



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE



5. seminář

PIVOVARSTVÍ A KVASNÉ TECHNOLOGIE 2008

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

3. a 4. dubna 2008



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Sborník souhrnů a plných textů příspěvků

5. seminář

PIVOVARSTVÍ A KVASNÉ TECHNOLOGIE 2008

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

3. a 4. dubna 2008

Pořádající instituce:

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

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

Sponzoři:



IMMUNOTECH a.s.
DRINKS UNION a.s.
Budějovický Budvar n.p.
STAROBRNO, a.s.
Plzeňský Prazdroj, a.s.
Pivovar HOLBA, a.s.
Pivovary Staropramen, a.s.

Přípravný a organizační výbor:

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

Členové: Ivana Dušková, e-mail: ivana.duskova@vscht.cz

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

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

Editor: Fiala J.

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

Rok vydání: 2008

ISBN 978-80-7080-702-6

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

Program:

Čtvrtek 3. dubna 2008 - Konferenční centrum VŠCHT Praha, kolej Sázava, areál vysokoškolských kolejí Praha 4 – Kunratice

8:00 – 9:00 Registrace účastníků

Přednášková sekce

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

9:10 – 9:30 Basařová G.: **Staré zvyky a obyčeje v pivovarství**

9:30 – 9:40 Rýparová A., Karabín M.: **Tvorba degradačních produktů iso-alfa-hořkých kyselin**

9:40 – 9:50 Prokop Z., Fiala J.: **Sledování a charakterizace fyziologických změn v pivovarských kvasinkách**

9:50 – 10:00 Zvoník J., Dostálek P.: **Stanovení polyfenolů v pivu a pivovarských surovinách**

10:00 – 10:10 Cíchová M., Urbánek A., Fiala J.: **Vliv taninů na obsah a složení polyfenolů bílých vín**

10:10 – 10:20 Rajchl A., Lukešová D., Čížková H., Voldřich M., Panovská Z.: **Detekce přídavku aromatizujících preparátů do vín**

10:20 – 10:30 Ehlová T., Karabín M., Dostálek P.: **Tvorba aduktů karbonylových sloučenin oxidem siřičitým**

10:30 – 10:40 Valeš M., Rychtera M.: **Charakterizace lihovarských výpalků, jejich přeúprava a následné biotechnologické zpracování**

10:40 – 11:00 *Přestávka*

11:00 – 11:10 Teplý J., Patáková P.: **Využití zemědělských surovin a odpadů pro fermentační produkci rozpouštědel**

11:10 – 11:20 Palkovičová Z., Patáková P.: **Screening kmenů pro fermentační produkci rozpouštědel**

11:20 – 11:30 Horáková P., Brányik T.: **Hýdrolýza alternativních zdrojů zkvasitelných cukrů**

11:30 – 11:40 Václavíková E., Kuncová G., Brányik T.: **Enzymové biosenzory pro fermentační procesy**

- 11:40 – 11:50 Brož A., Košin P., Šavel J.: **Rychlá kontrola průběhu kvašení v CKT pomocí NIR spektrometrie**
- 11:50 – 12:00 Rouč M., Koucký O., Fiala J.: **Optimalizace ATP bioluminiscenčních metod v provozních podmínkách**
- 12:00 – 12:10 Dvořáková E., Dvořák M., McMullen L., Chumchalová J.: **Teplotní tolerance vybraných bakterií rodu *Carnobacterium***
- 12:10 – 12:20 Moravec J., Melzoch K.: **Uplatnění membránových procesů ve vybraných odvětvích potravinářského průmyslu**
- 12:20 – 12:30 Vildová I., Růžek K.: **Firemní presentace - Plzeňský Prazdroj, a.s.**
- 12:30 – 14:00 ***Přestávka na oběd***
- 14:00 – 14:10 Fribert P., Melzoch K.: **Využití bakterií *Zymomonas mobilis* pro produkci ethanolu z obilných zápar**
- 14:10 – 14:20 Černý V., Rychtera M.: **Aerobní termofilní stabilizace odpadních kalů z čistírny průmyslových a zemědělských odpadů**
- 14:20 – 14:30 Baszczyński M., Brányik T.: **Stanovení stáří buněčné populace pomocí průtokové cytometrie**
- 14:30 – 14:40 Novák P., Brányik T.: **Kontinuální kvašení nealkoholického piva**
- 14:40 – 14:50 Kuřec M., Brányik T.: **Povrchové vlastnosti pivovarských kvasinek a jejich vliv na imobilizaci adhezí na částice mláta v gas-lift reaktoru**
- 14:50 – 15:00 Linhová M., Branská B.: **Faktory ovlivňující cytometrické stanovení buněčné viability u kvasinky *Pichia pastoris***
- 15:00 – 15:10 Marek J., Paulová L.: **Využití různých substrátů při expresi proteinů kvasinkou *Pichia pastoris***
- 15:10 – 15:20 Bryzgal T., Bražina M., Rouč M., Knytl M., Fiala J.: **Mykotoxiny ve sladařství a pivovarství**
- 15:20 – 15:40 ***Přestávka***

Prezentace firem

- 15:40 – 17:00 Presentace firem
- 17:00 – 17:30 Diskuse

Pátek 4. dubna 2008 - Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Posterová sekce

Diskuse v prostorách Ústavu kvasné chemie a bioinženýrství

Možnost návštěvy vybraných laboratoří a technologické haly ÚKCHB

Sraz účastníků 9:00 hodin před knihovnou ÚKCHB, VŠCHT Praha - budova A, Technická 5, Praha 6, 1. patro

Staré zvyky a obyčeje v pivovarství

Basařová Gabriela

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

V pivovarství se od pradávna udržovalo mnoho zvyků a obyčejů, především o Velikonocích, Vánocích a kolem Nového roku a na svátek Tří králů. Nejvíce se slavil masopust s pohřbíváním Bacchuse a s bohatou maškarní veselící. O Vánocích a Velikonocích se udržovaly zvyky, jejichž součástí byla i koleda a vybírání dárků od vedení pivovaru (sládka) a odběratelů. Vedoucí osobností svátečních setkání, které všichni vykazovali úctu, byl sládek pivovaru se svojí rodinou. V přednášce jsou popsány i další zvyky a obyčeje uplatňované v minulých stoletích v českých a moravských pivovarech.

Tvorba degradačních produktů iso-alfa-hořkých kyselin

Rýparová Alena, Karabín Marcel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem prezentované práce na téma „Tvorba degradačních produktů iso- α -hořkých kyselin“ bylo zjistit vliv reakčních podmínek na rozklad standardu iso- α -hořkých kyselin za vzniku jejich degradačních produktů a dále sledovat vliv podmínek skladování na obsah iso- α -hořkých kyselin, na celkové množství oxidu siřičitého v pivu a na změny antioxidačního potenciálu piva.

Byly analyzovány dicyklohexylaminové standardy iso- α -hořkých kyselin, jejichž rozklad byl sledován při pokojové teplotě na světle a bez přístupu světla, při teplotě 35°C bez přístupu světla bez přídavku a s přídavkem antioxidantu. Dále byly testovány vzorky hotového piva z jedné šarže, které byly skladovány při pokojové teplotě na světle a ve tmě a při teplotě 30°C ve tmě po dobu pěti měsíců.

