů má pozitivní vliv na technologii výroby piva a také na jeho fortifikaci zdraví prospěšnými látkami, má tento materiál vysoký potenciál pro aplikaci v pivovarském průmyslu.

Působení anti-biofilmových látek na gramnegativní bakterie

N. Holovacka, M. Paldrychová, J. Masák

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Bakterie mají schopnost vytvářet heterogenní strukturovaná společenství adherující k povrchu, produkující extracelulární polymerní matici a přetrvávající takto ve formě biofilmu. Tvorba biofilmu v lidském těle umožňuje bakteriím lépe odolávat reakcím imunitního systému a účinkům běžně používaných antimikrobiálních látek. Přispívá k tomu mimo jiné i vysoká hustota populace mikroorganismů v biofilmu, a s ní související mezibuněčná komunikace prostřednictvím signálních molekul neboli quorum sensing (QS). QS bakteriím umožňuje mimo jiné expresi genů zodpovědných za produkci virulentních faktorů. Možným řešením tohoto problému je aplikace přírodních biologicky aktivních látek (N-acetylcysteinu nebo cinnamaldehydu) interferujících s QS systémy bakterií.

1. Quorum sensing a jeho vliv na tvorbu biofilmu gramnegativních bakterií

Quorum sensing (QS) je mezibuněčný komunikační systém, který zahrnuje produkci, detekci a reakci na extracelulární signální molekuly zvané autoinduktory. Autoinduktory se hromadí v prostředí se zvyšující se hustotou bakteriální populace. Mikroorganismy na přítomnost autoinduktorů reagují jejich vazbou na příslušné receptory a změnou v genové expresi. Mezi procesy ovládané QS patří bioluminiscence, sporulace, kompetence a sekrece virulentních faktorů, jako je produkce antibiotik nebo tvorba biofilmu.

Hlavní skupinu autoinduktorů gramnegativních bakterií představují N-acyl-homoserin laktony (AHL). Jejich produkce je závislá na s-adenosylmethioninu, jakožto substrátu. Jsou složeny z homoserin laktonového kruhu substituovaného postranním řetězcem v délce C₄-C₁₈, často modifikovaným v poloze C₃ (Ng a Bassler 2009).

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa je gramnegativní bakterie, patřící do skupiny oportunních patogenů, které se významnou měrou podílejí na vzniku nosokomiálních infekcí. Představuje riziko zejména pro pacienty trpící cystickou fibrózou, pacienty se třetím stupněm popálenin a také pro pacienty, kteří mají v těle zavedeny implantáty (naprosto běžné jsou infekce močových cest po implantaci močového katétru). Rezistence této bakterie k antimikrobiálním látkám je způsobena zejména nízkou propustností vnější membrány, přítomností řady efluxních pump a tvorbou degradačních enzymů (Gellatly a Hancock 2013).

Pro bakterii *Pseudomonas aeruginosa* jsou typické tři vzájemně propojené a vysoce organizované QS systémy: dva systémy typu LuxI/LuxR a jeden s názvem *Pseudomonas* chinolon signal (PQS). V prvním systému typu LuxI/LuxR dochází k produkci N-(3-oxododekanoyl)-L-homoserin laktonu, který je klíčovým faktorem během maturace a diferenciace biofilmu a při syntéze enzymu proteázy a exotoxinu A, způsobujících krvácení a nekrózu tkání během infekčního procesu. V rámci druhého systému je produkován N-butyryl-L-homoserin lakton, který mimo jiné řídí produkci rhamnolipidů, proteázy, elastázy a pyocyaninu (Rutherford a Bassler 2012). Signální molekula 2-heptyl-3-hydroxy-4-chinolon popsána v roce 1999 (Pesci a kol. 1999) se rovněž podílí na řízení biosyntézy a sekreci pyocyaninu, dále významným způsobem ovlivňuje závažnost a průběh infekcí močových cest, způsobených bakterií *P. aeruginosa* (Bala a kol. 2013). U klinických izolátů *P. aeruginosa* může být funkce systémů typu LuxI/LuxR nahrazena jiným QS systémem. IQS quorum sensing systém byl objeven v roce 2013 a jeho centrální signální molekula byla popsána jako 2-(2-hydroxyfenyl)-thiazol-4-karbaldehyd. Díky produkci tohoto signálu může být exprese virulentních faktorů zachována i v případě, že produkce signálních molekul typu AHL zůstává zachována (Lee a kol. 2013, Lee a Zhang 2015).

1.2 *Serratia marcescens*

Rod *Serratia* představuje gramnegativní, pohyblivé tyčinkovité bakterie schopné kolonizace široké škály povrchů, vyskytují se ve vodě, v půdě na povrchu rostlin a potravin. Stejně jako bakterie *P. aeruginosa* se řadí mezi oportunní patogeny a původce nosokomialních infekcí (Morohoshi a kol. 2007).

Systém QS využívají tyto bakterie k regulaci swarming motility (rychlý, koordinovaný pohyb bakteriální populace za účelem kolonizace nutričně bohatších povrchů), produkci prodigiosinu (červené barvivo, produkováné při limitaci růstu fosfáty za účelem zlepšení růstu buněk), a v neposlední řadě k regulaci tvorby biofilmu (Labbate a kol. 2004). Mezi nejvíce zastoupené signální molekuly patří u rodu *Serratia* N-hexanoyl-L-homoserin laktony a N-3-oxohexanoyl-L-homoserin laktony, některé kmeny produkují také N-butanoyl-L-homoserin laktony (Morohoshi a kol. 2007).

2. Regulace tvorby biofilmu gramnegativních bakterií prostřednictvím interference s QS systémy

Objev bakteriálních komunikačních systémů, jako je QS, představuje novou příležitost v léčbě bakteriálních infekcí se zaměřením na vnitřní regulaci buněčných procesů namísto dosud používaných inhibitorů růstu. Látky interferující s QS systémy mohou představovat novou generaci antimikrobiálních látek (Hentzer a kol. 2002, Hentzer a kol. 2003).

2.1 *Použití esenciálních olejů*

Esenciální oleje neboli vonné silice jsou těkavé, přírodní sloučeniny s charakteristicky výrazným aroma. Mezi významné zdroje esenciálních olejů a jejich složek s anti-biofilmovým účinkem patří oregano (karvakrol), koriandr (linalool), anýz (anetol), hřebíček (eugenol), tymián (thymol), skořicovník čínský (cinnamaldehyd), kajeput střídavolistý (terpinen-4-ol, pinen), známý jako tea tree a další (Gill a Holley 2004).

2.1.1 Cinnamaldehyd

Zajímavou složkou esenciálního oleje skořicovníku je cinnamaldehyd. Je to fenyylpropanoid izolovaný z kůry rostliny, který se v přírodě vyskytuje jako trans izomer. Jedná se o nažloutlou tekutinu s charakteristickým kořeněným zápachem, silně připomínajícím skořici. Tato sloučenina má řadu zajímavých využití zejména v potravinářství, jako vonná a chuťová látka nebo v zemědělství, jako fungicid. Tento skořicový aldehyd však vykazuje také anti-bakteriální, anti-biofilmovou a QS inhibiční aktivitu po aplikaci růst inhibujících koncentrací. Předpokládaný mechanismus účinku spočívá v permeabilizaci buněčných membrán, inhibici produkce extracelulární polymerní matrice, ale také inhibici syntézy nukleových kyselin, proteinů a regulačních mechanismů bakterií. Cinnamaldehyd snižuje aktivitu DNA-vazebného místa LuxR receptoru, tím dochází k fenotypovým změnám, jako je snížení produkce virulentních faktorů a zvýšení citlivost na stresové podmínky (Kalia a kol. 2015).

2.2 *Použití dalších přírodních látek s anti-biofilmovými účinky*

Příroda dále disponuje celou řadou unikátní chemické sloučenin s výraznou antibiofilmovou aktivitou. Mezi tyto látky patří například antioxidanty (resveratrol), polysacharidy (chitosan), antimikrobiální peptidy, imidazolové deriváty, indolové deriváty a další (Rabin a kol. 2015).

2.2.1 N-acetylcystein

N-acetylcystein je látka odvozená od aminokyseliny cysteinu, jedná se o běžně používané mukolytické činidlo, využívané při léčbě pacientů s chronickou bronchitidou. Pozitivní účinky léčby N-acetylcysteinem jsou dány jeho schopností rozpouštět hleny štěpením disulfidických vazeb v proteinech, stejně jako schopností inhibovat tvorbu biofilmu (El-Feky a kol. 2009).

Antimikrobiální aktivita N-acetylcysteinu může být spojena s kompetitivní inhibicí utilizace cysteinu, reakcí sulfhydrylových skupin s bakteriálními proteiny, nebo poruchou intracelulární redoxní rovnováhy s potenciálními nepřímými účinky na buněčný metabolismus a signální dráhy. Porucha mikrobiální fyziologie, indukovaná přítomností N-acetylcysteinu, by mohla představovat klíčový faktor zapříčiňující inhibici tvorby biofilmu. Aktivita N-acetylcysteinu, spočívající v podpoře rozptýlení předem vytvořených biofilmů, může souviset s narušením mikrobiální fyziologie přímo souviset (Blasi a kol. 2016). Dále působí N-acetyl-cystein na produkci pyocyaninu jakožto virulentního faktoru (Hasanin a Omri 2014).

3. Závěr

Zvyšující se rezistence bakterií k používaným antibiotikům soustřeďuje stále větší pozornost na výzkum a vývoj nových léčiv. Tato strategie je však velice nákladná, proto se v poslední době zvyšuje zájem o studium a využití přírodních látek jakožto možných terapeutických prostředků. Látky izolované z rostlin se zdají být vhodnou alternativou, jelikož rostlinné druhy obsahují širokou škálu sloučenin, pomocí kterých se rostliny v přírodě brání přítomnosti mikrobiálních společenství. Mezi tyto látky patří např. cinnamaldehyd obsažený v kůře a listech skořicovníku nebo mukolytikum N-acetylcystein (derivát L-cysteinu s antioxidačními účinky).

4. Literatura

Bala, A.; Gupta, R. K.; Chhibber, S.; Harjai, K., Detection and quantification of quinolone signalling molecule: A third quorum sensing molecule of *Pseudomonas aeruginosa* by high performance-thin layer chromatography. *Journal of Chromatography B* **2013**, 930, 30-35.

Blasi, F.; Page, C.; Rossolini, G. M.; Pallecchi, L.; Matera, M. G.; Rogliani, P.; Cazzola, M., The effect of N-acetylcysteine on biofilms: Implications for the treatment of respiratory tract infections. *Respiratory Medicine* **2016**, 117, 190-197.

El-Feky, M. A.; El-Rehewy, M. S.; Hassan, M. A.; Abolella, H. A.; Abd El-Baky, R. M.; Gad, G. F., Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. *Polish Journal of Microbiology* **2009**, 58 (3), 261-7.

Gellatly, S. L.; Hancock, R. E., *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease* **2013**, 67 (3), 159-173.

Gill, A. O.; Holley, R. A., Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and environmental microbiology* **2004**, 70 (10), 5750-5755.

Hasanin, A.; Omri, A., Liposomal N-acetylcysteine Modulates the Pathogenesis of *P. aeruginosa* Isolated from the Lungs of Cystic Fibrosis Patient. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* **2014**, 5 (4), 1.

Hentzer, M.; Givskov, M.; Parsek, M. R., Targeting quorum sensing for treatment of chronic bacterial biofilm infections. *Laboratory Medicine* **2002**, 33 (4), 295-306.

Hentzer, M.; Wu, H.; Andersen, J. B.; Riedel, K.; Rasmussen, T. B.; Bagge, N.; Kumar, N.; Schembri, M. A.; Song, Z.; Kristoffersen, P., Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO journal* **2003**, 22 (15), 3803-3815.

Kalia, M.; Yadav, V. K.; Singh, P. K.; Sharma, D.; Pandey, H.; Narvi, S. S.; Agarwal, V., Effect of cinnamon oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS one* **2015**, 10 (8)

Labbate, M.; Queck, S. Y.; Koh, K. S.; Rice, S. A.; Givskov, M.; Kjelleberg, S., Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of bacteriology* **2004**, 186 (3), 692-698.

Lee, J.; Wu, J.; Deng, Y.; Wang, J.; Wang, C.; Wang, J.; Chang, C.; Dong, Y.; Williams, P.; Zhang, L.-H., A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature chemical biology* **2013**, 9 (5), 339-343

Lee, J.; Zhang, L., The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell* **2015**, 6 (1), 26-41.

Morohoshi, T.; Shiono, T.; Takidouchi, K.; Kato, M.; Kato, N.; Kato, J.; Ikeda, T., Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-acylhomoserine lactone. *Applied and environmental microbiology* **2007**, 73 (20), 6339-6344.

Ng, W.-L.; Bassler, B. L., Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual review of genetics* **2009**, 43, 197-222.

Pesci, E. C.; Milbank, J. B.; Pearson, J. P.; McKnight, S.; Kende, A. S.; Greenberg, E. P.; Iglewski, B. H., Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 96 (20), 11229-11234.

Rabin, N.; Zheng, Y.; Opoku-Temeng, C.; Du, Y.; Bonsu, E.; Sintim, H. O., Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future medicinal chemistry* **2015**, 7 (5), 647-671.

Rutherford, S. T.; Bassler, B. L., Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2012**, 2 (11), a012427.

Kultivace bakterie *Salinispora tropica* a biologická aktivita extraktu karotenoidů

Z. Ježková, T. Brányik, M. Rumlová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

V současné době je velký rozvoj biotechnologie v oblasti mořských mikroorganismů. Jsou testovány různé mořské bakterie, řasy a to zejména jejich bioaktivní látky. Zajímavým druhem, jenž dosud nebyl zcela prozkoumán je *Salinispora tropica*. Jedná se o bakterii vyskytující se na mořských sedimentech v tropických a subtropických vodách. Produkuje řadu sekundárních metabolitů. Ve vegetativním stadiu vytváří oranžové kolonie produkující pigmenty (karotenoidy). Karotenoidy jsou v lipidech rozpustné látky tvořené ze 40 uhlíkového polyenového řetězce. U řady z nich byl prokázán antioxidačním účinkem. V posledních letech byla identifikována struktura nově objeveného karotenoidu sioxanthinu ze *S. tropica*. Jeho biologická aktivita není dosud známá. V této práci byly testovány alternativní zdroje dusíku v kultivačním médiu. Dále byla vyvinuta metodika extrakce a kvantifikace karotenoidů pomocí UV/VIS spektrofotometru. Karotenoidy rozpuštěné v tetrahydrofuranu byly testovány na lidských buněčných liniích (DU-145, PC-3, HEK-293, HeLa, Hep-G2, LNCap, MCF-7, KYSE-30 a KYSE-180). Pomocí fluorescenční sondy CM-H2DCFDA bylo optimalizováno stanovení reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Antioxidační účinky extraktu karotenoidů byly porovnány s účinky vyvolanými β -karotenem. Nejúčinnější antioxidační efekty byly pozorovány u linií KYSE-30, KYSE-180, LNCap, HeLa a MCF-7 v koncentraci extraktu 3 ng/ μ l.

1. Úvod

V současné době zažíváme velký rozvoj biotechnologie využívající mořské mikroorganismy. Jsou testovány různé mořské bakterie, řasy a to zejména jejich bioaktivní látky, které produkují. Mezi již průmyslově využívané se řadí řasa *Dunaliella salina* produkující β -karoten, známý jako účinný antioxidant (Chidambara a kol. 2005). Za zmínku stojí také *Streptomyces coelicolor*, s látkou aktinorodin (polyketidové antibiotikum), řadící se mezi aktinomycety (Abdelmohsen a kol. 2015).

1.1 Bakterie *Salinispora tropica*

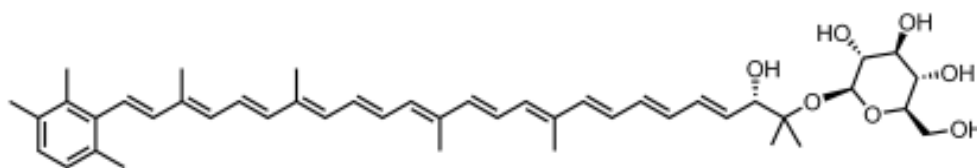
Velmi zajímavým druhem, jenž dosud nebyl zcela prozkoumán je také vláknitá bakterie *Salinispora tropica*. V laboratoři byla poprvé kultivována v roce 1989 a dle NCBI se řadí do řádu *Actinomycetales*, podřádu *Micromonosporineae* a čeledi *Micromonosporaceae* (Jensen a kol. 2005). V rámci tohoto projektu se zaměříme převážně na její vegetativní stádium, ve kterém vytváří oranžové kolonie produkující pigmenty - karotenoidy (Richter a kol. 2015).

1.1.1 Karotenoidy

Karotenoidy jsou barevné v lipidech rozpustné sloučeniny tvořené ze 40 uhlíkového polyenového řetězce. Jsou rozšířené v mnoha přírodních produktech od ovoce, zeleniny až po řasy a bakterii. Mají široké spektrum účinku. Používají se jako antioxidanty, antikarcinogeny, stimulanty imunitní odpovědi a barviva (Tinoi a kol. 2005). Mezi nejvýznamnější patří například β -karoten z již zmíněné řasy *D. salina*, astaxanthin produkovaný *Haematococcus pluvialis* či lutein z *Chlorella protothecoides* (Chidambara a kol. 2005, Guerin a kol. 2003, Shi a kol. 2000).

1.1.2 Sioxanthin

V posledních letech byla definována struktura nově objeveného pigmentu sioxanthinu z bakterie *S. tropica*. Pigment nebyl dosud izolován v dostatečném množství a nebyla popsána jeho biologická aktivita. Sioxanthin (Obr 1.) je terpen s amfifilní povahou, kterou způsobuje jeho glykosylovaná vazba na jednom konci řetězce a arylová skupina na druhém (Richter a kol. 2015). Dle jeho struktury a funkce jiného karotenoidu β -karotenu lze předpokládat jeho antioxidační aktivitu (ochranu buněk vůči poškození volnými radikály).



Obr 1. Sioxanthin (Richter a kol. 2015): (2'S)-1'-(β -D-glucopyranosyloxy)-3',4'- didehydro-1',2'-dihydro- ϕ,ψ -caroten-2'-ol

2. Experimentální část

2.1 Základní podmínky kultivace *S. tropica*

V práci byl požit kmen *Salinispora tropica* CNB-440. Výchozí kultivační podmínky pro kultivaci *S. tropica* byly: teplota 23°C, třepání na orbitální třepače při otáčkách 150 rpm a kultivace v základním médiu o složení (v g/l) 4 kvasniční extrakt, 2 pepton, 30 syntetická mořská sůl, 10 glukosa.

2.1.1 Optimalizace zdrojů dusíku v kultivačním médiu

Byly optimalizovány základní zdroje dusíku v kultivačním médiu *S. tropica* v Erlenmeyerových baňkách. Dle dostupné literatury (Contador a kol. 2015) a předchozích zkušeností byly jako potenciální zdroje dusíku vybrány: kvasničný extrakt, bakteriální pepton, sójový pepton, kukuřiční hydrolyzát, hydrolyzát peří, močovina, síran amonný a amoniak. U komplexních zdrojů dusíku byl stanoven celkový obsah dusíku v externí laboratoři (GEMATEST® s.r.o.). Jednotlivé zdroje dusíku byly do médií dávkovány na základě jejich obsahu dusíku. Každé médium mimo zdroje dusíku také obsahovalo 10 g/l glukosy a 30 g/l mořské soli. V průběhu kultivací byly odebrány vzorky, ve kterých bylo stanoveno množství biomasy gravimetricky.

Tab. 1: Zdroje dusíku, jejich množství v médiu a doba kultivace.

číslo	Zdroje dusíku	Koncentrace v médiu	Doba kultivace (den)	Produktivita (g/l·den)
1	Pepton ze sóji	7,31 g/l	13	0,0975
2	Pepton z masa	4,846 g/l	7	0,0972
3	Kvasniční extrakt	6,811 g/l	20	0,0856
4	Základní médium	4 g/l kvas. extrakt, 2 g/l pepton	14	0,0855
5	Hydrolyzát peří	257,9 ml/l	34	0,0382
6	Kukuřičný extrakt	42,722 g/l	34	0,0149
7	Síran amonný	3,41 g/l	28	0,0015
8	Amoniak	0,878 g/l	28	0,0006
9	Močovina	257,9 ml/l	28	0

2.2 Extrakce karotenoidů

Byla vyvinuta a optimalizována metodika pro extrakci karotenoidů. K lyofilizované biomase byly přidány balotinové kuličky. Směs byla kryta alobalem (karotenoidy se na přímém světle degradují) a 10 min vortexována. Ke vzorku byla přidána směs chloroform : methanol (1:1). Směs byla zahřívána 60 min. na vodní lázni o teplotě 56°C. Následovala filtrace a měření absorbance na UV/VIS spektrofotometru při vlnové délce 475 nm. Z výsledku měření bylo vypočítáno celkové množství karotenoidů v biomase. Množství karotenoidních pigmentů X ($\mu\text{g/g}$) vztažených na hmotnost biomasy bylo vypočteno dle vzorce:

$$X = \frac{1}{m} \cdot \frac{A}{\varepsilon} \cdot \frac{V_r}{L}$$

, kde m je hmotnost navážené biomasy (g), A je absorbance, ε je průměrný extinkční koeficient karotenoidních pigmentů 256 l/g.cm (Sen Gupta a kol. 2015), V_r je objem rozpouštědla (l) a L je délka kyvety (cm).

2.3 Testování antioxidační aktivity izolovaného extraktu karotenoidů

2.3.1 Typy buněčných linií

Byly použity tyto buněčné linie: HEK-293 ATCC® CRL-1573™, DU-145 ATCC® HTB-81™, HEP-G2 ATCC® HB-8065™, LnCaP ATCC® CRL-1740™, HeLa ATCC® CCL-2™, KYSE-180 ACC® 379, KYSE-30 ECACC 94072011 a MCF-7 ATCC® HTB-22™.

2.3.2 Příprava buněčných linií

Narostlá buněčná linie (maximálně 30. pasáž) v Petriho misce s průměrem 10 cm byly inkubovány a připravovány k experimentům metodikou dle literatury (Dulinska a kol. 2005).

2.3.2 Testování viability buněčných kultur

Extrakt karotenoidů byl odpařen do sucha a znovu rozpuštěn v tetrahydrofuranu (THF), ve směsi THF:ethanol (1:1), DMSO, hexanu nebo chloroformu stabilizovaného methanolem na požadovanou koncentraci. Se stejnými rozpouštědly byl připraven i zásobní roztok β -karotenu. Po proběhlé inkubaci (DMEM médiu s přidavkem 10% fetálního bovinního séra, 37 °C, 5% atmosféra CO₂) byly k buňkám přidávány zásobní roztoky karotenoidů, β -karotenu i samotná rozpouštědla a znovu uloženy k inkubaci na 24 hodin. Po této době byl přikapán sterilní zásobní

roztok resazurinu (15 mg/ml ve PBS) a proběhlo měření při 560 nm s emisním filtrem 590 nm v časech 0 h, 2,5 h a 4 h.

2.3.3 Testování interakce intracelulárních reaktivních kyslíkových částic s extraktem karotenoidů

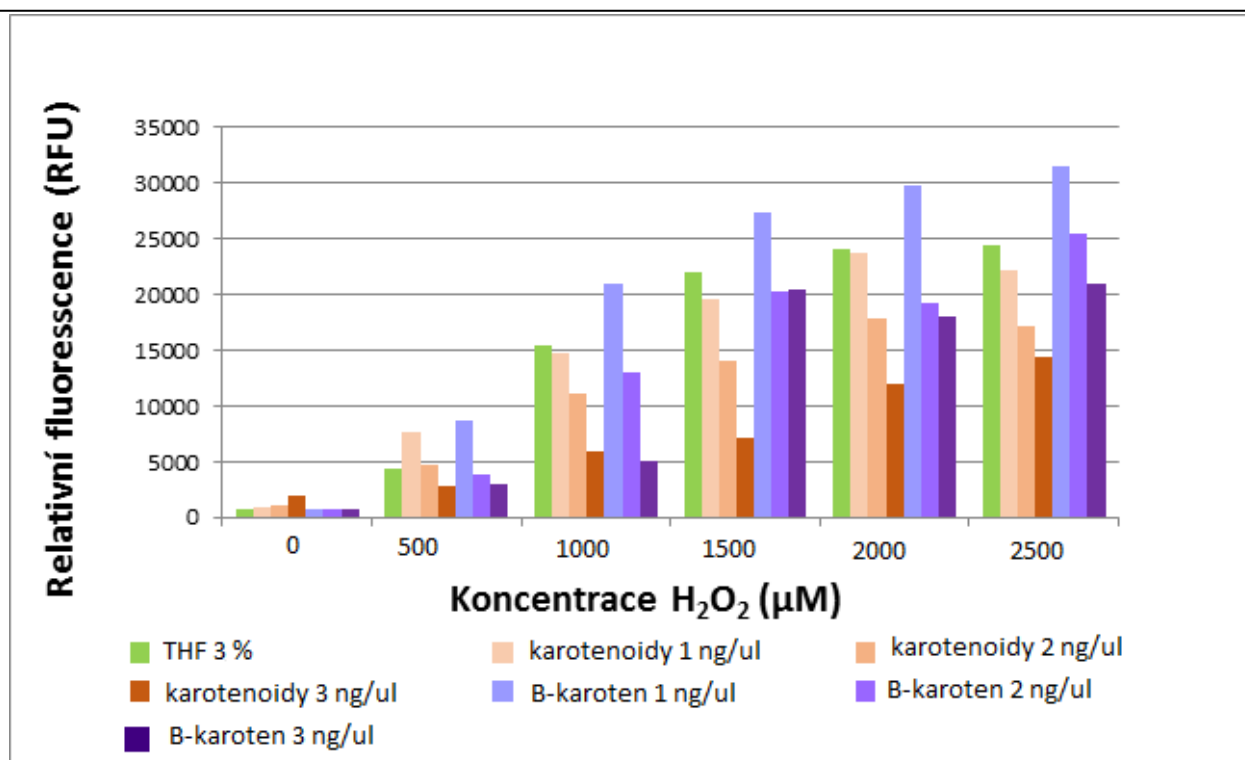
Po proběhlé inkubaci (použita 96-jamková destička s objem suspenze 400 μ l) byly k buňkám přidávány zásobní roztoky karotenoidů a β -karotenu v THF. Po přidavku byly buňky uloženy k inkubaci na 24 hodin. Po uplynutí doby byl přikapán 5 μ l 20 μ M roztoku sondy (5,8 μ g barviva CM-H2DCFDA v 10 μ l DMSO a 490 μ l PBS). V čase 30 minut od přidání sondy byl přidán peroxid vodíku a po 30-90 minutách proběhlo měření při 485 nm s emisním filtrem 535 nm. Práce probíhala dle protokolu přiloženého ke kitu dostupného online ze stránek (Invitrogen Molecular Probes™, 2006, on line).

3. Výsledky a diskuse

Kultivace *S. tropica* na alternativních zdrojích dusíku v médiu je možná. Ze studie vyplývá, že vhodné zdroje dusíku pro růst bakterie v závislosti na produktivitě jsou pepton ze sóji (0,0975 g/l·den), pepton z masa (0,0972 g/l·den) a kvasničný extrakt (0,0856 g/l·den). Produktivity bakterie v základním médiu byla 0,0855 g/l·den. Dalším alternativním zdrojem může být hydrolyzát peří (0,0382 g/l·den) již testovaný na *Pseudomonas sp.* P5 (Stiborová a kol. 2016). Výhodou je, že peří ze slepic je odpaním materiálem a příprava hydrolyzátu tedy není finančně nákladná.

Pro extrakci karotenoidů byla optimalizována již známá metodika uvedená v literatuře (Lichtenthaler a Buschmann 2001). Maximální výtěžek pigmentů v extraktu byl metodou extrakce stanoven na 819 μ g/g biomasy.

Antioxidační účinky extraktu karotenoidů byly testovány na vybraných buněčných liniích (DU-145, PC-3, HEK-293, HeLa, Hep-G2, LNCap, MCF-7, KYSE-30 a KYSE-180). Nejdříve byla testována rozpustnost β -karotenu a extraktu karotenoidů v řadě organických rozpouštědel (THF, směs THF:ethanol (1:1), DMSO, hexan, chloroformu stab. v methanolu). Jako nejvhodnější rozpouštědlo byl vybrán THF. Dále bylo stanoveno maximální množství THF v médiu (3 %), β -karotenu (2,68 ng/ μ l) a extraktu karotenoidů (3 ng/ μ l) pro zachování alespoň 90 % životaschopnosti buněčných linií.



Obr. 2.: Množství reaktivních kyslíkových částic po 90 minutách působení H₂O₂ (0 – 2500 μM) u buněčných linií LnCap v závislosti na relativní fluorescenci.

Na prostatických nádorových buňkách LnCap (Obr. 2) byl potvrzen lepší účinek extraktu karotenoidů o koncentraci 3 ng/μl než β-karotenu. Stejný vliv na vyvolaný oxidační stres byl zjištěn u buněčných linií: HeLa, LnCap, MCF-7, KYSE-30, KYSE-180. U linie HEK-293 byl stanoven lepší účinek β-karotenu v koncentraci 2 ng/μl. Tyto výsledky jsou nové a nebyly v literatuře dosud publikovány.

4. Závěr

Byly identifikovány alternativní zdroje dusíku v základním médiu určeném k růstu bakterie *S. tropica*. Dále byla vyvinuta a optimalizována metoda extrakce celkových karotenoidů z lyofilizované biomasy *S. tropica*. Získaný extrakt byl použit k určení antioxidačního účinku extrahovaných karotenoidů na vybraných rakovinných buněčných liniích. Výsledky potvrdily naši počáteční hypotézu, která byla založena na antioxidační aktivitě β-karotenu popsané v literatuře. Z naměřených dat vyplývá, že karotenoidy obsažené v *S. tropica* mají potenciál pro použití ve farmaceutickém průmyslu. Proto se v naší další studii zaměříme na izolování čistého sioxanthinu a testování jeho antioxidačního účinku.

5. Literatura

- Abdelmohsen R. U., Grkovic T., Balasubramanian S., Kamel S. M., Quinn J. R., Hentschel U. (2015) Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances* 33, 798 – 811.
- Chidambara M. N. K., Vanitha A., Rajesha J., Swamy M. M., Sowmya R. P., Gokare A. (2005) In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* — a green microalga. *Life Sciences* 76, 1381 – 1390.
- Contador A. C., Rodríguez V., Andrews A. B., Asenjo A. J. (2015) Genome-scale reconstruction of *Salinispora tropica* CNB-440 metabolism to study strain-specific adaptation. *Antonie van Leeuwenhoek* 108, 1075 – 1090.
- Dulinská J., Gil D., Zagajewski J., Hartwich J, Bodzioch M. (2005) Different effect of beta-carotene on proliferation of prostate cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1740, 189 – 201.
- Guerin M., Huntley E. M., Olaizola M. (2003) Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology* 21, 210 – 216.
- Invitrogen Molecular Probes (online). Poslední úpravy 2006, dostupné online z: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp36103.pdf>
- Jensen R. P., Gontang E., Mafnas Ch., Mincer J. T., Fenical W. (2005) Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental Microbiology* 7, 1039 – 1048.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C. (2001) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement UNIT F4.3 and Characterization by UV-VIS Spectroscopy (Current Protocols in Food Analytical Chemistry), John Wiley & Sons, Inc., New York, str. F4.3.1-F4.3.8.
- Sen Gupta S., Ghosh M. (2015) Synthesis, characterization, stability evaluation and release kinetics of fiber-encapsulated carotene nano-capsules. *Grasas y Aceites* 66, 441 – 462.
- Shi M. X., Zhang W. Z., Chen F. (2000) Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 312 – 318.
- Stiborova H., Branska B., Veselá T., Lovecká P., Stranska M., Hajslova J., Jiru M., Patakova P., Demnerova K. (2016) Transformation of raw feather waste into digestible peptides and amino acids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 91, 1629 – 1637.
- Tinoi J., Rakariyatham N., Deming L. R. (2005) Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry* 40, 2551 – 2557.
- Richter S. K. T., Hughes C. Ch., Moor S. B. (2015) Sioxanthin, a novel glycosylated carotenoid, reveals an unusual subclustered biosynthetic pathway. *Environmental Microbiology* 17, 2158 – 2171.