Nejvýznamnější vliv na rozklad standardu iso- α -hořkých kyselin má zvýšená teplota. Přídavkem antioxidantu se rozklad iso- α -hořkých kyselin zpomalí. Rozkladem standardu iso- α -hořkých kyselin vznikají jejich degradační produkty, jejichž možné struktury byly navrženy pomocí metody HPLC-NMR. Závislost mezi rozkladem iso- α -hořkých kyselin a mezi vznikem jejich degradačních produktů je lineární.

Naměřené výsledky potvrdily, že při nevhodném skladování hotového piva zvláště při zvýšené teplotě, dochází k úbytku obsahu iso- α -hořkých kyselin. V hotovém pivu byl zjištěn výraznější pokles obsahu trans- isomerů iso- α -hořkých kyselin než jejich cis- isomerů.

Během skladování piva dochází také k výrazným ztrátám oxidu siřičitého a antioxidačního potenciálu piva. Změny sledovaných analytických veličin byly nejvýraznější u vzorků uložených při 30°C. Nebyl zaznamenán rozdíl v rychlosti úbytku sledovaných analytických veličin během skladování piva při pokojové teplotě na světle a při pokojové teplotě bez přístupu světla.

Sledování a charakterizace fyziologických změn v pivovarských kvasinkách

Prokop Zdeněk, Fiala Jaromír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo studium změn obsahu intracelulárních látek a vlastností buněčné stěny během propagace a obsahu intracelulárních látek, vlastností buněčné stěny a obsahově významných látek v mladině v průběhu hlavního kvašení.

Zkoumány byly tři provozní kmeny spodních pivovarských kvasinek, které prošly dvěma odlišnými způsoby uchovávání. První populace kvasinek byly uchovávány klasickým způsobem na sladínovém agaru v lednici při teplotě 4 °C po dobu jednoho roku s pravidelným přeočkováváním každé tři měsíce a druhé populace byly uchovávány s přidavkem ochranné látky v elektrickém mrazícím zařízení při teplotě -70 °C po dobu jednoho roku.

Ve stejný moment byla zahájena propagace i hlavní kvašení u všech sledovaných populací a byly pozorovány odlišnosti v parametrech – nárůst biomasy, hydrofobita, sedimentační schopnosti, rH, úbytek extraktu, využití sacharidů a aminokyselin, tvorba vicinálních diketonů, relativní velikost a granularita buněk a obsah intracelulárních látek v buňkách kvasinek.

Získané výsledky ukázaly, že kvasinky uchovávané způsobem klasickým i novějším za použití teploty -70 °C se od sebe významněji neliší a zachovávají si vitalitu a viabilitu na velmi podobné úrovni.

Stanovení polyfenolů v pivu a pivovarských surovinách

Zvoník Josef, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývala vývojem obsahu fenolových látek, zejména flavan-3-olů v průběhu sladování a výroby piva. Pro kvantifikaci těchto látek byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detekcí diodovým polem i s detekcí hmotnostní.

V průběhu sladování byl potvrzen spíše pokles všech flavan-3-olů s výjimkou katechin-glukosidu. Tato látka v průběhu sladování vzniká a to zřejmě během namáčení a klíčení. Obsah fenolových kyselin zůstává na stejné úrovni nebo se zvyšuje, jelikož se uvolňují ze svých vázaných forem.

Bilance látek v průběhu výroby piva je velmi obtížná. U velmi různorodých várek byl však zjištěn pokles obsahu flavan-3-olů, zejména polymerovaných. Obsah fenolových kyselin zůstává na stejné úrovni nebo mírně klesá.

Výsledky práce naznačují, že stabilizační prostředek na bázi polyamidu dokáže stabilizovat s větší účinností, než stabilizátor s polyvinylpolypyrrolidonem i přesto, že odstraňuje menší množství polyfenolů.

Antioxidační kapacita je nejvyšší u mladiny, kde se k fenolovým sloučeninám sladu přidávají vysoce antioxidačně účinné látky z chmele. V průběhu další výroby piva antioxidační kapacita spíše klesá. Extrakční postup použitý na vzorky v této práci výrazněji neovlivňuje antioxidační vlastnosti a tedy zřejmě ani profil fenolových látek.

Vliv taninů na obsah a složení polyfenolů bílých vín

Cíchová Marie¹, Urbánek Aleš², Fiala Jaromír¹

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Bohemia Sekt, a.s.

Rostlinné látky fenolové povahy se ve víně vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, proto je nutné tyto látky před samotným stanovením zakoncentrovat. Vhodnou metodou pro izolaci, purifikaci a zakoncentrování fenolových látek ze složité matrice je extrakce na pevné fázi (SPE). Nejdůležitějšími skupinami fenolických látek jsou fenolické kyseliny, flavonoidy, flavanoly, anthokyany a třísloviny. Tyto látky slouží jako redukční činidla a podobně jako vitamin E a C či karotenoidy ochraňují lidské tkáně před oxidačním stresem, který může být doprovodným jevem mnoha onemocnění jako např. rakoviny, koronárních a zánětlivých onemocnění.

Tato práce se zabývá stanovením celkových a jednotlivých polyfenolických látek ve víně, jejich obsahem a změnami jejich obsahu po přidavku taninů ve dvou různých koncentracích. Vína byla před i po přidavku taninů podrobena senzorické analýze a byl sestaven chuťový profil vlivu taninů na senzorické vlastnosti.

Přídavek taninu do vína může výrazně ovlivnit chuť i vůni vína, jak pozitivně tak i negativně. Výsledky získané v práci jsou použitelné pro optimalizaci přídavku taninů do vín révy vinné v koncentraci, která nejlépe ovlivňuje senzorickou kvalitu vína. Pro volbu vhodného taninu je nutné přihlídnout k tomu, že každá vinařská oblast a víno v ní vyrobené, má rozdílné podmínky pro zrání hroznů a jiné technologické postupy při výrobě vína..

Detekce přídavku aromatizujících preparátů do vín

Rajchl A.¹, Lukešová D.², Čížková H.¹, Voldřich M.¹, Panovská Z.²

¹Ústav konzervace potravin a technologie masa, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

²Ústav chemie a analýzy potravin, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6

Úvod

Pyrazíny patří mezi senzoricky významné dusíkaté heterocyklické látky. Kromě alkyipyrazínů, které se významnou měrou podílejí na chuti a vůni většiny tepelně upravených, především pak pečených a smažených potravin, patří mezi senzoricky nejvýznamnější alkoxyipyrazíny. Mezi nejvýznamnější zástupce alkoxyipyrazínů patří methoxyipyrazíny (MP).

Methoxyipyrazíny se vyskytují ve zpracovaných potravinách, ale rovněž v syrové zelenině (v hrášku, řepě, zelené paprice, rajčatech) a ve vinných hroznech. MP lze dle hlediska vzniku zařadit mezi látky aromatické primární, tedy takové, které mají původ v hroznech a tvoří odrůdový charakter vína. K této skupině se řadí také prefermentační látky, které se tvoří v období mezi sběrem hroznů a začátkem alkoholové fermentace.