Vliv nanočástic kovů na projevy oxidačního stresu u jednobuněčných mikroorganismů

M. Nováková, M. Koukalová, A. Čejková

Ústav Biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

V posledních letech představují nanočástice základ mnohých technologických a biologických inovací. Zájem o jejich využití je dán především výhodnými fyzikálními, chemickými a biologickými vlastnostmi, které jsou dané jejich velikostí. Díky těmto vlastnostem jsou nanočástice schopné interagovat s buněčným povrchem a následně jimi pronikat. V mnohých případech dochází k narušení správného chodu intracelulárních procesů, které vedou ke zvýšené tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Toto narušení rovnováhy má za následek vznik oxidačního stresu a v případě nedostatečné produkce antioxidačních enzymů, zodpovědných za detoxikaci buňky, i k následné smrti buňky. Vzhledem k velkému uplatnění nanočástic vznikají rizika spojená s jejich používáním, zejména v uvolňování většího množství částic do životního prostředí.

Experimentální část je zaměřená na studium vývoje oxidačního stresu v eukaryotických buňkách (*Trichosporon cutaneum*) a sledování jejich morfologické změny po vystavení účinkům nanočástic zlata a stříbra.

1. Úvod

Nanočástice jsou klasifikované jako částice s alespoň jedním rozměrem 1 – 100 nm. Díky své malé velikosti mají specifické fyzikálně-chemické vlastnosti, a díky tomu se stávají stále více využívaným materiálem v různých technologických oblastech (Adams a kol., 2014). Jejich velikost má vliv na jejich specifický povrch a reaktivitu. Unikátní vlastností je fakt, že nanočástice se nechovají stejně, jako větší částice v chemických reakcích, ale mají tendenci být mnohem více reaktivní. Částice mají velké množství energie, což je dáno velkým poměrem povrchu k objemu, který mění jejich reaktivitu (Huber, 2005). Mezi nejčastěji využívané materiály v oblasti nanotechnologie patří kovové nanočástice a uhlíkové nanočástice v podobě fullerenů nebo nanotrubiček.

Zlato je ušlechtilý kov schopný přenášet velké množství viditelného světla a zároveň účinně odrážet infračervené světlo. Nanočástice zlata vykazují vlastnosti, které se zásadně liší od samotného zlata jako hmoty. Díky své malé velikosti pronikají do buněk odlišnými mechanismy a mnohem rychleji v porovnání s většími molekulami, kde dokáží selektivně upravovat buněčné procesy a následně působit jako vnitřní léčivé prostředky (Fakruddin a kol., 2012).

Stříbrné nanočástice mají potenciál využití jako antimikrobiální činidlo v lékařství a v různých komerčních odvětvích díky své biologické aktivitě a antimikrobiální účinnosti (Rai a kol., 2009). Mají letální účinky na bakterie a kvasinky při použití poměrně nízkých koncentrací (mg/l), kdy tyto nízké koncentrace nejsou toxické pro vyšší organismy (Kvitek a kol., 2011). Čím je menší rozměr částic, tím se jejich toxicita zvyšuje, protože dokáží lépe pronikat skrz póry cytoplasmatické membrány (Kim a kol., 2012). Také ještě nebyla prokázána rezistence bakterií vůči stříbrným nanočásticím, díky komplexnímu působení nanočástic na několika místech metabolismu najednou. Díky tomu mohou být stříbrné nanočástice považovány za jedny z nejlepších antibakteriálních činidel (Kvitek a kol., 2011).

Aktivita a vliv jednotlivých nanočástic se liší v závislosti na použitém objemu, koncentraci, tvaru nanočástic a interagujících mikroorganismech. Při použití vyšších koncentrací se jejich antimikrobiální aktivita zvyšuje a zahrnuje:

- produkci reaktivních forem kyslíku a dusíku (peroxynitráty), které poškozují buněčné komponenty

- poškození buněčné membrány
- inhibici enzymové aktivity
- inhibici syntézy DNA
- narušení signální transdukce (Huh a Kwon, 2011; Pissuwan a kol., 2010)

Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou výsledkem částečné redukce atmosférického kyslíku (O_2). Mezi základní formy buněčných ROS patří singletový kyslík ($^1O_2$), peroxid vodíku (H_2O_2), superoxid ($O_2^{\cdot-}$) a hydroxylový radikál ($HO^{\cdot}$), které jsou charakteristické svým poločasem rozpadu a redukčním potenciálem. Jednotlivé druhy radikálů mohou být velmi reaktivní a mnohonásobně oxidovat buněčné komponenty (proteiny, lipidy, DNA a RNA) (Cruz de Carvalho, 2008). Pokud je hladina ROS vyšší, než kapacita obranného systému buňky, dochází k oxidačnímu stresu (Ray a kol., 2012). Extrémně toxické hladiny oxidačního stresu vedou k poškození mitochondriální membrány a disfunkci elektronového řetězce, což má za následek smrt buňky (Manke a kol., 2013).

2. Materiál a metody

2.1. Použité mikroorganismy a kultivační podmínky

Kvasinka *Trichosporon cutaneum* CCY 30.5.10 byla získána ze sbírky Culture Collection of Yeast Ústavu chemie Slovenské akademie věd.

Buněčná populace byla uchovávána v 50 % roztoku glycerolu v kryokonzervách při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Inokulum bylo připraveno zaočkováním zásobní kultury do 100 ml sterilního kapalného média (živný bujón, 8 g/l) a kultivováno orbitální třepačce (48 hodin, 30 °C, 100 rpm). Po kultivaci byla buněčná suspenze separována centrifugací a resuspendována v čerstvém médiu.

2.2.Nanočástice

Vodné roztoky nanočástic zlata a stříbra (nanoAu, nanoAg) s průměrnou velikostí 20 nm byli stabilizované 10 % polyethylenglykolem. Používané typy nanočástic byly připravené doc. Ing. Petrem Slepíčkou, PhD. (Ústav inženýrství pevných látek, VŠCHT).

2.3.Sledování vlivu nanočástic stříbra a zlata na kvasinku *Trichosporon cutaneum*

Inokulum bylo pipetované do zkumavek s nanočásticemi stříbra nebo zlata tak, aby v celkovém objemu 2 ml byla požadovaná koncentrace nanočástic a aby suspenze buněk vykazovala hodnotu optické density $OD_{600\text{ nm}} = 0,600 \pm 0,005$. V uskutečněných experimentech byly použité koncentrace nanočástic vybrané na základě předchozích výsledků, při kterých se projeví jejich toxické účinky na buňky (nanoAg – 31 mg/l, nanoAu – 140 mg/l). Buněčná populace bez nanočástic sloužila jako kontrola. Buněčná populace byla vystavená účinkům nanočástic po dobu 4, 8, 16, 20 a 24 hodin.

2.4.Detekce ROS v buňkách pomocí průtokové cytometrie

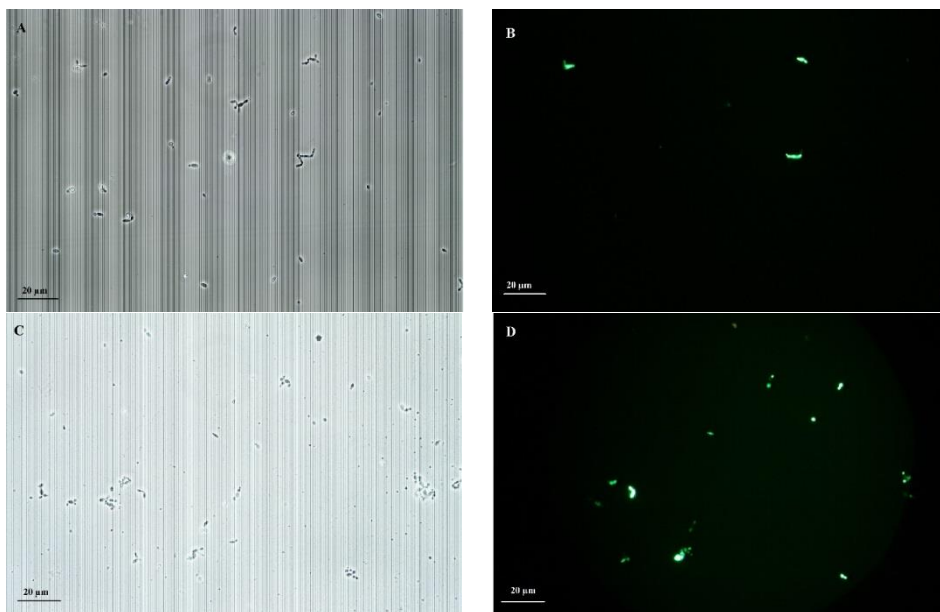
Pomocí fluorescenčního barvení byla sledovaná akumulace ROS v buňkách připravených podle postupu popsání v předchozí kapitole. Byli sledované dvě paralely vzorků, kdy pouze jedna paralela obsahovala fluorescenční sondu. Po expozici nanočástic byly buňky odstředěny (9000 g, 10 min, 10 °C) a 2x promyty v 1 ml 0,15 M fosfátového pufru (pH=7,2). Následně byl přidán 1 µl 2,7-dichlorfluorescein diacetátu (DCFH-DA) a reakce probíhala při laboratorní teplotě bez přístupu světla po dobu 15 minut. Fluorescenční sonda DCFH-DA je lipofilního charakteru a dobře prostupuje cytoplasmatickou membránou buněk do cytosolu, kde je esterasami deacetylována na nefluorescenční sloučeninu 2,7-dichlorfluorescein (DCFH), ze které oxidací molekulami ROS vzniká fluorescenční sloučenina 2,7-dichlorfluorescein (DCF). Míra fluorescence je přímo úměrná koncentraci ROS v cytosolu. Fluorescenci je možné měřit při vlnové délce excitačního maxima $\lambda=488\text{ nm}$ a při vlnové délce emisního maxima $\lambda=525\text{ nm}$ (Halliwell a Whiteman, 2004). Po inkubaci byly buňky odstředěny (9000g, 10min, 10 °C) a 2x promyty v 1 ml chlazené demineralizované vody a resuspendované v 1 ml 0,15 M fosfátového pufru (pH=7,2). Míra fluorescence byla stanovena pomocí průtokového cytometru.

Elektronovým mikroskopem Nikon Eclipse E400 s digitálním fotoaparátem Canon EOS 1100D byly pořízeny fotografie buněčné populace před a po expozici nanočástic.

3. Výsledky

3.1. Fluorescenční mikroskopie

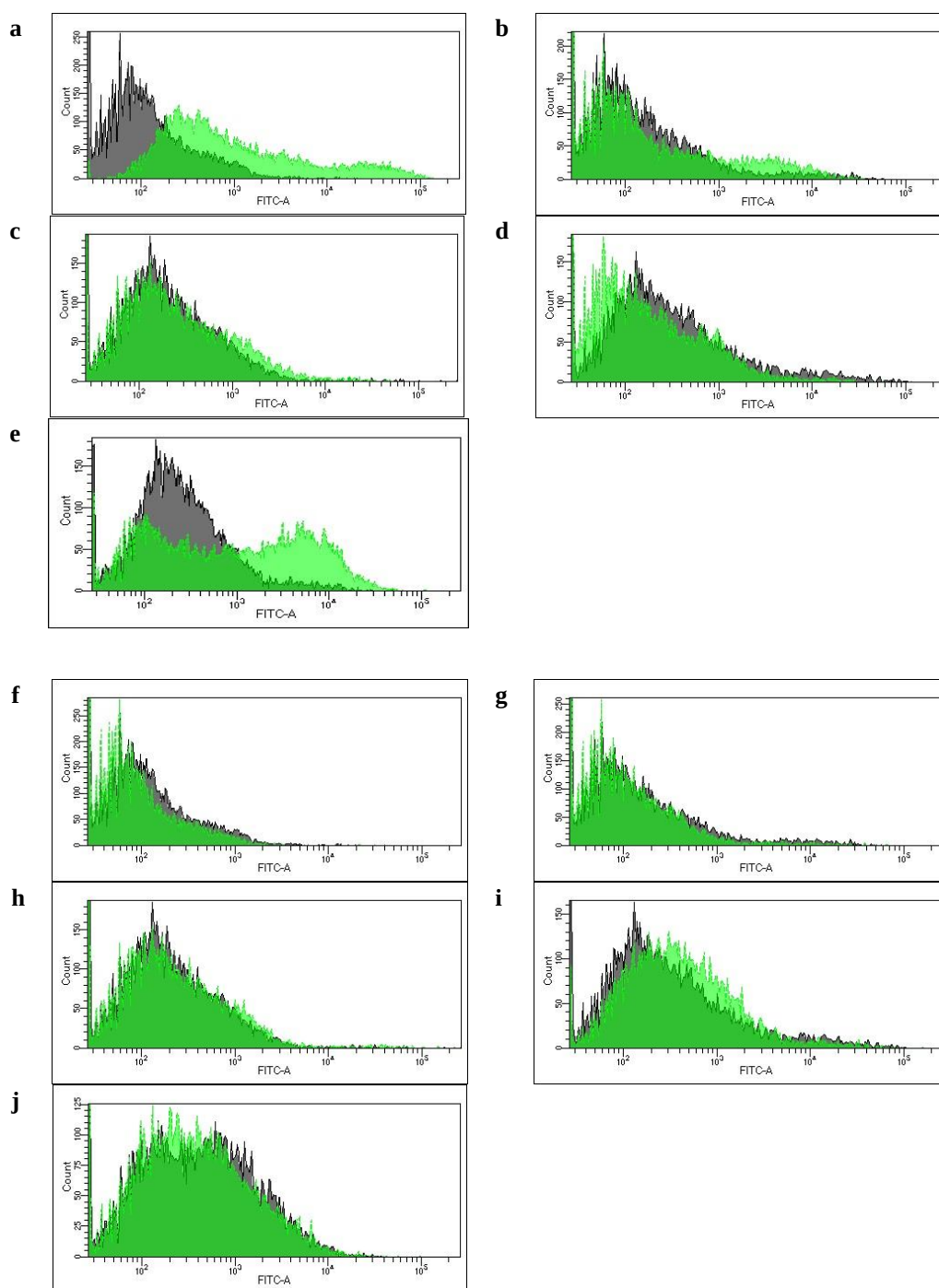
Pomocí fluorescenční mikroskopie byly pořízené fotografie buněčné populace *T. cutaneum* před a po 24 hodinovém působení nanoAg v koncentraci 31 mg/l (Obr. 1). V případě buněčné populace vystavené působení nanočástic je viditelná vyšší intenzita fluorescence, což ukazuje na zvýšenou hladinu ROS ve sledovaných buňkách.



Obr. 1 Produkce ROS v buňkách *T. cutaneum*. Buněčná populace A) neexponovaná a C) exponovaná, nanoAg (31 mg/l) po 24 hodinovém působení; světelný mikroskop. Produkce ROS u B) neexponované a D) exponované buněčné populace, nanoAg (31 mg/l) po 24 hodinovém působení, fluorescenční mikroskop. Celkové zvětšení 200 x.

3.2. Časový průběh vlivu nanoAg a nanoAu na vývoj oxidačního stresu u *T. cutaneum*

Pro detekci kyslíkových radikálů, akumulovaných v cytosolu buněk, byla použita fluorescenční sonda 2,7-dichlorfluorescein. Míra fluorescence byla detekovaná pomocí průtokové cytometrie a její intenzita je přímo úměrná množství kyslíkových radikálů. Hladina ROS exponovaných buněk byla porovnávána s buňkami, které nebyly vystavené účinkům nanoAg nebo nanoAu. Na Obr. 2a je viditelné, že po 4 hodinové expozici buněk účinkům nanoAg dochází ke zvýšení intenzity fluorescence, což odpovídá zvýšené hladině ROS v buňkách. Po 8, 16 a 20 hodinách dochází ke snížení intenzity fluorescence (Obr. 2b, c, d), což je pravděpodobně způsobené obrannými mechanismy, kdy se buňky snaží vyrovnat hladinu ROS. Oproti tomu při expozici buněk nanoAu dochází ke zvýšení hladiny ROS až po 20 hodinách (Obr. 2i). Po 24 hodinách (Obr. 2j) je však intenzita fluorescence porovnatelná s kontrolní populací, což je pravděpodobně opět způsobeno obrannými mechanismy buněk.

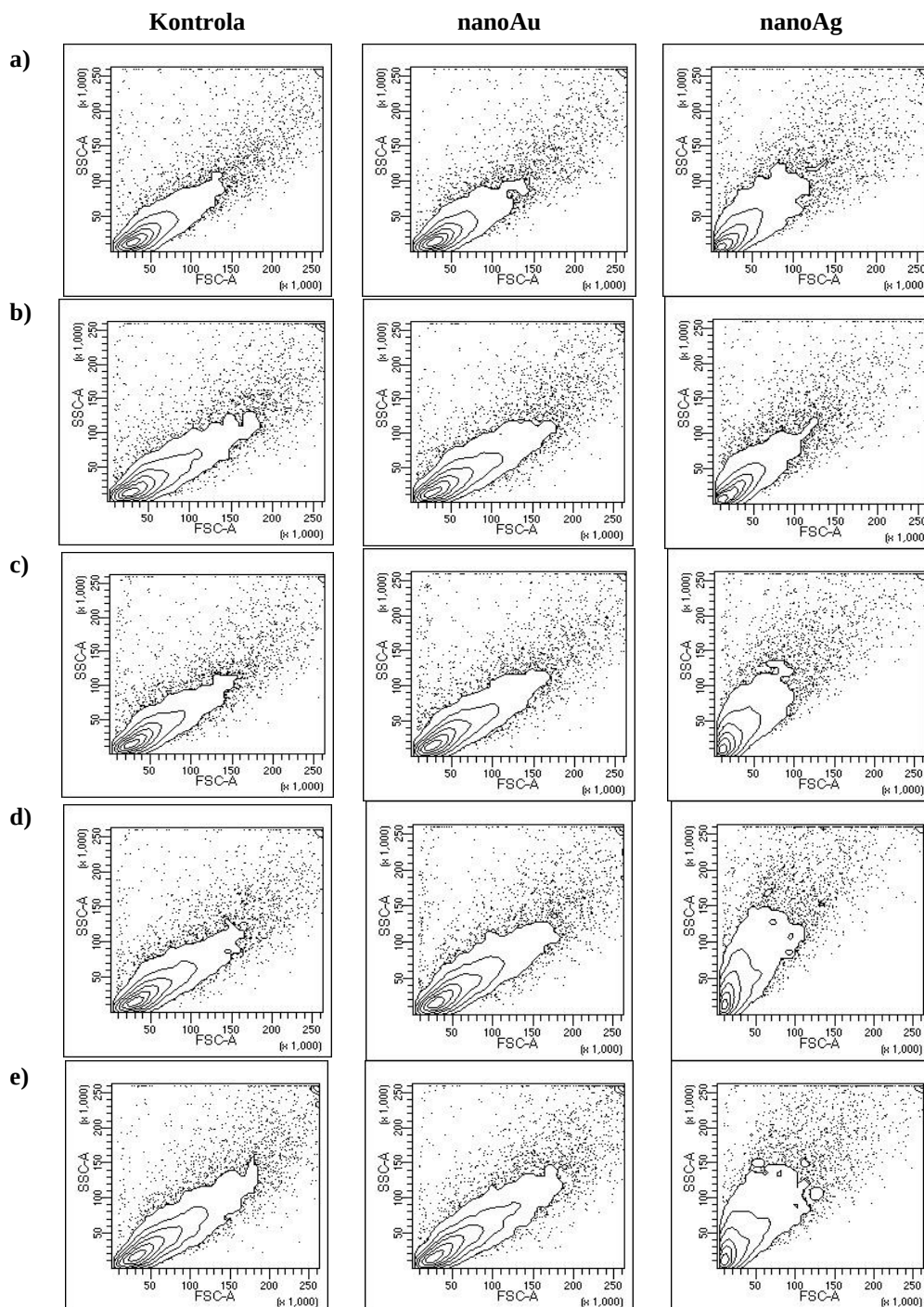


Obr. 2 Histogramy fluorescenčního záření buněk *T. cutaneum* po expozici nanoAg (31 mg/l) a) 4 hodiny, b) 8 hodin, c) 16 hodin, d) 20 hodin, e) 24 hodin a po expozici nanoAu (140 mg/l) f) 4 hodiny, g) 8 hodin, h) 16 hodin, i) 20 hodin, j) 24 hodin; osa x (FITC-A) – intenzita fluorescence, osa y (Count) – počet buněk; šedý pík – kontrolní populace, zelený pík – buněčná populace vystavená účinkům nanoAg.

3.3. Změny v morfologii buněk *T. cutaneum*

Pomocí průtokové cytometrie byl také pozorován vliv nanoAu a nanoAg na morfologii buněčné populace *T. cutaneum*. Na Obr. 3 jsou znázorněny získané dot-plot analýzy, kde konturový diagram zobrazuje linie, které ohraničují oblasti s výskytem buněk stejné velikosti

a stejnou granularitou cytoplasmy. Na Obr. 3a-e je viditelné, že ani po dlouhodobém působení nanoAu nedochází k morfologickým změnám buněk. V případě působení nanoAg dochází k viditelným změnám už po 4 hodinách ve velikosti buněk a jejich dlouhodobé působení má za následek také změny v granularitě cytoplasmy.



Obr. 3 Dot-plot analýzy morfologie buněk *T. cutaneum* vystavených účinkům nanoAu (140 mg/l) a nanoAg (31 mg/l) a) 4 hodiny, b) 8 hodin, c) 16 hodin, d) 20 hodin, e) 24 hodin; osa x (FSC) – velikost buněk, osa y (SSC) – granularita cytoplasmy resp. strukturální narušení cytoplasmy.

4. Závěr

Při sledování projevů oxidačního stresu, konkrétně změny hladiny kyslíkových radikálů, u kvasinky *Trichosporon cutaneum* byly použité nanočástice stříbra a zlata. Získané výsledky ukazují, že tato kvasinka je velmi citlivá vůči působení nanoAg, a to jak z hlediska zvýšené hladiny ROS, tak i z hlediska buněčné morfologie, kdy došlo nejen ke změně tvaru buněk, ale také ke změně granularity cytoplasmy. Na druhou stranu se tato kvasinka ukázala jako odolná vůči působení nanoAu.

5. Literatura

Adams, C. P.; Walker, K. A.; Obare, S. O.; Docherty, K. M. Size-Dependent Antimicrobial Effects of Novel Palladium Nanoparticles. *Plos One* 2014, 9 (1), 1-12.

Cruz de Carvalho, M. H. Drought Stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant signaling & Behavior* 2008, 3 (3), 156-165.

Fakruddin M.; Hossain Z.; Afroz H. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *Journal of Nanobiotechnology* 2012, 10 (31), 1-8.

Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* 2004, 142 (2), 231-255.

Huber, D. L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small* 2005, 1 (5), 482-501.

Huh, A. J.; Kwon, Y. J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release* 2011, 156 (2), 128-145.

Kim, T. H.; Kim, M.; Park, H. S.; Shin, U. S.; Gong, M. S.; Kim, H. W. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research A* 2012, 100 (4), 1033-1043.

Kvitek, L.; Panacek, A.; Pucek, R.; Soukupova, J.; Vanickova, M.; Kolar, M.; Zboril, R. Antibacterial activity and toxicity of silver – nanosilver versus ionic silver. *Journal of Physics: Conference Series* 2011, 304.

Manke, A.; Wang, L.; Rojanasakul, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International* 2013, 1-15.

Pissuwan, D.; Cortie, C. H.; Valenzuela, S. M.; Cortie, M. B. Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. *Trends in Biotechnology* 2010, 28 (4), 207-213.

Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances* 2009, 27 (1), 76-83.

Ray, P. D.; Huang, B. W.; Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 2012, 24 (5), 981-990.

Využití zemědělských odpadů pro biotechnologickou produkci biopaliv

R. Lokajová, M. Drahokoupil, B. Branská

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt:

Cílem práce bylo nalezení vhodných podmínek a kultivačních strategií pro fermentační produkci butanolu na odpadních zemědělských substrátech, konkrétně kuřecím peří a pšeničné slámě. Z těchto dvou surovin byl připraven společný hydrolyzát, který sloužil jako komplexní zdroj živin a energie pro kultivaci solventogenních klostridií. Byly testovány tři kultivační strategie: separátní sacharifikace a fermentace (SHF), simultánní sacharifikace a fermentace (SSF) a simultánní sacharifikace s opožděnou inokulací (dSSF) pro dva produkční kmeny *C. beijerinckii* NCIMB 8052 a *C. beijerinckii* NRRL-B598 a různé hodnoty počátečního pH. Nejvyšší koncentrace ABE 6,4 g/l bylo dosaženo kmenem *C. beijerinckii* NCIMB 8052 při použití metody SHF se vstupní hodnotou pH 6,0. Z pohledu fermentačních strategií bylo nejvyšší koncentrace dosaženo sice pomocí SHF, ale při dSSF byl proces hydrolýzy a fermentace zkrácen ze 72 h na 54 h což vedlo k navýšení produktivity o 11 % (SHF 0,09 g.l⁻¹.h⁻¹, dSSF 0,10 g.l⁻¹.h⁻¹).

Úvod

Kuřecí peří je největším odpadem z drůbežářského průmyslu, tvoří přibližně 8% z hmotnosti dospělého kuřete. Celosvětově je generováno kolem 7,7. 10⁸ kg kuřecího peří ročně (Taskin, 2013). Kuřecí peří je z více než 91% složené z proteinů a jejich hlavní složkou je keratin (Taskin a Kurbanoglu, 2011).

Pšeničná sláma je z pohledu zemědělských zbytků nejběžnější surovina v Evropě a druhá nejvíce rozšířená ve světě, hned po rýžové slámě (Talebnia a kol., 2010). Řadí se mezi lignocelulózové odpady, její chemické složení se mění v závislosti na stupni zralosti obilovin, typu půdy a hnojiva a dalších faktorů. Hlavními složkami sušiny pšeničné slámy jsou celulóza, hemicelulóza a lignin.

Jak keratin obsažený v kuřecím peří, tak lignocelulóza v pšeničné slámě jsou biopolymery s komplikovanou strukturou odolnou vůči působení mírných chemických i biologických činidel a jejich bioutilizovatelnost je omezená pouze na několik vybraných mikroorganismů. Technologicky významní producenti biopaliv postrádají keratinolytické či celulólytické schopnosti a jak sláma, tak peří musí být před vlastní fermentací hydrolyzovány.

Butanol může podobně jako etanol sloužit jako náhrada fosilních paliv. Vedle chemické syntézy může být produkován pomocí fermentace s využitím tzv. solventogenních bakterií z rodu *Clostridium*. Výhoda produkce biopaliv z lignocelulózových materiálů pomocí klostridií spočívá zejména v jejich schopnosti utilizace mnohem širší škály substrátů než je schopna využívat kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, která je v současnosti využívána k produkci bioetanolu. Nevýhodou je vysoká toxicita butanolu pro mikroorganismy a s tím spojená i nízká hodnota maximální dosažitelné koncentrace. Obecně platí, že bakterie *Clostridium* sp. může produkovat až 15- 25 g ABE / l s výtěžkem 0,25- 0,4 g ABE / g cukru (Visioli a kol., 2014).

Z ekonomického pohledu je tedy žádoucí zvýšit alespoň produktivitu celého procesu od předúpravy materiálu až po finální separaci. Jedním z nástrojů zvýšení efektivity produkce biopaliv z odpadních zemědělských substrátů na bázi lignocelulózy je volba vhodná strategie sacharifikace a fermentace. Nejčastěji jsou využívány následující postupy: separátní sacharifikace a fermentace (SHF), simultánní sacharifikace a fermentace (SSF) a simultánní sacharifikace s opožděnou inokulací (dSSF) (Paulová a kol. 2015).

V experimentální práci byly testovány všechny tři uvedené strategie kombinací sacharifikace a fermentace pro dva kmeny solventogenních klostridií, konkrétně *C. beijerinckii* NCIMB 8052 a *C. beijerinckii* NRRL-B598. Různé hodnoty vstupního pH byly voleny na základě požadavků produkčních mikroorganismů a hodnot vhodných pro enzymový rozklad celulózy. Jako fermentační médium byla použita směs pšeničné slámy a peří předupravené působením 0,6% KOH.

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismy

K produkci butanolu byly využity dva kmeny rodu *Clostridium*, konkrétně *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 (ARS Culture Collection, USA) a *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 (NCIMB Collection, UK). Kmeny byly uchovávány v podobě sporových konzerv v destilované vodě při 4 °C. Před inokulací byly sporové konzervy vystaveny teplotnímu šoku (80°C, 2 min) a převedeny do inokulačního TYA média (glukóza, kvasničný extrakt, trypton, dihydrogenfosforečnan draselný, octan amonný, heptahydrát síranu hořečnatého, heptahydrát síranu železnatého), kde byly staticky kultivovány v anaerobním boxu po dobu 24 hod. při teplotě 37 °C.

Médium z pšeničné slámy a kuřecího peří

Fermentační médium na bázi pšeničné slámy a peří bylo připraveno spojením postupů separátní hydrolýzy peří (Stiborová a kol. 2016) a slámy (Jaisamut a kol., 2013) následovně: 7,5 g namleté pšeničné slámy a 1 g namletého (10 000 ot/s, 20 s), odmaštěného, vysušeného kuřecího peří byly naváženy do Erlenmayerovy baňky o objemu 250 ml a bylo přidáno 100 ml 0,6 % roztoku KOH. Pro alkalickou hydrolýzu byly následně baňky třepány při 80 °C a 150 rpm po dobu 24 h.

SHF, SSF a dSSF s různou vstupní hodnotou pH

Alkalický hydrolyzát byl nejprve asepticky upravený na požadovanou hodnotu pH přidavkem 10% roztoku H_3PO_4 . V případě SHF a dSSF bylo k 100 ml hydrolyzátu (pH 5) přidáno 1,5 ml enzymu Cellic cTec2 a enzymová hydrolýza probíhala při 50 °C a 150 rpm, v případě SHF po dobu 24 h a dSSF po dobu 6 h. Následovala sterilní úprava pH na (5,5; 6,0 nebo 6,3) za použití 20% roztoku NaOH. Baňky byly asepticky zaočkovány 10 ml narostlého inokula (*C. beijerinckii* NRRL B-598 nebo *C. beijerinckii* NCIMB 8052). Vlastní fermentace probíhala 48 h staticky v anaerobní komoře (37°C, 48 h).

Při použití SSF metody byl hydrolyzát upraven 10% H_3PO_4 na hodnotu pH 6,0 a 6,3. Poté bylo přidáno inokulum (10 ml *C. beijerinckii* NRRL B-598 nebo *C. beijerinckii* NCIMB 8052) a enzym (1,5 ml enzymu Cellic cTec2/100 ml hydrolyzátu) a fermentace i enzymová hydrolýza probíhaly současně v anaerobní komoře při 37°C po dobu 48 hod.

Analýza obsahu glukózy a metabolitů byla prováděna na přístroji HPLC Agilent Series 1200. Podmínky HPLC jsou shrnuty v Tab. I.