V odrůdách Cabernet sauvignon a Sauvignon je možné nalézt tři významné zástupce MP. Převládajícím pyrazínem je 3-isobutyl-2-methoxyipyrazín (IBMP), který se v této odrůdě vína nachází v koncentracích 5-50 ng/l a jehož aroma je popisováno jako „zelené“ a po paprice. Dále v odrůdě Cabernet sauvignon a Sauvignon nalezneme 3-sec-butyl-2-methoxyipyrazín (SBMP) a 2-methoxy-3-isopropylipyrazín (IPMP). Prahová hodnota detekovatelná čichem pro tyto pyrazíny je v rozmezí od 1 ng/l do 42 ng/l a aroma má charakter čerstvě posekané trávy. Ve stopových hladinách je přítomen 3-ethyl-2-methoxyipyrazín (ETMP).

Obsah MP ve víně závisí hlavně na stupni dozrání hroznů, jejich obsah rapidně klesá v období, kdy se začínají vybarvovat hrozny. Dále obsah závisí na klimatu, takže vína z chladnějších oblastí obsahují více MP než stejné typy vín z teplejších oblastí. Vliv má také sluneční svit, protože hrozny dozrávající v temnu obsahují až třikrát vyšší koncentraci MP.

Cíl práce

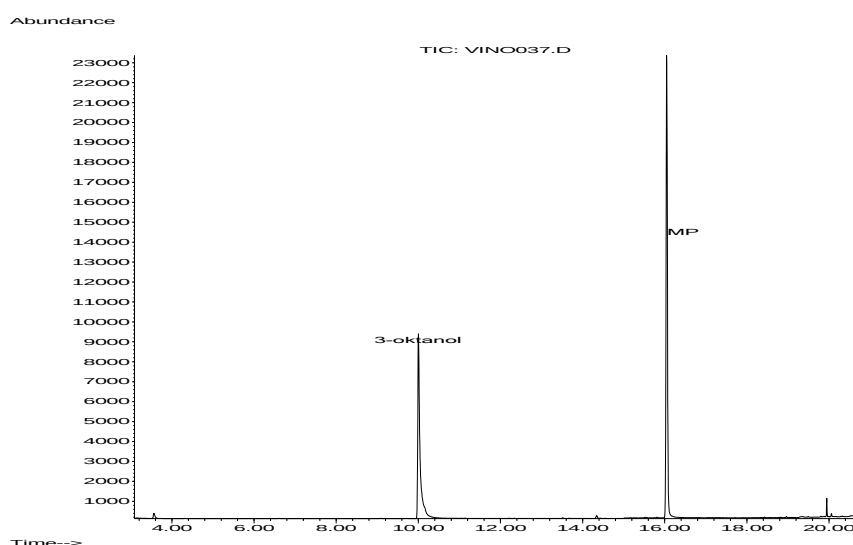
Práce byla zaměřena na stanovení charakteristických aromatických profilů vína Sauvignon a identifikaci přídavku umělého aroma dostupného na trhu v České republice s použitím metody SPME/GC/MS. Metodami senzorické analýzy bylo zjišťováno, zda lze lidskými smysly rozpoznat přídavek aromatického preparátu a v jakém koncentračním rozmezí je přídavek pro hodnotitele chuťově příjemný.

Metoda SPME/GC/MS

V posledních letech se často používá izolační technika mikroextrakce na tuhé fázi (SPME), která dovoluje rychlou a poměrně spolehlivou analýzu aromatických látek

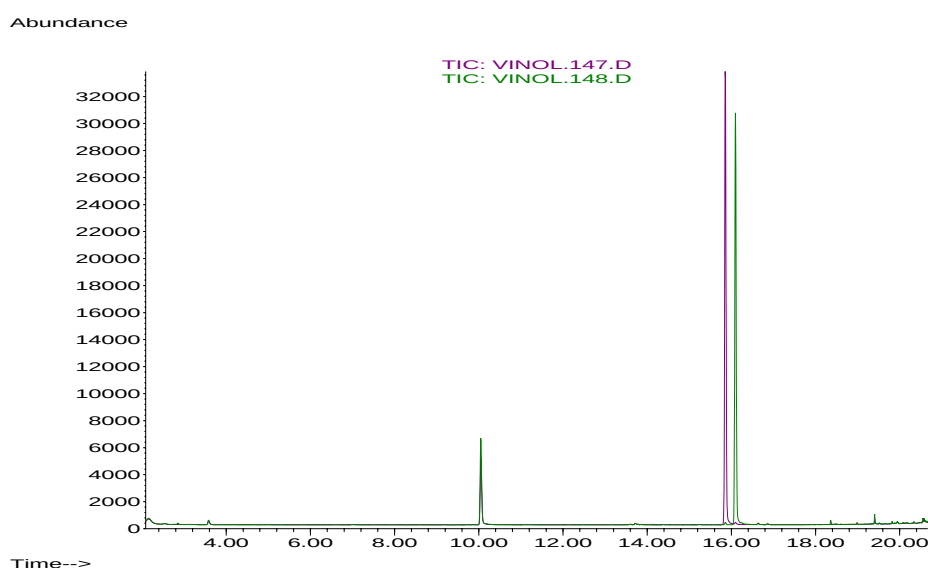
ve víně. Kombinace SPME s plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem nabízí jednoduchý, rychlý a citlivý přístup vhodný pro charakterizaci sloučenin aroma vína bez složitého postupu přípravy vzorku.

Sorpce aromatických látek byla prováděna za využití vlákna Supelco SPME Fiber Assembly 100 μm Polydimethylsiloxane Coating (PDMS). Veškeré analýzy byly prováděny s přidavkem soli (NaCl) a za míchání 900 otáček/minutu. Čas sorbce činil 30 minut při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$. Délka doby desorpce aromatických látek z SPME vlákna při analýze činila 2 minuty. Pro stanovení celkového profilu aromatických látek byl využit teplotní program 1 (výdrž 50 $^{\circ}\text{C}$ / 5 minut, nárůst 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do teploty 150 $^{\circ}\text{C}$, nárůst 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 220 $^{\circ}\text{C}$, výdrž při 220 $^{\circ}\text{C}$ /2 minuty, teplota MS detektoru: 220 $^{\circ}\text{C}$, mobilní fáze: helium, průtok 1,2 ml/minutu), pro stanovení methoxypyrazínů byl použit zrychlený teplotní program 2 (výdrž 50 $^{\circ}\text{C}$ /5 minut, nárůst 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do teploty 110 $^{\circ}\text{C}$, nárůst 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 220 $^{\circ}\text{C}$, výdrž při 220 $^{\circ}\text{C}$ /2 minuty, teplota MS detektoru: 220 $^{\circ}\text{C}$, mobilní fáze helium, průtok 1,2 ml/minutu), který umožnil zkrácení analýzy z 35 minut na 20 minut při zachování dobré separace píků methoxypyrazínů. Kvantifikace byla provedena pomocí standardu IBMP (98%, Sigma Aldrich). Jako vnitřní standard byl použit 3-oktanol. Ukázka chromatogramu standardu IBMP s vnitřním standardem 3-oktanolem je na obrázku 1.