Tab. I Podmínky HPLC

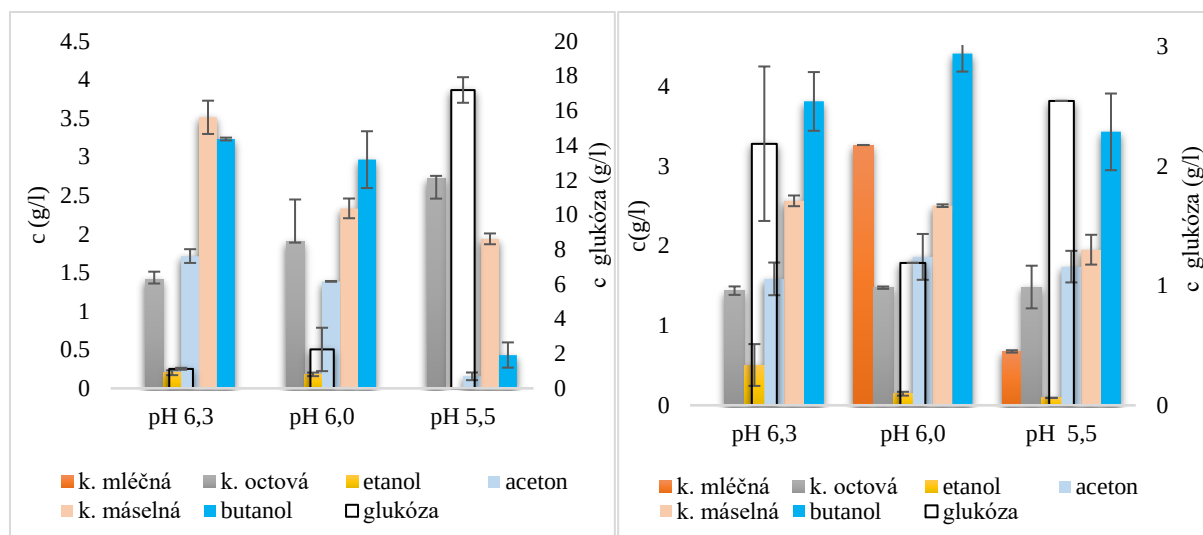
Kolona	Watrex 250×8 mm polymer IEX H+
Průtok	0,5 ml.min ⁻¹
Mobilní fáze	5 mM H_2SO_4 v demiH ₂ O
Teplota kolony	60 °C
Detektor	Refraktometrický
Objem nástřiku	20 µl

Výsledky a diskuze

Podmínky a kultivační strategie pro společný hydrolyzát slámy a peří byly testovány z pohledu maximalizace produkce butanolu a rozpouštědel. Dále byla sledována koncentrace glukózy, xylózy a dalších fermentačních produktů (aceton, butanol, etanol, kys. octová, mléčná, máselná).

SHF

Pro optimalizaci fermentačních podmínek pro dané kmeny (*C. beijerinckii* NRRL B-598 a *C. beijerinckii* NCIMB 8052) byly v režimu SHF testovány různé vstupní hodnoty pH (5,5; 6,0 a 6,3). Na Obr. 1 jsou znázorněny výsledky zbytkové koncentrace glukózy a výsledné koncentrace produkovaných organických kyselin a rozpouštědel v závislosti na vstupní hodnotě pH pro oba bakteriální kmeny.

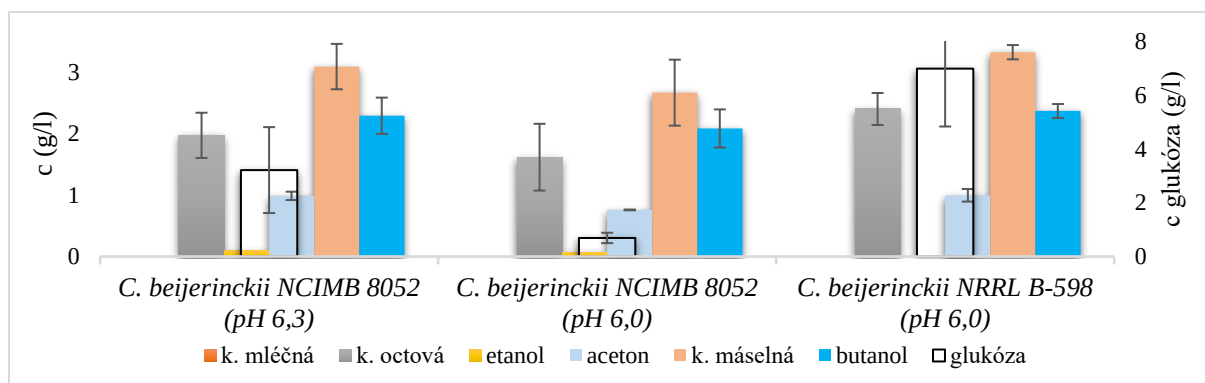


Obr. 1 Výsledné koncentrace glukózy a metabolitů při různé vstupní hodnotě pH (5,5; 6,0; 6,3) po ukončení SHF vlevo pro bakteriální kmen *C. beijerinckii* NRRL B-598 a vpravo pro bakteriální kmen *C. beijerinckii* NCIMB 8052.

Nejvyšší koncentrace butanolu 4,4 g/l bylo dosaženo s kmenem *C. beijerinckii* NCIMB 8052 při vstupní hodnotě pH 6,0. Naopak nejméně butanolu bylo vyprodukováno kmenem *C. beijerinckii* NRRL B-598 při vstupní hodnotě pH 5,5 (Obr. 1). Nižší hodnota vstupního pH pozitivně ovlivňuje enzymový rozklad (pH optimum pro enzym je 5,0), ale naopak negativně ovlivňuje růstové vlastnosti kultury. *C. beijerinckii* obecně snáší hůře nízké pH, které i během acidogenní fáze většinou neklesá pod hodnoty pH 5,4 – 5,5 (Lokajova, 2017). Na druhou stranu by nižší vstupní pH mohlo pozitivně ovlivnit poměr mezi vytvořenými organickými kyselinami a rozpouštědly ve prospěch rozpouštědel, jelikož právě nízké pH patří k jednomu ze spouštěčů solventogeneze (Jones a Woods, 1986). V případě fermentace směsi slámy a peří ale byla produkce butanolu při hodnotě pH 5,5 pro oba kmeny minimální, proto byla tato hodnota pH pro následující experimenty vyloučena. Pro další experimenty byly vybrány dvě hodnoty pH s nejvyšší produkcí butanolu pro kmen *C. beijerinckii* NCIMB 8052 a jedna hodnota pro kmen *C. beijerinckii* NRRL B-598. Zvolené podmínky byly dále testovány pro procesy SSF a dSSF.

SSF

Simultánní sacharifikace a fermentace je proces, v němž probíhají enzymová hydrolýza a fermentace společně. Uvolňovaná glukóza je ihned využívána mikroorganismy, což omezuje jednak rozvoj možné kontaminace tak zvyšuje aktivitu enzymů eliminací inhibice enzymu produktem. Koncentrace metabolitů vyprodukovaných klostridii v SSF procesu jsou znázorněny na Obr. 2.

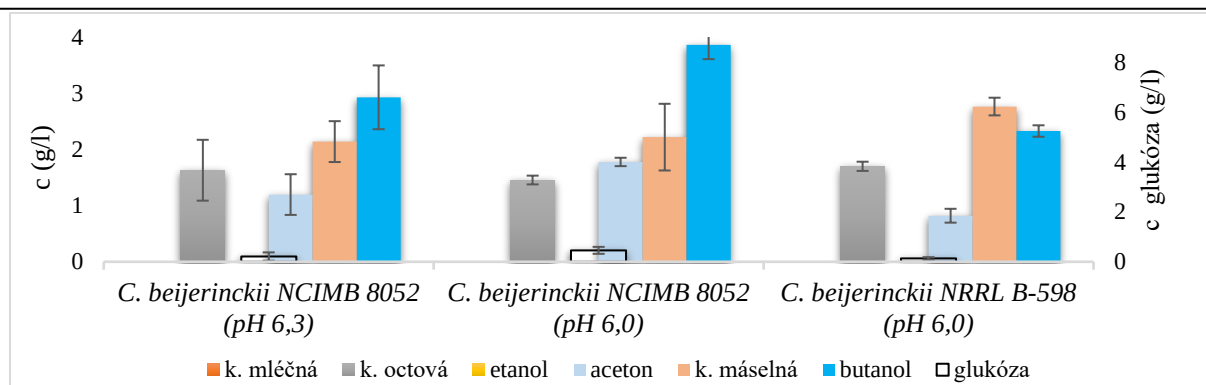


Obr. 2 Výsledné koncentrace glukózy a metabolitů při různé vstupní hodnotě pH (6,0; 6,3) po ukončení SHF pro bakteriální kmeny *C. beijerinckii* NRRL B-598 a *C. beijerinckii* NCIMB 8052.

Nejvyšší koncentrace butanolu bylo dosaženo kmenem *C. beijerinckii* NRRL B-598 při pH 6,0. U kmene *C. beijerinckii* NCIMB 8052 byla při tomto pH naopak produkce butanolu nejmenší. Kmen *C. beijerinckii* NRRL B-598 měl při pH 6,0 také nejvyšší koncentraci zbytkové glukózy (Obr. 2). Obecně je problémem SSF procesů nízká koncentrace glukózy uvolněná enzymem pracujícím za neoptimálních podmínek. Nedostatek glukózy pak zpomaluje mikrobiální metabolismus a vzniká nízké množství produktu. V tomto experimentu byla překvapivě zjištěna zbytková glukóza i po fermentaci, což mohlo být způsobené špatnou homogenizací fermentační směsi. Vznikajícím plynem, který produkují klostridie během fermentace, byl fermentovaný materiál nadzdvihován nad kapalný hydrolyzát. V pevné fázi nad kapalinou tedy mohla probíhat enzymová hydrolýza produkující glukózu, která nemohla být využita mikroorganismy přítomnými v kapalně fázi. Tomuto problému bychom mohli zamezit použitím orbitální anaerobní třepačky, která by udržela pevný podíl v kapalině.

dSSF

Možností, jak částečně eliminovat nevýhody SSF je zařazení krátkého kroku předhydrolýzy celulózy, tzv. dSSF – simultánní sacharifikace s opožděnou inokulací (Paulová a kol. 2014). V tomto experimentu byla dSSF provedena se 6 h samostatnou enzymatickou hydrolýzou. Výsledné koncentrace zbytkové glukózy a metabolitů jsou zobrazeny na Obr. 3.

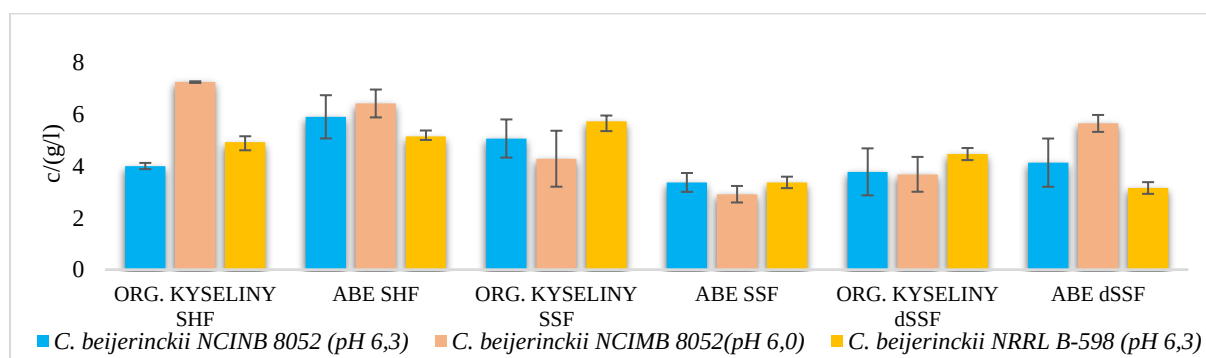


Obr. 3 Výsledné koncentrace glukózy a metabolitů při různé vstupní hodnotě pH (6,0; 6,3) po ukončení dSSF pro bakteriální kmeny *C. beijerinckii* NRRL B-598 a *C. beijerinckii* NCIMB.

Nejvyšší produkce butanolu s koncentrací 3,9 g/l byla opět dosažena kmenem *C. beijerinckii* NCIMB 8052 při pH 6,0 obdobně jako při SHF. Nejnižší koncentrace butanolu 2,3 g/l byla dosažena kmenem *C. beijerinckii* NRRL B-598 při pH 6,0 (Obr. 3).

Porovnání SHF, SSF, dSSF

Získané výsledné koncentrace vyprodukovaných metabolitů v jednotlivých procesech SSF, SHF a dSSF byly porovnány z pohledu celkové koncentrace vyprodukovaných rozpouštědel a organických kyselin (Obr. 4).



Obr. 4 Porovnání konečných koncentrací org. kyselin a ABE v jednotlivých kultivacích SHF, SSF, dSSF pro bakteriální kmene *C. beijerinckii* NRRL B-598 a *C. beijerinckii* NCIMB 8052.

Kmen *C. beijerinckii* NRRL B-598 produkoval ve srovnání s *C. beijerinckii* NCIMB 8052 nižší koncentrace rozpouštědel za všech testovaných podmínek. Lepším produkčním mikroorganismem pro fermentační využití odpadního hydrolyzátu slámy a peří se zdá být *C. beijerinckii* NCIMB 8052. Nejvyšší koncentrace ABE 6,4 g/l bylo dosaženo kmenem *C. beijerinckii* NCIMB 8052 při použití metody SHF se vstupní hodnotou pH 6,0. V tomto případě bylo vyprodukováno i nejvíce organických kyselin, což je v rozporu s výše uvedeným předpokladem, že nižší pH vede k dřívějšímu přepnutí metabolismu do solventogeneze (Jones a Woods, 1986). Z pohledu fermentačních strategií bylo nejvyšší koncentrace dosaženo pomocí

SHF, ale při dSSF byl proces hydrolýzy a fermentace zkrácen ze 72 h na 54 h což vedlo k navýšení produktivity o 11 % (SHF 0,09 g.l⁻¹.h⁻¹, dSSF 0,10 g.l⁻¹.h⁻¹).

Závěr

Na základě provedených experimentů bylo prokázáno, že hydrolyzovaná směs slámy a peří může být využita jako alternativní kultivační médium k fermentační produkci butanolu s využitím solventogenních bakterií rodu *Clostridium*. Lepších výsledků bylo dosaženo s kmenem *C. beijerinckii* NCIMB 8052 s využitím separátní hydrolýzy a fermentace či simultánní hydrolýzy a fermentace s opožděnou inokulací, přičemž první uvedená vedla k vyšším výsledným koncentracím rozpouštědel a druhá k vyšší produktivitě.

Poděkování: Tato práce byla vypracována za finanční podpory projektu BIORAF TE01020080 Technologické agentury ČR.

Literatura

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

Lokajova R. (2017) Využití zemědělských odpadů pro biotechnologickou produkci biopaliv. VŠCHT, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biotechnologie, Praha.

Paulová L., Patáková P., Branská B., Rychtera M., Melzoch K. (2015) Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*, 33 (6), str. 1091- 1107.

Paulova L., Patakova P., Rychtera M., Melzoch K. (2014) High solid fed-batch SSF with delayed inoculation for improved production of bioethanol from wheat straw. *Fuel*, 122, str. 294-300.

Taskin M. (2013) A new strategy for improved glutathione production from *Saccharomyces cerevisiae*: use of cysteine- and glycine- rich chicken feather protein hydrolysate as a new cheap substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (3), str. 535- 541.

Taskin M., Kurbanoglu E. B. (2011) Evaluation of waste chicken feathers as peptone source for bacterial growth. *Journal of Applied Microbiology*, 111 (4), str. 826- 834.

Telebnia F., Karakashev D., Angelidaki I. (2010) Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101 (13), str. 4744- 4753.

Visioli L. J., Enzweiler H., Kuhn R. Q., Schwaab M., Mazutt M. A. (2014) Recent advances on biobutanol production. *Sustainable Chemical Processes*, 2 (15), str. 1- 9.

Buněčná signalizace mikroorganismů a možnosti jejího ovlivnění

J. Michailidu, M. Paldrychová, A. Čejková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Hledání nových cest jak bojovat proti rezistentním mikroorganismům, se stalo ožehavým tématem posledních let. Společně s objevem quorum sensing se začaly objevovat také nové možnosti ovlivňování patogenity těchto mikroorganismů - bylo totiž zjištěno, že úspěšná komunikace v rámci mikrobiální populace přímo indukuje vznik virulentních faktorů jako je například tvorba biofilmu, či produkce toxinů. Tento příspěvek obsahuje přehled signálních systému *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens* a také krátké seznámení s metodami stanovení signálních molekul i strategiemi zamezení mezibuněčné komunikace.

1. Úvod

Objev antibiotik v první polovině 20. století přinesl lidstvu úlevu od mnoha životu nebezpečných onemocnění. Téměř sto let poté nás excesivní a neuvážené užívání antibiotik dovedlo až ke vzniku rezistentních kmenů patogenů, jenž jsou zodpovědné za onemocnění, na jejichž následky ročně zemře 16 milionů lidí. Je důležité zmínit, že nejméně 65% těchto onemocnění je spojených s bakteriálními koloniemi, jejichž proliferace závisí v první řadě na úspěšné tvorbě a zrání biofilmu. Úspěšná kolonizace povrchu formou zralého biofilmu ale vyžaduje komunikaci buněk kolonie mezi sebou - quorum sensing (Kalia, 2013).