Obrázek 1 Ukázkový chromatogram standardu IBMP s vnitřním standardem 3-oktanolem

Ve vínech typu Sauvignon byl jako charakteristická látka určen IBMP jehož koncentrace se pohybovala v rozmezí 4,67-17,0 ng/l, průměrná hodnota byla 11,2 ng/l. Byla provedena analýza umělého aroma, Aroma fantasia S (imitující aroma Sauvignon), které je běžně dostupné na trhu v ČR. Bylo zjištěno, že umělé aroma neobsahuje hlavní pyrazín vína typu Sauvignon 2-methoxy-3-(1-methylpropyl)-pyrazín, ale jeho isomer 2-methoxy-3-(2-ethylpropyl)-pyrazín, jehož sensorické vlastnosti jsou obdobné, ale chromatografické mírně odlišné (jiné charakteristické fragmenty a jejich zastoupení, jiný retenční čas). Chromatogram standardu s umělým aromatizujícím preparátem je na obrázku 2.



Obrázek 2 Překrytý chromatogram, fialový chromatogram je standard IBMP o koncentraci 100 µg/l a zelený chromatogram je roztok modelového roztoku vína s přídavkem umělého aromatizujícího preparátu. Je patrné dobré chromatografické dělení obou methoxypyrazínů

Senzorická analýza

Ve víně Veltlínské zelené nebyla látka IBMP primárně detekována. Tento druh vína byl vybrán pro posouzení přídavku jediného aromatizujícího preparátu na českém trhu obsahujícího 2-methoxy-3-(2-methylpropyl)-pyrazín, který má obdobné senzorické vlastnosti jako 3-isobutyl-2-methoxypyrazín. Obohacení umělým aromatizujícím preparátem bylo testováno ve dvou sadách. V sadě označené A byly koncentrace umělého aromatizujícího preparátu 1, 5, 10 a 50 ng/l, v sadě označené B byl přídavek 5, 10, 15 a 20 ng/l.

Hodnocení se zúčastnilo 23 hodnotitelů (19 žen, 4 muži) z řad studentů 4. ročníku FPBT, z řad zaměstnanců a studentů doktorandského studia. Vzorky byly označeny čtyřmístným kódem. Množství podávaného vzorku bylo 25 ml v kádince označené čtyřmístným kódem. Při hodnocení vůně byly vzorky podávány ve 100 ml skleněných uzavřených prachovnicích, s množstvím vzorku 30 ml. Obě sady byly hodnoceny stejnými hodnotiteli. Vzorky byly podávány při teplotě 20 °C. Neutralizátorem chuti byla voda, sýr a bílé pečivo.

Vzorky byly posuzovány pořadovou zkouškou (ČSN ISO 8587), která se užívá ke zjištění rozdílů mezi vzorky mezi větším počtem vzorků než dva. Hodnotitel obdrží řadu vzorků v náhodném pořadí a má za úkol je seřadit podle zkoumaného znaku. Vyhodnocení pořadové zkoušky se provádí dle metod Kramera, Friedmana a Page, při kterých se spočítají kritéria a porovnávají se se statistickými tabulkami. K zpracování získaných výsledků byla proto zvolena metoda dle Friedmana. Výsledky byly zpracovány statistickým programem STATVYD verze 2.0 beta (výpočet součtu pořadí a hodnoty F, která se porovnává s tabelovanou hodnotou) na hladině pravděpodobnosti 95 %.

V sadě A byly nalezeny statisticky významné rozdíly v celkové příjemnosti chuti. V tabulce I je uveden součet pořadí (nejvíce příjemný vzorek má nejmenší součet pořadí), v tabulce II jsou zobrazeny rozdíly mezi vzorky. Statisticky významný rozdíl na hladině pravděpodobnosti 95 % existuje, je-li vypočtená hodnota Friedmanova kritéria větší než tabelovaná hodnota pro 4 vzorky. Rovněž pro rozdíly součtu pořadí platí, že v případě průkazných rozdílů na hladině pravděpodobnosti 95 % je kritická hodnota větší než příslušný rozdíl součtu pořadí.

Tabulka I Součet pořadí – celková příjemnost chuti

Koncentrace MP (ng/l)	1	5	10	50
Součet pořadí	47	29	40	54
F = 12,04				
Kritická hodnota pro čtyři vzorky $\chi^2=7,81$				

Tabulka II Rozdíly součtu pořadí – celková příjemnost chuti

Kritická hodnota	5 ng/l	10 ng/l	50 ng/l
14,75			
1 ng/l	18	7	7
5 ng/l		11	25
10 ng/l			14

Podle součtu pořadí lze říci, že statisticky průkazné rozdíly na hladině pravděpodobnosti 95 % jsou mezi vzorky o koncentraci 1 a 5 ng/l a mezi vzorky o koncentraci 5 a 50 ng/l. Vzorek o koncentraci 5 ng/l byl hodnocen jako chuťově nejpříjemnější. Vzorek o koncentraci 50 ng/l byl hodnocen jako chuťově nejméně příjemný.

V sadě B byly nalezeny statisticky významné rozdíly v intenzitě zelené vůně mezi vzorky o koncentraci 10 a 20 ng/l a mezi vzorky o koncentraci 15 a 20 ng/l. Vzorek o koncentraci 20 ng/l byl vnímán jako vzorek s největší intenzitou zelené vůně. Mezi ostatními vzorky nebyly průkazné rozdíly. V tabulce III jsou uvedeny součty pořadí a v tabulce IV rozdíly součtu pořadí.

Tabulka III Součet pořadí – intenzita zelené vůně

Koncentrace MP (ng/l)	5	10	15	20
Součet pořadí	46	53	56	37
F = 12,79				
Kritická hodnota pro čtyři vzorky $\chi^2=7,81$				

5 ng/l	7	10	9
10 ng/l		3	16
15 ng/l			19

Tabulka IV Rozdíly součtu pořadí – intenzita zelené vůně

Kritická hodnota	10 ng/l	15 ng/l	20 ng/l
14,75			

Rozdíly byly rovněž nalezeny v sadě B v intenzitě zelené chuti. Podle součtu pořadí lze říci, že statisticky průkazné rozdíly nebyly shledány pouze mezi vzorky o koncentraci 5 a 10 ng/l. Hodnotitelé byli schopni seřadit vzorky podle intenzity zelené chuti, i když pořadí koncentrací 5 a 10 ng/l není statisticky průkazné. V tabulce V jsou uvedeny součty pořadí a v tabulce VI rozdíly součtu pořadí.