Quorum sensing je systém rozhodování kolonií mikroorganismů na základě sdílení komunikačních molekul a následného ovlivňování genové exprese. Přepisování genů na základě signálů quorum sensing systémů je tak rozsáhlé, že ovlivňuje nejen geny důležité pro tvorbu biofilmu, ale také geny virulentních faktorů jako jsou exoproteázy, exotoxiny a siderofory, či geny umožňující bakteriím motilitu. Úspěšná komunikace pomocí quorum sensing je evidentně klíčovým faktorem v míře patogenity daného mikroorganismu. Není se tedy čemu divit, že se quorum sensing od svého objevení dostal do hledáčku vědců jako potenciální cíl při hledání nových druhů léčiv proti rezistentním kmenům (Rasmussen a Givskov, 2006).

Quorum sensing byl objeven a popsán před více než 25 lety, poprvé u dvou světélkujících mořských bakterií, *Vibrio fischeri* a *Vibrio harveyi*. Donedávna však bylo objeveno pouze několik dalších případů bakteriální genové exprese reagující na komunikaci buněk mezi sebou. Tento způsob bakteriálního dorozumívání byl však považován za anomálii. Následné výzkumy v oboru mezibuněčné komunikace bakterií však ukázaly, že velká část ne-li přímo většina mikroorganismů pravděpodobně komunikuje pomocí malých signálních molekul ve snaze koordinovat chování celé skupiny. Jeví se, že schopnost komunikace v rámci druhu a stejně tak i komunikace mezidruhová je nutná pro přežití bakterií a neméně pro jejich interakci s přirozeným prostředím (Miller a Bassler, 2001).

2. Quorum sensing u *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia marcescens*

Gramnegativní bakterie většinou využívají quorum sensing systémy založené na produkci a detekci homosein laktonových (AHL) komunikačních molekul - autoinduktorů. U všech těchto bakteriálních druhů byly pozorovány některé obecné rysy: všechny komunikační molekuly vycházejí ze struktury N-acyl-homoserin laktonu, na biosyntéze a detekci AHL se podílejí homologní enzymy nebo geny, koncentrace N-acyl-homoserin laktonů v prostředí je kritická pro spuštění specifických odpovědí. Přestože je základní struktura autoinduktorů velmi podobná, je zároveň i druhově specifická a každý bakteriální druh reaguje na svůj specifický autoinduktor. Toho je dosaženo různou délkou a různými modifikacemi uhlíkového řetězce (acylu) navázaného na homoserin laktonové jádro. Není výjimkou, produkuje-li jedna bakterie více odlišných autoinduktorů o různé délce a postranní modifikace acylového řetězce. Každý z těchto autoinduktorů může mít odlišnou funkci (Rychlík, 2000).

Gramnegativní *P. aeruginosa* například produkuje minimálně dva různé autoinduktory N-(3-oxo-dodekanoyl)-AHL a N-butanoyl-AHL (Suga a Smith, 2003). Prvním popsáním použitím signálního systému *P. aeruginosa* byla exprese LasB elastázy, jenž je schopna zamezit rozpoznání imunitním systémem (Casilag, 2016). Podle LasB tak vzniklo pojmenování quorum sensing systému *las*. Tento systém je složen z *lasI*, genu pro syntázu autoinduktoru - 3-oxo-C12-AHL a *lasR*, genu kódujícího protein aktivující transkripci. Systém *las* reguluje expresi *lasB* a jeho aktivace je nutná pro produkci různých extracelulárních faktorů virulence (Barequet, 2004). Druhý popsáný signální systém *P. aeruginosa* byl nazván *rhl*. Bylo totiž zjištěno, že reguluje mimo jiné produkci rhamnolipidu. Tento systém je složen z *rhlI*, genu pro syntézu autoinduktoru C4-AHL a genu *rhlR* kódujícího protein aktivující transkripci. Výzkumy

navíc ukázaly, že signální systémy *las* a *rhl* navzájem interagují v rámci sériového uspořádání (Delden, 1998).

Tyto systémy jsou vysoce specifické a syntéza jejich aktivačních transkripčních proteinů není křížově aktivovatelná, podobně i komplexy R-protein/autoinduktor preferují aktivaci konkrétních promotorů. Nicméně tato specifita není stoprocentní - komplex LasR/3-oxo-C12-AHL totiž aktivuje expresi *rhlR*, což znamená, že *las* systém je v této hierarchii nadřazen *rhl* systému. Navíc se 3-oxo-C12-AHL dokáže vázat na RhlR, čímž zamezuje vazbě C4-AHL do vazebného místa na svůj transkripční aktivátor *rhlR*. *Las* systém tedy reguluje *rhl* systém jak v transkripční tak v posttranslační rovině (Delden, 1998). Kromě AHL systémů byla u *P. aeruginosa* pozorována také skupina více než 50 různých chinolonových QS molekul, z nichž zdaleka nejvýznamnější je 2-heptyl-3-hydroxy-4-chinolon neboli pseudomonas quinolone signal (PQS), který se z velké části podílí na odpovědi tohoto mikroorganismu na stres (Häussler, 2008).

Proteinové skupiny LuxI a LuxR jsou nejčastěji asociovány se syntézou AHL a reakcí na ně a jinak tomu není ani u rodu *Serratia*. U tohoto mikroorganismu byla nejprve identifikována přítomnost C4-AHL a C6-AHL a následně byly objeveny *luxR* a *luxI* homology, *smal* a *smaR* (Horng, 2002). AHL jsou syntetizovány z S-adenosyl-L-methioninu (SAM) a acylovaného proteinu přenášejícího acylové skupiny (ACP - acyl carrier protein). V rámci rodu *Serratia* se můžeme setkat s velkou specifitou a diverziou quorum sensing signálních molekul a regulací cílových genů. Nejčastějším autoinduktorem vyskytujícím se u těchto bakterií je C6-AHL. U *S. marcescens* byly dále identifikovány 3-oxo-C6-AHL, C7-AHL a C8-AHL (Houdt, 2007).

3. Metody stanovení signálních molekul

Bylo nashromážděno nemalé množství informací, které demonstrují roli quorum sensing ve vývinu virulence u patogenních mikroorganismů (Hueck, 1998). Tyto skutečnosti ukazují důležitost detekce a kvantifikace signálních molekul používaných při quorum sensing. Je známa již vcelku široká škála konvenčních fyzikálně-chemických metod, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí, plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, nukleární magnetická rezonance, kapilární elektroforéza v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, chromatografie na tenké vrstvě atp. (Kumari, 2008).

Navíc jsou zde ještě bakteriální biosensorové systémy, které byly přímo navrženy pro detekci AHL. K těm patří například systémy založené na bakteriích jako jsou *E. coli*, *A. tumefaciens* a *P. aeruginosa*, které využívají různé regulační systémy a v nich použité detekční geny, jako *lacZ*, *gfp* nebo *lux*, kódující β -galaktosidázu, zelený fluorescenční protein (GFP) a bakteriální luciferázu. Dalším příkladem může být detekce AHL založena na využití violaceum-negativního mutantu (CV026) druhu *Chromobacterium violaceum* (Kumari, 2008).

Celobuněčné detekční systémy vyrobené pomocí genového inženýrství, které obsahují signální protein β -galaktosidázu, byly užity ke studiu mechanismu bakteriální komunikace u určitých bakterií, jako je *A. tumefaciens*, jenž je zodpovědný za růst nádorů u rostlin, i detekci AHL v supernatantu bakteriální kultury. Celobuněčný detekční systém užívající genovou strukturu založenou na *gfp* umožnil studium bakteriální komunikace *in situ* v měřítku jedné buňky u několika různých bakteriálních druhů - tyto detekční systémy jsou nejvíce využívány při studiu biofilmu (Kumari, 2008).

4. Strategie vedoucí k ovlivnění quorum sensing

Ovlivnění quorum sensing systémů *P. aeruginosa* se stalo velmi zajímavou možností s terapeutickým potenciálem. Jedním z přístupů je použití analogů AHL, jenž fungují jako antagonisté. Strukturní variace signálních molekul *P. aeruginosa* odhalily epitopy, které jsou důležité pro aktivaci a inhibici LasR aktivity a prostřednictvím screeningu knihoven analogů AHL byla definována skupina látek obsahujících strukturu anilinového jádra a akceptor vodíků. Další studie identifikovaly syntetický halogenovaný furanon, který je schopen inhibovat produkci mnoha faktorů spouštěných prostřednictvím quorum sensing. Jiný přístup byl zvolen pro studie protilátek schopných navázat AHL - v případě navázání protilátek na komunikační molekuly se dané AHL nemohou dostat opět do buněk a vyvolat genovou expresi. Několik studií se také zabývalo pozorováním působení laktonáz produkovaných několika různými bakteriemi (např. *Variovorax paradoxus* a *Agrobacterium tumefaciens*) (Carlier a kol., 2003, Leadbetter a Greenberg, 2000). Tyto enzymy štěpí laktonový kruh a tím produkují nefunkční molekuly, které opět nejsou schopny aktivovat danou genovou expresi. Další možnou metodou může být za použití antisense oligonukleotidů, jenž se komplementárně váží na *lasR/lasI* nebo *rhlR/rhlI* a inhibují tak genovou expresi (Smith a Iglewski, 2003).

Kromě již zmíněných přístupů, které je možno aplikovat také na *S. marcescens* bylo studováno velké množství dalších metod. Bylo například zjištěno, že metanolový extrakt

cuminum cyminum (2 mg/ml) silně inhibuje produkci exopolysacharidů, indukuje rozvolňování již narostlého biofilmu a inhibuje tvorbu biofilmu také u *P. aeruginosa* (Packiavathy, 2012). Další studie se zabývala quorum sensing inhibiční aktivitou indických mořských hub a bylo při ní zjištěno, že metanolové extrakty několika z nich (např. *Aphocallistes bocagei* nebo *Clathria atrasanguinea*) inhibují AHL dependentní produkci prodigiosinu, virulentních enzymů jako je proteáza a také tvorbu biofilmu (Anapoorani, 2012). Bakterie žijící v konsorciích s mořskými korály představují také nadějnou možnost, jelikož bylo pozorováno, že některé z nich také produkují bioaktivní činidla schopná inhibovat signální systém *S. marcescens* (Bakkiyaraj, 2012).

5. Závěr

Aplikace účinných metod k zamezení nežádoucích kolonizací mikroorganismy je nevyhnutelná a výzkumy těchto metod mají ve vědeckém světě v současné době přirozeně velkou prioritu. Je však nutné přistupovat k masové aplikaci těchto postupů obezřetně, a tak je především nutný extenzivní výzkum všech možných dopadů užití jak nových antimikrobiálních látek, tak jejich kombinací. Ideální řešení by totiž nemělo jen pomoci se současnou krizí, ale mělo by mít především účinnost z dlouhodobého hlediska.

6. Literatura

Anapoorani, A., Jabbar, A. K. K. A., Musthafa, S. K. S., Pandian, S. K., Ravi, A. V., Inhibition of Quorum Sensing Mediated Virulence Factors Production in Urinary Pathogen *Serratia marcescens* PS1 by Marine Sponges. *Indian Journal of Microbiology* **2012**, 52:160-166.

Bakkiyaraj, D., Sivasankar, C., Pandian, S. K., Inhibition of quorum sensing regulated biofilm formation in *Serratia marcescens* causing nosocomial infections. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22:3089-3094.

Barequet, I. S., *Pseudomonas aeruginosa* LasA Protease in Treatment of Experimental Staphylococcal Keratitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, 48:1681-1687.

Carlier, A., Uroz, S., Smadja, B., Fray, R., Latour, X., Dessaux, Y., Faure, D., The Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* harbors an attM-paralogous gene, *aiiB*, also encoding N-Acyl homoserine lactonase activity. *Applied and Environmental Microbiology* **2003**, 69:4989-4993.

Casilag, F., Lorenz, A., Krueger, J., Klawonn, F., Weiss, S., Häussler, S., The LasB Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* Acts in Concert with Alkaline Protease AprA to Prevent Flagellin-

Induced Immune Recognition. *Infection and Immunity* **2016**, 84:162-171.

Delden, C. Van a Iglewski, B.H., Cell-to-Cell Signaling and *P. aeruginosa* Infections. *Emerging Infectious Diseases* **1998**, 4:551-560.

Häussler, S. a Becker, T., The Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) Balances Life and Death in *Pseudomonas aeruginosa* Populations. *PloS Pathogens* **2008**, 4:e1000166.

Houndt, R. V., Givskov, M., Michiels, Ch. W., Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiology Reviews* **2007**, 31:407-424.

Kalia, V. Ch., Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances* **2013**, 31:224-245.

Kumari, A., Pasini, P., Daunert, S., Detection of bacterial quorum sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, 391:1619–1627.

Leadbetter, J. R. a Greenberg, E. P., Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology* **2000**, 182:6921-6926.

Miller, M. B. a Bassler, B. L., Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* **2001**, 55:165-199.

Packiavathy, I. A. S. V., Agilandewari, P., Musthafa, K. S., Arumugam, V. R., Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Research International* **2012**, 45:85-92.

Rasmussen, T. B. a Givskov, M., Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Journal of Medical Microbiology* **2006**, 296:149-161.

Rychlík, I., Volf, J., Ševčík, M., Bacterial communication and possible application in control and therapy of bacterial diseases. *Veterinary medicine* **2000**, 45:181-188.

Smith, R. S. a Iglewski, B. H., *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as potential antimicrobial target. *The Journal of Clinical Investigation* **2003**, 112:1460-1465.

Suga, H. and Smith, K. M., Molecular mechanisms of bacterial quorum sensing as a new drug target. *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, 7:586–591.

Vývoj chromatografické metody pro sledování těkavých aromatických sloučenin v pivu

J. Nešpor, M. Karabín, P. Dostálek

Ústav biotechnologie, VŠCHT

Optimalizace každé analytické metody je časově náročný proces, ovšem zcela nezbytný pro správné a přesné stanovení sledovaných sloučenin. V mnoha oborech je dnes využíváno celé řady způsobů optimalizace, často založených na komplexní RSM (Response Surface Methodology) metodice. Jedním z nich je i CCD (Central Composite Design), který představuje v současnosti nejpoužívanější účinný nástroj pro optimalizaci chromatografických stanovení.

Stanovení založené na kombinaci SPME extrakce a plynové chromatografie s hmotnostní detekcí bylo optimalizováno pro analyzování 19 těkavých senzoricky aktivních sloučenin v českém ležáku. Optimalizace byla provedena ve dvou po sobě jdoucích krocích. Prvním krokem byla volba aktivní vrstvy sorbčního vlákna, následně byly optimalizovány hlavní parametry SPME izolace. Výsledkem optimalizace bylo zlepšení přesnosti metody, vyjádřené poklesem relativní směrodatné odchylky (RSD) pod 15%_{rel.}

Využití konsorcia anaerobních bakterií a/nebo lignin modifikujících enzymů při produkci alkoholů nebo kyselin z pšeničné slámy

J. Novotný, P. Patáková, J. Kolek

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Celulóza je nejvíce rozšířený polysacharid v přírodě, který nemá potravinářské využití, a je proto vhodný jako surovina pro výrobu chemikálií. Obvyklý obsah celulózy a hemicelulózy v rostlinných buňkách je 40-80 % sušiny. Díky pevné struktuře lignocelulózového komplexu je přímé zpracování celulózy a hemicelulózy pro většinu mikroorganismů nemožné. Proto je třeba nalézt mikroorganismus schopný degradace lignocelulózové matrice nebo vyvinout účinnou techniku zpřístupňující sacharidickou složku pro tradiční mikrobiální producenty. Z tohoto důvodu jsme se v naší práci zaměřili na kultivace mezofilního anaerobního celulólytického konsorcia, izolovaného z koňského hnoje a dále pak na zlepšení výtěžku enzymatické hydrolýzy celulózy z alkalicky předupravené pšeničné slámy pomocí lignin – modifikujících enzymů bakteriálního původu. Při kultivaci celulólytického konsorcia v míchaném bioreaktoru bylo dosaženo nejvyšší koncentrace etanolu (0,77 g/l) při regulaci pH a nejvyšší koncentrace kyseliny máselné (0,35 g/l) byla detekována v bioreaktoru bez regulace pH. Dále jsme testovali produkci lignin-modifikujících a celulólytických enzymů u dvou aktinomycet *Nonomuraea gerenzanensis* a *Streptomyces coelicolor*. Nejvyšší enzymatická aktivita bakteriálních producentů byla zjištěna mezi 8.-12. dnem kultivace. Tyto enzymy byly následně aplikovány při enzymatické hydrolýze alkalicky předupravené pšeničné slámy s cílem zlepšit výtěžek glukózy a dalších monosacharidů.