Tabulka V Součet pořadí – intenzita zelené chuti

Koncentrace MP (ng/l)	5	10	15	20
Součet pořadí	66	58	42	22
F = 29,78				
Kritická hodnota pro čtyři vzorky $\chi^2=7,81$				

Tabulka VI Rozdíly součtu pořadí – intenzita zelené chuti

Kritická hodnota 14,75	10 ng/l	15 ng/l	20 ng/l
5 ng/l	8	24	44
10 ng/l		16	36
15 ng/l			20

Závěr

Ve vínech typu Sauvignon dostupných na českém trhu byla hlavní složka určena látka 3-isobutyl-2-methoxypyrazín (IBMP), jehož koncentrace se pohybovala v rozmezí 4,67-17,0 ng/l. Na českém trhu byl nalezen jediný umělý aromatizující preparát firmy Zan aroma, u něhož se ukázalo, že obsahuje isomer IBMP 2-methoxy-3-(2-methylpropyl)-pyrazín, který má obdobné sensorické vlastnosti. Dále bylo zkoumáno, zda přichází v úvahu falšovat vína umělým aromatickým preparátem. Ze závěrů sensorické analýzy bylo zjištěno, že přídavek methoxypyrazínů do vína Sauvignon není potřebný, neboť byla sensoricky nejlépe hodnocena koncentrace methoxypyrazínů 5–10 ng/l, což je množství, které se běžně vyskytuje u tohoto typu vína. Vína s vyšším obsahem methoxypyrazínů jsou čichem i chuťovým smyslem považovány za negativní. Práce byla uskutečněna za pomoci vnitřního grantu č. 324/08/0015.

Literatura

Část analytická:

R.S. Whiton and B. W. Zoecklein: Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of wine aroma compounds. Am. J. Enol. Vitic. 51, No.4, 2000.

Peter J. Hartmann, Harold M. McNair and Bruce W. Zoecklein: Measurement of 3-alkyl-2-methoxypyrazine by headspace solid-phase microextraction in spiked model wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, No. 4, 2002.

Gy. Vas, K. Kőteleky, M. Farkas, A. Dobó and K. Vékey: fast screening method for wine headspace compounds using solid-phase microextraction (SPME) and capillary GC technique. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol.49, No.1, 1998.

Suhaj Milan, Kováč Milan, Metódy identifikácie falšovania a autentifikácie potravín 2. Alkoholické nápoje, Bulletin potravinárskeho výskumu, výskumný ústav potravinársky, Bratislava 39, 2000.

Část senzorická:

Balík, J., Goliáš, J. a kol.: Wine volatiles composition in the sensory evaluation of bouquet and flavour of two wine cultivars. *J. Horticultural Science* 29, 2002.

Landy, P., Courthaudon, J.-L., Dubois, C., Voilley, A.: Effect of interface in model food emulsions on the volatility of aroma compounds, *J. Agric. Food Chem.* 44, 996.

ČSN ISO 8587 (56 0032), část 1 – Metodologie – Pořadová zkouška, 1998.

Tvorba aduktů karbonylových sloučenin oxidem siřičitým

Ehlová Tereza, Karabín Marcel, Dostálek Pavel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Práce se zabývá studiem tvorby aduktů karbonylových sloučenin s oxidem siřičitým v modelovém systému, aplikací poznatků z modelové studie v analýze karbonylových sloučenin metodou SPME–GC/MS a sledováním tvorby aduktů během hlavního kvašení a dokvašování piva.

V experimentální části je použita metoda průtokové chronopotenciometrie pro stanovení oxidu siřičitého a metoda SPME-GC/MS pro kvantifikaci vybraných karbonylových sloučenin.

Pomocí metody průtokové chronopotenciometrie byla popsána závislost tvorby aduktů karbonylových sloučenin s oxidem siřičitým na pH, teplotě, koncentraci reaktantů a struktuře karbonylových sloučenin v modelovém systému, jehož základ tvořil acetátový pufr.

Sledováním rozpadu aduktů v pivu při teplotě 50 °C bylo zjištěno, že při zakoncentrování karbonylových sloučenin během SPME zaniká část aduktů přítomných v pivu a na vláknu se derivatizují nejen volné karbonylové sloučeniny, ale i ty, které pocházejí z rozpadlých aduktů a jsou za běžných podmínek senzoricky neaktivní.

Z hlediska tvorby aduktů během výroby piva je významná fáze dokvašování, kdy se na karbonylové sloučeniny váže až 50 % z celkového množství oxidu siřičitého, který byl vytvořen během hlavního kvašení.

Charakterizace lihovarských výpalků, jejich přeúprava a následné biotechnologické zpracování

Valeš Martin, Rychtera Mojmír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývá analýzou lihovarských výpalků, vlivem použitých surovin a technologického postupu přípravy na jejich složení, možnosti předúpravy a následného biotechnologického zpracování upravených i neupravených výpalků pomocí anaerobní digesce.

Jako hlavní parametry charakterizace řídkých výpalků byly zvoleny: CHSK, obsah sušiny a popelu, koncentrace minerálních látek a koncentrace glukózy, etanolu, glycerolu, kyseliny mléčné, jantarové a octové. V pevných fázích výpalků byl analyzován obsah sušiny, popelu, bílkovin a celulózy. Analyzované výpalky byly použity jako média pro anaerobní digesci.

Bylo provedeno celkem pět experimentů, jedna semikontinuální kultivace, tři „batch“ kultivace a jedna „batch“ kultivace s úpravou pH během procesu. Pro všechny experimenty byla použita směsná termofilní anaerobní bakteriální populace ve formě aktivovaného kalu z termofilní čistírny odpadních vod.

Semikontinuální kultivace měla informovat o chování používané mikrobiální populace na daném médiu. V „batch“ kultivacích byly jako médium použity upravené i neupravené výpalky. Poslední kultivace s úpravou hodnot pH měla informovat o vlivu hodnot pH na rychlost a celkovou produktivitu procesu.

Jako metody předúpravy výpalků byly použity separace a enzymová a kyselá hydrolýza pevných fází výpalků. Nejlepších výsledků na upravených materiálech bylo dosaženo při použití přídatku enzymově upravené pevné fáze k řídkým výpalkům. Největšího snížení organické zátěže výpalků a nejvyšší produkce bioplynu bylo dosaženo při kultivaci s úpravou hodnot pH.

Využití zemědělských surovin a odpadů pro fermentační produkci rozpouštědel

Teplý Jan, Patáková Petra

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývá využitím zemědělských surovin a odpadů pro fermentační produkci rozpouštědel. Tvorba těchto rozpouštědel byla sledována u čtyř bakterií z rodu *Clostridium*, jmenovitě u *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923, *C. beijerinckii* DSM 6422, *C. beijerinckii* CCM 6218 a *C. beijerinckii* NRRL B-466. Kultivace probíhala vsádkově v nemíchaných nádobách, 50 ml Erlenmeyerových baňkách nebo 10 ml skleněných zkumavkách, které byly opatřeny vatovou zátkou. Tyto nádoby byly pak v anaerobní nádobě při 37°C kultivovány v termostatu. Během kultivace bylo vyzkoušeno deset druhů médií, dvě obsahující melasu, dvě média z brambor, jedno z kukuřice, dvě s lihovarskými výpalky a tři s glycerolem.

Obsah organických rozpouštědel v médiu – acetonu, etanolu a butanolu, stejně jako obsah organických kyselin – kyseliny octové a máselné – obsah některých zdrojů uhlíku (glukosa a glycerol) byl stanoven pomocí HPLC analýzy. Koncentrace sacharosy u médií, které obsahovaly melasu, byla stanovena metodou podle Schoorla. Obsah škrobu v médiích z brambor a kukuřice byl stanoven pomocí enzymatické sady MEGAZYME AMYLOSE/AMYLOPECTIN. Biomasa získaná po kultivaci byla stanovena vážkově.

Médium, které poskytovalo nejvyšší koncentraci butanolu, bylo kukuřičné médium, zaočkované prostřednictvím buněčné bakteriální kultury. Na tomto médiu kmen *C. beijerinckii* CCM 6218 dosáhl koncentrace 9,44 g.dm⁻³ butanolu.

Nejvyšší podíl butanolu z celkového množství organických rozpouštědel byl dosažen také s použitím kmene *C. beijerinckii* CCM 6218, který byl kultivován na melasovém médiu typu A ve skleněných zkumavkách. Podíl butanolu činil 75 % všech rozpouštědel.

Zmiňovaný kmen *C. beijerinckii* CCM 6218 rovněž dosahoval nejvyšších koncentrací butanolu u většiny použitých médií.

Screening kmenů pro fermentační produkci rozpouštědel

Palkovičová Zlata, Patáková Petra

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce byla zaměřena na screening kultivačních podmínek pro vybrané 4 kmeny klostrídií tvořících rozpouštědla: *C. saccharoperbutylacetonicum* DSM 14923 (značený jako C3), *C. pasteurianum* NRRL B-598 (C7), *C. beijerinckii* NRRL B-466 (C8) a *C. beijerinckii* NRRL B-592 (C9).

Nejprve byla proměřena pro všechny kmeny růstová křivka na TYA médiu, při teplotě 37°C. Poté byly zjišťovány vlivy různých kultivačních podmínek na tvorbu rozpouštědel. Jednalo se o testování vlivu počátečního pH, kultivační teploty, počáteční koncentrace glukosy a přídavku octanu amonného v koncentraci 6 g/l. Vliv počátečního pH ve zkoumaném rozsahu nebyl velký, zato vliv teploty se ukázal jako zásadní. Při zvýšení obsahu glukosy došlo ke zvýšení tvorby rozpouštědel, ale zbytková koncentrace glukosy byla vysoká. I po přídavku octanu amonného došlo k vyšší produkci rozpouštědel, zároveň se však i ve vyšší míře tvořila kyselina máselná.

Dále byla provedena kultivace ve dvou stupních, kdy se druhý stupeň zaočkoval kulturou v exponenciální fázi do TYA média s vyšší koncentrací glukosy. Tím se docílily i nejvyšší výsledné koncentrace butanolu.

Jako další testované médium bylo zkoušeno GYE médium, a to ve dvou modifikacích. Při kultivaci na GYE médiu s vyšší koncentrací živin se dosáhlo výsledků porovnatelných s úspěšnějšími jednostupňovými kultivacemi.

Nakonec byla provedena izolace DNA kmenů C2, C3, C5 a C9 pomocí komerčního kitu UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit. Pro ověření úspěšnosti izolace byla poté provedena vizualizace produktů izolace pomocí elektroforézy. V Mikrobiologickém ústavu AV pak byla provedena typizace těchto čtyř kmenů na základě srovnání částí sekvence DNA, kódující 16S rRNA, s Evropskou databází ribosomální RNA.

Hýdrolýza alternativních zdrojů zkvasitelných cukrů

Horáková Petra, Brányik Tomáš

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Kromě tradičního využití ve výrobě alkoholických nápojů se ethanol stává nejrychleji rostoucím energetickým zdrojem současnosti. Tradičním substrátem pro výrobu ethanolu jsou zkvasitelné cukry pocházející ze zemědělských plodin obsahující škrob, jako je například kukuřice, pšenice a brambory, nebo z lignocelulozových materiálů. Nicméně výroba ethanolu ze škrobnatých substrátů je v současnosti energeticky nevýhodná a výroba je rentabilní jenom pomocí státních dotací. Do budoucna slibnější se zdá být produkce ethanolu z lignocelulozových hydrolyzátů, avšak její energetická náročnost a nižší výtěžnost ještě nedosahuje žádané úrovně.

Alternativním zdrojem zkvasitelných cukrů mohou být jednobuněčné řasy schopné vysoce účinné fixace CO_2 a akumulace intracelulárního škrobu. Navíc, kultivace těchto mikroorganismů na spalínách vznikajících ve spalovnách komunálního odpadu je potencionální způsob snížení emisí tohoto skleníkového plynu a zároveň významně snižuje náklady na produkci biomasy s vysokým obsahem škrobu (do 70% sušiny). Cílem tohoto projektu je studovat hydrolýzu škrobu pocházejícího z jednobuněčných řas pěstovaných na odpadních spalínách obsahujících vysoký podíl CO_2 .

Hydrolýza je chemický proces, při kterém v přebytku vody a působením vhodného katalyzátoru dochází k rozkladu substrátu na jeden nebo více nových produktů. Tento proces se uplatňuje v mnohých průmyslových odvětvích (lihovarnictví, pivovarnictví, škrobářství, pekárenství, farmaceutickém nebo textilním průmyslu).

Hydrolýza škrobu je důležitým krokem v úpravě škrobových substrátů. Probíhá při dostatečném zředění substrátu a účinku katalyzátoru, kterým mohou být ionty vodíku (kyselá hydrolýza) a nebo amylolytické enzymy (enzymová hydrolýza). Degradací škrobu vznikají dextriny, oligosacharidy, maltóza a glukóza. Při enzymové hydrolýze vznikají v menším počtu reverzní produkty, což přispívá k tomu že získáváme podstatně čistější hydrolyzáty. Hydrolýzu ovlivňuje kvalita a kvantita enzymu, teplota, pH, koncentrace substrátu, produktu a inhibiční látky v prostředí.

Enzymové biosenzory pro fermentační procesy

Václavíková Eliška¹, Kuncová Gabriela², Brányik Tomáš¹

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

² Ústav chemických procesů AV ČR

Cílem této práce bylo zvýšit stabilitu alkoholoxidasy (AOX) imobilizací na tyto nosiče: sepabeads EC-EP403 s epoxidovými skupinami, sepabeads EC-HA403 s hemamethylenaminovými skupinami, nanočástice SSG-59 obsahující epoxydové skupiny a nanočástice o průměru 35nm a 68,5nm, které obsahovaly pouze –OH skupiny. Povrch těchto nanočástic byl modifikován pomocí dvou činidel 3-aminopropyltrimethoxysilanu (APTS) a 3-(2-aminoethylamino)propyltrimethoxysilanu (AEAPS).

K imobilizaci enzymu byly využívány dva postupy dle Matea a dle Lopez-Gallegy. Rozdíl v jednotlivých postupech je v množství použitého enzymu, inkubačních časech, v množství použitého glycinu a v postupu dle Lopez-Gallegy se na promytí částic využívá 0,025M fosfátový pufr místo destilované vody.