Identifikace sekundárních metabolitů u bakterií, které obsahují biosyntetické genové shluky pyrrolobenzodiazepinů

L. Palánová, Z. Kameník¹, J. Masák²

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha², Akademie věd ČR¹

Abstrakt

Pyrrolobenzodiazepiny (PBD) jsou biologicky aktivní sekundární metabolity produkované převážně aktinomycetami, zejména pak bakteriemi rodu *Streptomyces*. U PBD byl prokázán protirakovinný účinek, a proto jsou tyto látky zajímavé z pohledu farmaceutického průmyslu. Objev nových PBD by tedy významně přispěl k rozšíření základního fondu látek, které mají potenciál k vývoji léků proti rakovině. Pro základ této práce jsme využili rapidně rostoucí množství dat z různých sekvenačních projektů uveřejněných v databázi GenBank. Analýzou těchto dat bylo nalezeno několik genových shluků, které kódují proteiny nezbytné pro biosyntézu PBD. Ve většině případů se však nejedná o přesnou kopii shluků pro biosyntézu již známých PBD. Kromě toho se tyto genové shluky nacházejí v kmenech, které dosud nebyly charakterizovány z hlediska produkce PBD.

Cílem této práce bylo ověřit pomocí polymerázové řetězové reakce, zda kmeny studované na základě analýzy sekvenačních dat opravdu obsahují PBD biosyntetický genový shluk, tyto kmeny kultivovat v různých médiích a pomocí LC-MS analýzy je produkčně charakterizovat.

U dvou kmenů, *Streptomyces regensis* a *Streptomyces purpureus*, byla prokázána produkce známého PBD tomaymycinu, a to i přesto že se jejich genové shluky významně liší. U kmene *Nocardiopsis prasina* bylo pro složení celého biosyntetického genového shluku nutné amplifikovat a osekvenovat úsek, který v sekvenačních datech chyběl a na základě analýzy celého shluku byl navržen produkt této biosyntézy. U kmene *Amycolatopsis jejuensis* byl izolován nový derivát porothramycinu, jehož struktura byla navržena s pomocí výsledků získaných funkční charakterizací methyltransferasy z biosyntézy porothramycinu.

Produkce a biologická aktivita pigmentů tvořených houbou *Monascus purpureus*

M. Patrovský, K. Šinová, P. Patáková

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Práce je zaměřena na zkoumání vlivu kultivačních podmínek na produkci pigmentů houbou *Monascus purpureus* a na testování vybraných biologických aktivit těchto pigmentů. Během kultivací byly obměňovány zdroje dusíku $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 a pepton a počáteční hodnoty pH kultivací (2,5; 5,5; 6,5; 8,0). Nejvyšší produkce žlutého pigmentu monascinu bylo dosaženo při kultivaci s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ při pH 8,0 (528 ± 29 mg/l) a nejvyšší produkce žlutého pigmentu ankaflavinu při kultivaci s peptonem při pH 5,5 (214 ± 6 mg/l). U oranžového pigmentu rubropunktatinu bylo nejvyšší produkce dosaženo při kultivaci s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ při pH 5,5 (322 ± 52 mg/l) a u oranžového pigmentu monaskorubrinu při kultivaci s peptonem při pH 5,5 (332 ± 50 mg/l). Naopak nejnižší produkce citrininu byla zjištěna při kultivaci s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ při pH 2,5 ($0,66 \pm 0,06$ mg/l). Všechny tyto kultivace probíhaly po dobu 10 dní při teplotě 30 °C při třepání 100 rpm.

Získané pigmenty i komplexní extrakty houbových mycelií byly následně testovány na své biologické vlastnosti, např. mutagenní účinek byl zkoumán pomocí Amesova testu.

1. Úvod

Houba rodu *Monascus* je po staletí používána v asijských zemích pro produkci tradiční červené fermentované rýže, která je součástí běžné stravy. Je známo celkem 9 druhů rodu *Monascus*: *M. pilosus*, *M. ruber*, *M. floridanus*, *M. eremophilus*, *M. pallens*, *M. sanguineus*, *M. lunisporas*, *M. argentinensis*, *M. anka* a *M. purpureus* (Shao a kol., 2011). K produkci červené fermentované rýže se nejčastěji používají *M. anka*, *M. ruber* a *M. purpureus* (Su a kol., 2005). Díky množství pigmentů, které jsou produkovány, je tato rýže využívána také v potravinářství jako barvivo. V Číně jsou například barviva produkována plísní rodu *Monascus* používána pro zvýraznění barvy téměř všech uzenin. V Číně, Japonsku, Taiwanu, Thajsku a na Filipínách jsou složky získávané z této fermentované rýže používány při konzervaci ryb a masa (Lin a kol., 2008). Odhaduje se, že více než miliarda lidí každý den konzumuje produkty fermentace plísně

Monascus. Také je využívána jako iniciátor fermentace rýžového vína nebo octa například v Číně a Japonsku (Yang a kol., 2015). Fermentovaná rýže je také díky své červené barvě a chuťovým vlastnostem používána i při přípravě pokrmů (Lin a kol., 2008).

Bezpečnost produktů houby *Monascus purpureus* vůči lidskému zdraví bývá někdy zkoumána kvůli produkci mykotoxinu citrininu, který vykazuje nefrotoxické a hepatotoxické účinky (Lin a kol., 2008).

Cílem naší práce bylo zkoumání vlivu kultivačních podmínek na produkci sekundárních metabolitů, izolace pigmentů a testování biologických vlastností získaných pigmentů produkovaných houbou *Monascus purpureus*.

2. Materiál a metody

2.1 Mikroorganismus

V rámci experimentální práce byl použit kmen houby *Monascus purpureus* izolovaný ze vzorku nesterilní červené fermentované rýže z Číny. Tento kmen je uložen v neveřejné sbírce mikroorganismů Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha a pomocí sekvence genu kódujícího 18s rRNA byl identifikován jako *Monascus purpureus*. Houba byla uchovávána na Sabouraudově agaru ve zkumavkách se šikmým agarem při teplotě 7 °C.

2.2 Kultivační média

Složení pre-kultivačního média: glukosa 20 g, pepton 10 g, kvasničný extrakt 3 g, KCl 0,5 g, KH_2PO_4 4 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g a $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g v 1 l destilované vody.

Složení kultivačního média: glukosa 40 g, pepton 8,84 g, dusičnan sodný 6,44 g, síran amonný 5 g, KCl 0,5 g, KH_2PO_4 4 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g a $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g v 1 l destilované vody.

2.3 Kultivace

Pro pre-kultivaci, ze šikmého agaru byly sterilní vodou smyty spory mycelia houby a následná suspenze převedena do pre-kultivačního média o objemu 50 ml ve 250 ml Erlenmeyerově baňce. Kmen byl pre-kultivován při 30 °C, na třepačce (100 rpm) po dobu 30 hod.

Po pre-kultivaci bylo 5 ml pre-kultivačního média převedeno do kultivačního média o objemu 50 ml v 250 ml Erlenmeyerově baňce. Produkční kultivace probíhala při 30 °C na třepačce (100 rpm) po dobu 10 dní.

Plíseň byla pěstována ve více kultivačních médiích, které se lišily zdrojem dusíku - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 a pepton a počáteční hodnotou pH (2,5; 5,5; 6,5; 8,0) Hodnota pH kultivačních médií byla upravena použitím 1M HCl nebo 1M NaOH. V každém kultivačním médiu byl stejný obsah dusíku: 1,06 g/l. Všechny kultivace byly provedeny pro srovnání ve třech paralelách a baňky byly zabaleny do alobalu (ochrana proti světlu).

2.4 Oddělení mycelia

K oddělení fermentovaného tekutého média a vzrostlého houbového mycelia byla kultivační média byla přefiltrována přes filtrační papír Whatman č.1.

2.5 Extrakce pigmentů

K získání intracelulárních pigmentů bylo mycelium houby extrahováno ve 20 ml 70% etanolu o pH 2 po dobu 1 hod. na třepačce při 100 rpm.

2.6 Stanovení pigmentů a citrininu

Pro stanovení pigmentů a mykotoxinu byla použita metoda vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC). Žluté a oranžové pigmenty byly stanoveny na HPLC Agilent 1100 s fotodiodovým detektorem při vlnových délkách 390 nm pro žluté a při 470 nm pro oranžové pigmenty. Mykotoxin citrinin byl stanoven na HPLC Waters Alliance 2695 s fluorescenčním detektorem s emisní vlnovou délkou 331 nm a excitační vlnovou délkou 500 nm. Pro stanovení pigmentů a citrininu byla použita kolona Watrex SN7632, 250x4 mm, Reprosil 100 C_{18} 5 μm . Mobilní fáze byla složena z 360 ml demineralizované vody a 640 ml acetonitrilu + 0,5 ml H_3PO_4 na 1 litr. Průtok byl nastaven na 1ml/min.

2.8 Testování mutagenních účinků pigmentů - Amesův test

Pro zjištění cytotoxických či mutagenních vlastností žlutých, oranžových pigmentů a směsných extraktů byl proveden Amesův test. K testování genových mutací se využívá několika kmenů histidin dependentní bakterie *Salmonella typhimurium* his- nesoucích různé mutace v histidinovém operonu. Výsledkem těchto mutačních změn je, že indikátorové kmeny nemají (na rozdíl od původního kmene) schopnost syntetizovat histidin a jsou závislé na jeho exogenním přísunu v živném médiu. Test je založen na zpětné mutaci auxotrofních kmenů vlivem přítomnosti mutagenní látky. Počet spontánně revertujících kolonií na misce je u každého kmene relativně konstantní. V případě, že se po přidání testované látky (pigmentu) počet revertujících kolonií zvýší, jedná se o mutagen

Vzorky byly testovány i tzv. s metabolickou aktivací, kdy se simuluje chování látky v průběhu její metabolické přeměny, neboť sama o sobě látka nemusí být mutagenní, ale její metabolit již ano.

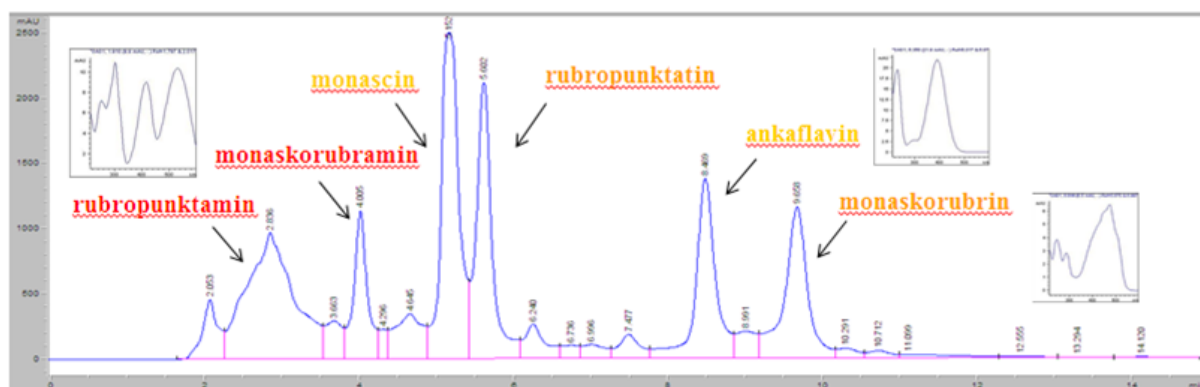
Jako pozitivní kontrola je při pokusu do média místo studované látky přidán mutagen (např. daunomycin, azid sodný či 2-aminofluoren). Typ mutagenu se liší podle použitého kmene bakterie. (Mortelmans a Zeiger, 2000).

Jednotlivé frakce pigmentů byly nasbírány pomocí sběrače frakcí jako součásti HPLC systému.

3. Výsledky a diskuse

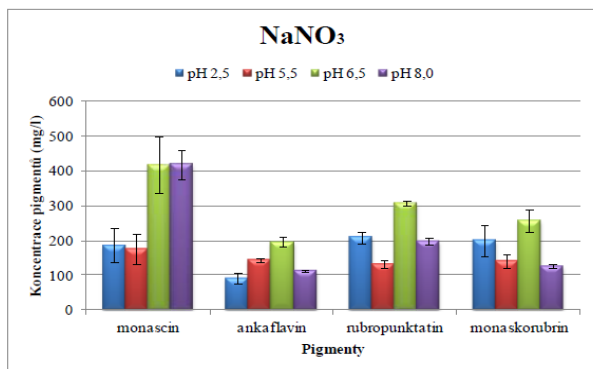
V rámci provedených pokusů, sledující vliv hodnoty pH a zdroje dusíku na produkci vybraných sekundárních metabolitů produkovaných kmenem houby *Monascus purpureus*, byly zjištěny jisté rozdíly jak v množství vytvořených pigmentů, tak v zastoupení jednotlivých zástupců pigmentů.

Pro ilustraci detekce pigmentů je uveden chromatografický záznamu pigmentů (Obrázek 1.) Jsou zde znázorněny píky pigmentů žlutých (monascin, ankaflavin) a oranžových (rubropunktatin, monaskorubrin) a červených (rubropunktamin, monaskorubramin). Žluté pigmenty dosahují nejvyšší absorpance při vlnové délce 390 nm, oranžové při vlnové délce 470 nm a červené při vlnové délce 510 nm. Chromatogram je zobrazen při vlnové délce 234 nm, což je vlnová délka, při které dochází k absorpci světla u všech pigmentů, i když při této vlnové délce nedosahují jednotlivé látky svých absorpčních maxim.

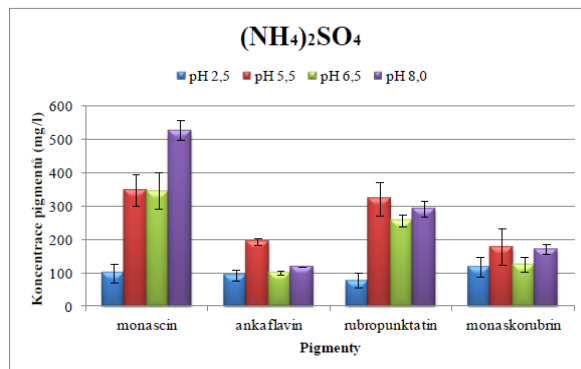


Závislost produkce pigmentů v závislosti na počáteční hodnotě pH byla zkoumána u třech různých zdrojů dusíku. Výsledky jsou graficky zpracovány pro jednotlivé zdroje dusíku - NaNO_3 (Obrázek 2.), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Obrázek 3.) a pepton (Obrázek 4.). Vliv počáteční hodnoty

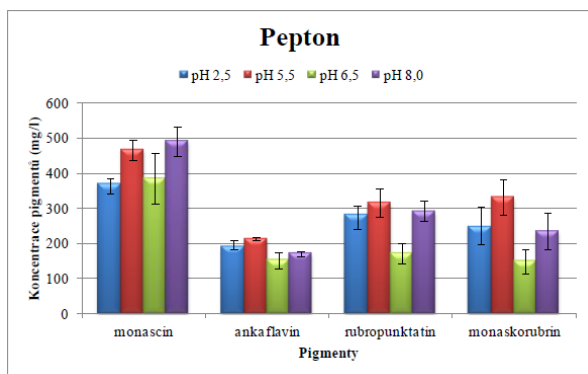
pH a zdroje dusíku na produkci citrininu je uveden na Obrázku 5. Všechny tyto kultivace probíhaly po dobu 10 dní, při teplotě 30 °C při třepání 100 rpm.



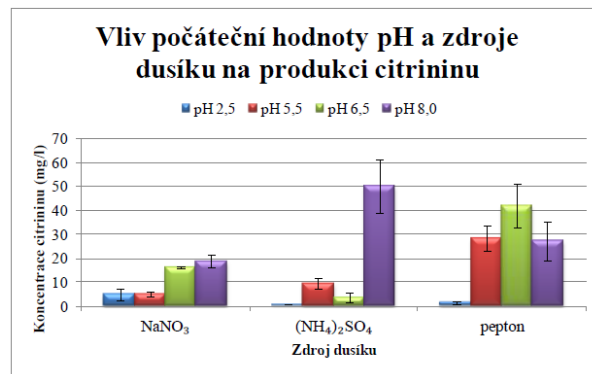
Obrázek 2. Produkce pigmentů při kultivaci s NaNO_3



Obrázek 3. Produkce pigmentů při kultivaci s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



Obrázek 4. Produkce pigmentů při kultivaci s peptonem



Obrázek 5. Vliv počáteční hodnoty pH a zdroje dusíku na produkci citrininu

Z Obrázku 2 - 4. je zřejmé, že nebyla nalezena jednoznačně nejvhodnější kombinace hodnoty pH a zdroje dusíku, která by vedla k nejvyšší produkci všech pigmentů. Yongsmith a kol. (1993) ve své práci uvádí, že nejvyšší produkce oranžových pigmentů je dosaženo při kultivaci s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ při pH 2,5. Shi a kol. (2015) pak tvrdí, že je této produkce dosaženo při hodnotách pH 2,5 a 4,0 bez ohledu na použitý zdroj dusíku. Tato skutečnost nebyla ovšem v této práci potvrzena. Z Obrázku 3. je patrné, že produkce oranžových pigmentů byla při kultivaci s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ při pH 2,5 naopak nejnižší při srovnání s ostatními kultivacemi. Z Obrázku 2 - 4. lze vypozařovat, že k vyšší produkci oranžových pigmentů docházelo při kultivacích s vyššími hodnotami pH bez ohledu na použitý zdroj dusíku. Shi a kol. (2015) dále konstatuje, že k nejnižší produkci žlutých pigmentů dochází při kultivaci s peptonem při pH 5,5. Z Obrázku 2 - 4. ale vyplývá, že například při kultivaci s NaNO_3 a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ při počátečním pH 2,5 dochází k nižší produkci monascinu i ankaflavinu. Tyto značné rozdíly v závěrech mohou být způsobeny zejména odlišnými podmínkami při kultivacích uváděných v této práci a podmínkami kultivací uváděných u Yongsmith a kol. (1993) (škrob, třepané baňky,

7 dní, 300 rpm) a Shi a kol. (2015) (bioreaktor, 7 dní, 500 rpm) a také použitým kmenem houby *Monascus*.

Z Obrázku 5. je patrné, že při nižších hodnotách pH dochází k nižší produkci citrininu při použití všech tří typů zdrojů dusíku. Toto zjištění je v souladu s Shi a kol. (2015) a Kang a kol. (2014). Nejnížší produkce citrininu bylo dosaženo při kultivaci s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ při pH 2,5 ($0,66 \pm 0,06$ mg/l). Z grafu je také zřejmé, že nejvyšší produkce citrininu bylo dosaženo při kultivaci s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a pH 8 ($50,4 \pm 11,2$ mg/l). Lze si také všimnout, že při kultivaci s peptonem byla produkce citrininu výrazně vyšší než při kultivaci s dalšími dvěma zdroji dusíku.

Dále v rámci experimentální části byl mimo jiné testován mutagenní či cytotoxický účinek pigmentů a extraktů.

V Tabulce 1. jsou zobrazeny hodnoty poměru R_{ti}/R_c pro jednotlivé koncentrace testovaných látek. R_{ti} je průměrný počet revertant při použití testované látky a R_c je průměrný počet kolonií spontánně revertujících na kontrolních miskách bez přidání mutagenu (negativní kontrola). Z Tabulky 1. je patrné, že většina hodnot poměru R_{ti}/R_c se pohybuje mezi hodnotami 1 a 2, což značí nemutagenní účinky testovaných látek. Hanáková (2016) však uvádí jako podezřelý, pravděpodobně mutagenní, komplexní vzorek obsahující oranžové a žluté pigmenty. V této práci ale vychází tato kombinace jako nemutagenní, pravděpodobně z důvodu použití nižší koncentrace pigmentů. Hsu a kol. (2014) testovali mutagenní účinky rýžového prášku získaného kultivací s *M. purpureus* NTU 568. Test byl proveden s metabolickou aktivací i bez metabolické aktivace. Výsledky tohoto testu byly negativní. Vzhledem k tomu, že ve studii nebyly pigmenty obsažené v rýžovém prášku kvantifikovány, nejsou tyto výsledky s výsledky uvedenými v této práci příliš srovnatelné.

Tabulka 1. Vyhodnocení Amesova testu pomocí poměru R_{ti}/R_c

Bez aktivace	Koncentrace pigmentů ($\mu\text{g}/\text{misku}$)			R_{ti}/R_c	
Testovaný vzorek	Žluté	Oranžové	Červené	TA 98	TA 100
Extrakt -NH4+	23,1	51,9	0,0	0,9	-
	11,6	25,9	0,0	-	1,0
Žluté pigmenty - monascin	5,1	0,0	0,0	1,8	0,7
Červené a oranžové pigmenty	0,0	9,5	5,8	1,0	0,9
Oranžové pigmenty	0,0	19,1	0,0	1,1	0,8
Červené pigmenty	0,0	0,0	11,6	1,0	0,8
S aktivací	Koncentrace pigmentů ($\mu\text{g}/\text{misku}$)			R_{ti}/R_c	
Testovaný vzorek	Žluté	Oranžové	Červené	TA 98	TA 100
Extrakt -NH4+	23,1	51,9	0,0	1,2	1,7
Žluté pigmenty - monascin	5,1	0,0	0,0	1,1	1,4
Červené a oranžové pigmenty	0,0	2,4	1,5	1,7	1,0
Oranžové pigmenty	0,0	19,1	0,0	-	1,4
	0,0	4,8	0,0	2,2	-
Červené pigmenty	0,0	0,0	11,6	1,1	1,6

R_{ti} = průměrný počet revertant při použití testované látky, R_c = průměrný počet kolonií spontánně revertujících na kontrolních miskách bez přidání mutagenu (negativní kontrola), R_{ti}/R_c < 1 značí pravděpodobně toxické účinky testované látky, R_{ti}/R_c > 2 značí pravděpodobně mutagenní účinky testované látky

S aktivací: simulace metabolické aktivace v játrech (vzorek obsahuje jaterní homogenát potkana)

Závěr

- V rámci této práce se podařilo stanovit nejvhodnější kultivační podmínky pro nejvyšší produkci jednotlivých pigmentů. Pro monascin to byla kultivace s (NH₄)₂SO₄ při pH 8,0 (528 ± 29 mg/l), pro ankaflavin kultivace s peptonem při pH 5,5 (214 ± 6 mg/l), pro rubropunktatin kultivace s (NH₄)₂SO₄ při pH 5,5 (322 ± 52 mg/l) a pro monaskorubrin kultivace s peptonem při pH 5,5 (332 ± 50 mg/l).
- Při zkoumání produkce pigmentů se podařilo zjistit, že k nejnižší produkci citrininu dochází při kultivaci s nižší hodnotou pH. Nejnižší produkce bylo dosaženo při kultivaci s (NH₄)₂SO₄ jako zdrojem dusíku při počátečním pH 5,5 (0,66 ± 0,06 mg/l).
- Při zkoumání mutagenních účinků extraktů a pigmentů pomocí Amesova testu se několik hodnot poměru R_{ti}/R_c odchylovalo od ideálního rozmezí mezi 1 až 2, což by mohlo ukazovat na toxické nebo mutagenní účinky testovaných látek.

Poděkování

Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2017)“

Literatura

- Hanáková M. (2016) Produkce sekundárních metabolitů houbou *Monascus purpureus*, VŠCHT v Praze, Ústav biotechnologie, 105.
- Hsu L. Ch., Hsu Y. W., Hong Ch. Ch., Pan T. M. (2014) Safety and mutagenicity evaluation of red mold dioscorea fermented from *Monascus purpureus* NTU 548. Food and Chemical Technology, 67, str. 161-168.
- Kang B., Zhang X., Wu Z., Wang Z., Park S. (2014) Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. Enzyme and Microbial Technology, 55, str. 50-57.
- Lin Y. L., Wang T. H., Lee M. H. (2008) Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. Applied Microbiology and Biotechnology, 77, str. 965-973.
- Mortelmans K., Zeiger E. (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455, str. 29-60.
- Shao Y., Xu L., Chen F. (2011) Genetic diversity analysis of *Monascus* strains using SRAP and ISSR markers. Mycoscience, 52, str. 224-233.

Shi K., Song D., Chen G., Pistozzi M., Wu Z., Quan L. (2015) Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering, 120, str. 145-154.

Su N. W., Lin Y. L., Lee M. H., Ho Ch. Y. (2005) Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. Journal of Food Agricultural and Food Chemistry, 53, str. 1949-1954.

Yang Y., Liu B., Du X., Li P., Liang B., Cheng X., Du L., Huang D., Wang L., Wang S. (2015) Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. Scientific Reports, 5.

Yongsmith B., Tabloka W., Yongmanitchai W., Bavavoda R. (1993) Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB 10 grown on cassava medium. Worl Journal of Microbiology & Biotechnology, 9, str. 85-90.

Kultivace bakterií *Salinispora tropica* a testování biologické aktivity jejich karotenoidů

T. Potočár, Z. Ježková, T. Brányik

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Tato práce se zabývá kultivací mikroorganismu *Salinispora tropica* CBN 440 v Erlenmeyerových baňkách, laboratorních bioreaktorech, extrakcí celkových karotenoidů a testování jejich biologické aktivity na buněčných liniích. Rod *Salinispora* patří mezi obligátně mořské mikroorganismy neschopné růstu v demineralizované vodě tvořící množství sekundárních metabolitů. Jedním ze sekundárních metabolitů je karotenoid sioxanthin, patřící do atypické skupiny glykosylovaných karotenoidů.

V experimentální části byla zjišťována optimální kultivační teplota pro produkci biomasy, vliv osvětlení na produkci pigmentů a nárůst biomasy, vliv zdroje uhlíku a dusíku na nárůst a objemovou produktivitu biomasy a optimální intenzita míchání pro kultivaci v laboratorních bioreaktorech. Z biomasy byl extrahován extrakt celkových karotenoidů, který byl dále testován na buněčných liniích a analyzován na HPLC/MS.

Optimální kultivační teplota byla stanovena jako 28 °C s maximální koncentrací biomasy 2,25 g.l⁻¹ s objemovou produktivitou 0,41 g.l⁻¹.den⁻¹. Konstantním ozařováním při kultivaci byl zvýšen obsah karotenoidů o 16 % (1191 µg.g⁻¹) a bez přístupu světla snížen o 5 %. Výsledky úpravy media alternativními zdroji uhlíku a dusíku se prokázaly z hlediska nárůstu biomasy jako nevhodné. Při kultivaci za různých intenzit míchání bylo dosaženo nejvyšší koncentrace biomasy (4,15 g.l⁻¹) při 350 min⁻¹. Bylo stanoveno maximální množství tetrahydrofuranu v mediu (3 %), β-karotenu (2,68 ng.µl⁻¹) a extraktu karotenoidů (3 ng.µl⁻¹) pro zachování alespoň 90 % životaschopnosti buněčných linií. Nejlepší antioxidační účinky extraktu karotenoidů z biomasy *Salinispora tropica* byly prokázány na buněčné linii KYSE-30 při koncentraci 3 ng.µl⁻¹.

Vliv nízkoteplotního plazmatu na biofilm

M. Válková¹, E. Kvasničková¹, J. Masák¹, V. Scholtz²

¹ Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

² Ústav fyziky a měřicí techniky, VŠCHT Praha

1. Abstrakt

Mikroorganismy jsou nedílnou součástí světa okolo nás a jejich přítomnost může mít jak pozitivní, tak i negativní dopad. Řada z nich žije ve volné přírodě ve společenství a vytváří biofilm, který je podstatně odolnější než jednotlivé buňky. Jejich v poslední době stále častěji vznikající rezistence vůči celé řadě biologicky aktivních sloučenin, znamená značný problém při jejich odstraňování. Běžně používané antimikrobiální látky již nemusí být dostatečně účinné, aby zabránily růstu buněk, a následně další tvorbě a rozvoji biofilmu.

Hojně užívanými účinnými látkami u lidí a zvířat jsou antibiotika. Právě vzhledem k jejich častému používání ve vysokých koncentracích se výrazně zvyšuje rezistence biofilmů. Z toho důvodu je nutné použít vyšší dávku stávajících antibiotik nebo látky se silnější biologickou aktivitou. V obou případech se setkáváme se značnými nežádoucími účinky, které mají negativní vliv na zdravotní stav pacienta.

Tvorba biofilmů je značným problémem také v potravinářském průmyslu. Existuje celá řada toxických látek (například fenoly, formaldehyd), které jsou schopny odstranit celá mikrobiální společenstva. Nicméně u potravin je nezbytné zajistit zdravotní nezávadnost produktu. Je nutné vyloučit možnou toxicitu, karcinogenitu nebo teratogenitu výrobku určeného pro konečného konzumenta (Scholtz a kol., 2015).

Jednou z možností, jak docílit efektivního a šetrného antimikrobiálního účinku, bez vedlejších vlivů, je využití nízkoteplotního plazmatu (NTP). Důvodem mohou být nízké investiční a provozní náklady a absence trvalých škodlivých produktů (Alkawareek a kol., 2014). Dále se mezi velké klady řadí i nízká pracovní teplota. To je rozhodující u tepelně citlivých materiálů a surovin. Například v potravinářství, ale i v medicíně může při vyšších teplotách docházet k denaturaci proteinů, či k různým fyziologickým změnám. NTP nabízí alternativu pro teplotně labilní látky, neboť teploty nepřesahují 45 °C nebudou mít destruktivní účinek (Schlüter a Fröhling, 2014). NTP má vysoký potenciál pro použití v medicíně např. při léčbě chronických ran, karcinomů, v zubním lékařství, při srážení krve, apod. Zajímavá je i potenciální možnost kombinace NTP s dalšími mikrobicidními látkami, například s antibiotiky (Fridman a kol., 2008).

2. Literatura

Alkawareek M.Y., Gormana S.P., Grahamc W.G., Gilmore B.F. (2014) Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **43**, str. 154–60.

Fridman G., Friedman G., Gutsol A., Vasilets V.N., Fridman A. (2008) Applied Plasma Medicine. *Plasma Processes and Polymers*, **5**, str. 503–533.

Schlüter O., Fröhling A. (2014) Non-thermal processing – Cold plasma for Bioefficient Food Processing (*Encyclopedia of Food Microbiology: Reference Module in Food Science* (2. vydání), Batt C.A, Tortorella M.L.), Academic Press, Německo, str. 948–953.

Scholtz V., Pazlarova J., Sousova H., Khun J., Julak J. (2015) Nonthermal plasma — A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology Advances*, **33** (6, část 2), str. 1108–1119.

Profil lipidů kvasinek rostoucích na netradičních zdrojích uhlíku

Bc. M. Zimola, Ing. I. Kolouchová, Ph.D., Ing. L. Gharwalová

Ústav biotechnologie, VŠCHT Praha

Abstrakt

Růst mikroorganismů, ale také obsah buněčných i zásobních lipidů, je ovlivněn velkým množstvím parametrů, které lze při jejich kultivacích zvolit. Jedním z nejdůležitějších parametrů je zdroj uhlíku, který je pro kultivaci mikroorganismů používán. Tato práce se zabývá využitím n-alkanů, jako netradičních zdrojů uhlíku. Alkany jsou nerozpustné ve vodě a obecně obtížně užitelné pro široké množství mikroorganismů. Schopnost mikroorganismů využívat tento netradiční zdroj uhlíku je často vázána na produkci látek typu surfaktantů, které napomáhají transportním mechanismům buňky. Růst mikroorganismů na alkanech ovlivňuje nárůst biomasy, dále obsah a složení lipidů v jejich buňkách. Je sledován vliv koncentrace vybraných n-alkanů na obsah a složení buněčných lipidů vybraných rodů kvasinek, které disponují speciálním enzymatickým aparátem pro využití alkanů z kultivačního media.

**Sborník souhrnů a plných textů konference
KVASNÁ CHEMIE A BIOINŽENÝRSTVÍ 2017**

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

Editor: Olga Mařátková

Rok vydání: 2017

Počet stran: 74

Jedná se o elektronickou verzi publikace ve formátu PDF na CD-ROM.