U všech částic s imobilizovaným enzymem byla proměřena tepelná stabilita při zahřívání na 40°C.

V další části experimentální práce byly z částic, které vykazovaly aktivitu po 24 hodinách zahřívání připravené čočky s citlivými vrstvami a byla proměřena jejich odezva na přídavky ethanolu pomocí senzoru MATIONES, který monitoruje intenzitu fluorescence rutheniového komplexu v ORMOCER®u s imobilizovaným enzymem. Intensita fluorescence komplexu je zhasena kyslíkem, který využívá enzym pro oxidaci detekované látky.

Na závěr mé práce byla připravena čočka s citlivou vrstvou ze sepabeads s imobilizovanou glukosaoxidasou (GOX) a byl proměřen vliv teploty na odezvu signálu po přídavku glukosy.

Rychlá kontrola průběhu kvašení v CKT pomocí NIR spektrometrie

Brož Adam^{1,2}, Košin Petr^{1,2}, Šavel Jan²

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²Budějovický Budvar, n.p., České Budějovice

Prezentace

Optimalizace ATP bioluminiscenčních metod v provozních podmínkách

Rouč Michal¹, Koucký Ondřej^{1,2}, Fiala Jaromír¹

¹Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

²DRINKS UNION, a.s.

Pro vysokou kvalitu vyráběného piva je nezbytná účinná mikrobiologická kontrola v pivovarech. Kromě tradičních, většinou pracných a časově náročných metod, se v poslední době prosazují nové, moderní metody, které poskytují okamžité informace o znečištění. Jednou z nich je metoda ATP bioluminiscence, která nachází stále více využití v českých pivovarech.

Tato práce je zaměřena na možnosti využití ATP bioluminiscence ke kontrole mikrobiologické čistoty a její optimalizaci v pivovarské praxi. Byly testovány možnosti využití této metody ke kontrole povrchů, kontrole mikrobiologické čistoty hotového piva, kontrole oplachových vod a možnosti využití v kvasničném hospodářství. Nejvíce se ATP bioluminiscence osvědčila při kontrole povrchů a hotového piva.

Vzhledem k velkému počtu rozdílných luminometrů komerčně dostupných na trhu, je tato práce zaměřena pouze na bioluminometr SystemSURE II od společnosti Hygiena.

Teplotní tolerance vybraných bakterií rodu *Carnobacterium*

Dvořáková Eva, Dvořák Milan, McMullen Lynn, Chumchalová Jana

Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha

Bakterie mléčného kvašení jsou široce využívány v potravinářském průmyslu pro jejich schopnost prodloužit mikrobiální stabilitu výrobku díky produkci mnoha antimikrobiálních látek, jako jsou organické kyseliny, diacetyl, peroxid vodíku a bakteriociny.

Carnobacterium spp. patří mezi mikroorganismy používající se jako protektivní kultura. Tento druh bakterií mléčného kvašení se vyznačuje svojí schopností růstu a tvorby bakteriocinů s antilisteriálními účinky, zejména pak při nízkých teplotách a vysokých koncentracích NaCl. Na rozdíl od ostatních bakteriociny produkujících bakterií mléčného kvašení má *Carnobacterium* spp. nízkou schopnost produkce kyselin, proto je vhodná jako protektivní kultura pro masné výrobky (např. uzeniny).

Na základě těchto jedinečných vlastností byly doposud kmeny rodu *Carnobacterium* spp. aplikovány na povrch masných výrobků. Z důvodu optimalizace výrobních procesů se výzkum zaměřuje na možnost přidavku kultury před samotným tepelným opracováním přímo do díla.

Cílem práce bylo vybrat nejvhodnější kmen rodu *Carnobacterium* spp. s požadavkem na tepelné ošetření při 60 °C po dobu 10 min a zlepšit jeho toleranci osmotickým šokem, a to pomocí různých roztoků sacharidů (laktózy, sacharózy, glukózy, maltózy, kukuřičného sirupu a komerčního výrobku obsahující inulin) a glycerolu.

Nejprve byla vypracována metoda záhřevu tak, aby se docílilo dobré opakovatelnosti při konstantní teplotě 60 °C. Dále byly zkoumány a porovnávány jednotlivé kmeny a jejich tolerance k teplotě po osmotickém šoku.

Jako nejvhodnější kultura byl vybrán kmen *C. maltaromaticum* UAL 8, který přežíval při 60 °C po dobu 10 minut v 30% hm. roztoku sacharózy, maltózy, kukuřičného sirupu a glycerolu.

Uplatnění membránových procesů ve vybraných odvětvích potravinářského průmyslu

Moravec Josef, Melzoch Karel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Membránová separace nabízí široké uplatnění v potravinářském průmyslu. Membrány se mohou uplatnit jak při úpravě produktu, zhodnocení vedlejších produktů potravinářského průmyslu, tak při zpracování odpadů. Cílem této práce je přiblížit uplatnění membrán ve vybraných odvětvích potravinářského průmyslu pomocí tří samostatných studií.

První studie je stále ve fázi výzkumu. Cílem této studie je nahradit klasickou křemelinovou filtrací membránovou filtrací. Cena křemeliny stále roste, její zásoby jsou omezené a recyklace komplikovaná. Skládkování křemeliny je také komplikované, protože křemelina obsahuje kvasnice a proto musí být skládkována podle legislativy o odpadech jako nebezpečný odpad. Nevýhodou membránové filtrace jsou vysoká pořizovací cena zařízení a změna chuťového profilu piva.

Další studie popisuje použití membránové separace při získávání staškového piva z odpadních kvasnic. Staškové pivo je přidáváno k jádrovému pivu v množství maximálně 2%, čímž se zvyšuje efektivita výroby pivovaru a zefektivňuje odpadové hospodářství. V této studii byly testovány tři druhy keramických membrán o různé velikosti pórů, které jsou vyráběny různým způsobem. Cílem studie bylo zvolit optimální velikost pórů membrány a vybrat druh membrány pro průmyslovou aplikaci. Za úspěch studie je považována stavba zařízení pro separaci kvasnic v jihoamerickém pivovaru, kde byl použit druh membrán vybraný jako optimální v provedeném výzkumu.

Poslední studie dokumentuje použití membrán při zpracování odpadů tukového průmyslu. Zpracování odpadů z vysokým obsahem glycerolu bylo prováděno termofilními bakteriemi v míchaném bioreaktoru. Pro dosažení vyšší rychlosti zpracování odpadu byla k reaktoru připojena separační jednotka s keramickými membránami. Po optimalizování koncentrací substrátu a esenciálních látek na syntetickém mediu, bylo použito reálné medium. Reálné medium bylo mikroorganismy zpracováno a tím bylo ověřeno možné použití v praxi.

Využití bakterií *Zymomonas mobilis* pro produkci ethanolu z obilných zápar

Fribert Petr, Melzoch Karel

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Zymomonas mobilis je gramnegativní bakterie, která se vyznačuje vysokým teoretickým výtěžkem etanolu během fermentace a toleruje koncentraci ethanolu v médiu až 160 g/l. Vysoká výtěžnost a produktivita ethanolu pozorovaná u *Zymomonas mobilis* jsou důsledkem její unikátní fyziologie. *Zymomonas mobilis* k produkci ethanolu nepoužívá enzymy glykolýzy, ale Entner-Doudoroffovy dráhy.

Ačkoli je *Zymomonas mobilis* výborným producentem ethanolu, není vhodná pro konverzi biomasy, protože zkvašuje pouze glukosu, fruktosu a sacharosu. Tyto překážky mohou být vyřešeny genetickými modifikacemi vedoucími k rozšíření spektra substrátů, které je *Zymomonas mobilis* schopna fermentovat. Tato práce se zabývá fermentačními testy sbírkových kmenů *Zymomonas mobilis* na širokém spektru substrátů za rozdílných podmínek. Obilné zápary byly připraveny enzymovou hydrolýzou pšeničného šrotu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití metody zcukření využívající enzymové preparáty SPEZYME XTRA, DISTILLASE L-400 a OPTIMASH BG. Při kultivaci *Zymomonas mobilis* na obilné zápaře za anaerobních podmínek bylo dosaženo výtěžku ethanolu 0,39 g/g sušiny obilí. Konečná koncentrace ethanolu po anaerobní fermentaci v bioreaktoru Biostat B činila 56,7 g/l, což odpovídalo 96 % teoretické výtěžnosti ethanolu.

Aerobní termofilní stabilizace odpadních kalů z čistírny průmyslových a zemědělských odpadů

Černý Václav, Rychtera Mojmír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Tato práce se zabývá použitím aerobních termofilních mikroorganismů v čistírenské praxi. Tato technologie ve srovnání s konvenčně používaným procesem anaerobní digesce přináší některé výhody, které se v ekonomice procesu projevují nižšími investičními náklady, ale také nevýhody promítnutými do nákladů provozních. Průběh kultivací byl hodnocen z analýz CHSK-media, CHSK-supernatantu, sušiny odvodněného kalu, celkového dusíku v supernatantu a vybraných chemických individuů na kapalinovém chromatografu.

Vlastní experimenty byly zaměřeny na degradaci kukuřičných lihovarských výpalků bez pevné fáze a s pevnou fází, jako modelového media vznikajícího průmyslovým zpracováním zemědělských komodit. Výsledkem je rychlost degradace, která je závislá na velikosti vneseného znečištění. Čištění probíhalo do hodnoty CHSK cca $10 \text{ kg O}_2 \cdot \text{m}^{-3}$.

V další části této práce bylo prováděno přítokování odpadního kalu získaného z komunální čistírny odpadních vod. Výsledek však nedokázal, ale ani nevyvrátil argumenty uváděné v literatuře vyzdvihující výhody aerobní termofilní stabilizace.

Stanovení stáří buněčné populace pomocí průtokové cytometrie

Baszczyński Martin, Brányik Tomáš

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mají limitovanou replikativní délku života. Mohou během svého života prodělat pouze omezený počet dělení (10- 30 dělení). Během stárnutí prodělají řadu morfologických a fyziologických změn. Buňka roste, postupně se snižuje životaschopnost, buněčný povrch se zvrásňuje, prodlužuje se generační doba, zvyšuje se počet jizev a snižuje se metabolická aktivita. Poté vstoupí do nereplikativního stavu nazývaného fáze „senescence“. Následuje smrt a autolýza.

Zestárlé kvasinky vykazují odlišné flokulační charakteristiky a schopnosti fermentace. Předpokládá se, že vlastnosti spodně kvasících kmenů začínají degenerovat po desátém znovunasazení. Otázka stárnutí kvasinek je velmi důležitá u procesů kontinuální fermentace, se zvýšeným rizikem stárnutí imobilizovaných buněk, zvláště pokud je kvasinka imobilizována delší dobu (až několik měsíců).

Jak ovlivňuje stárnutí imobilizovaných kvasinek v průběhu kontinuální kultivace kvalitu produktu je zatím nejasné. Z tohoto důvodu je studium vlivu stárnutí kvasinek na životaschopnost a fermentační kapacitu důležité.

Existuje mnoho metod na stanovení stáří buněk. Avšak tradiční metody založené na kultivačních technikách neumožňují sledování fyziologických změn v závislosti na čase.

Proto byla vyvinuta rychlá metoda stanovení replikativního stáří kvasinek založená na fluorescenčním barvení jizev selektované populace buněk a následném měření průměrné intenzity fluorescence těchto buněk průtokovou cytometrií. Jako vhodná korelace se ukázala kalibrační křivka, kde jednotlivým bodům křivky odpovídala průměrná intenzita fluorescence buněčné populace s různým průměrným počtem jizev. Tato metoda byla použita na určení stárnutí biomasy v kontinuálním air-lift reaktoru a k určení replikativního stáří v různých zónách sedimentu v nádobě s kónickým dnem.

Kontinuální kvašení nealkoholického piva

Novák Pavel, Brányik Tomáš

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

V současné době se pro výrobu nealkoholického piva využívají dva odlišné postupy. První je založen na šetrném odstranění alkoholu z hotového piva a druhý na omezené tvorbě ethanolu úpravou technologického postupu. Tato práce se zabývá alternativním způsobem výroby nealkoholického piva v kontinuálně pracujícím, průtočném reaktoru. K experimentu byl použit gas-lift reaktor s vnitřní cirkulací o pracovním objemu 2,9 litrů a imobilizovaným biofilmem kvasinek na upraveném mlátě. Teplota fermentace byla 8 °C a zředovací rychlost okolo 0,28 h⁻¹.

Cílem práce bylo sledování obsahu senzoričky aktivních látek nealkoholického piva v závislosti na intenzitě aerace a následná senzorička analýza těchto piv. Hodnoty průtoku vzduchu byly zvoleny 0 a 200 ml.min⁻¹.

Před vlastním experimentem bylo nutné určit jednu z provozních charakteristik daného reaktoru a to množství těkavých látek vystřipovaných do pracovního plynu. Za pracovních podmínek nebyl úbytek u většiny sledovaných těkavých látek procesem stripování vyšší než 20 % původní koncentrace.

Vliv aerace na rychlost odbourávání aldehydů nebyl prokázán. Nezávisle na aeraci poklesl jejich obsah kvašením na přibližně 10 % z původní koncentrace. Tvorba vyšších alkoholů také nezávisela na intenzitě aerace a jejich obsah v obou vzorcích byl srovnatelný s komerčně vyráběnými nealkoholickými pivy. U esterů byl potvrzen trend jejich klesající tvorby s vyšším přísunem kyslíku. V pivu připraveném při nulové aeraci se obsah esterů blížil hodnotám obsahů v komerčně vyráběných nealkoholických pivech, což mělo také pozitivní vliv na poměr A/E.

Senzorička analýza nízkoalkoholických piv z kontinuálního systému nepotvrdila výsledky instrumentální analýzy. Nízkoalkoholické pivo vyrobené v aerovaném systému předčilo jedno z komerčně vyráběných nealkoholických piv. Bohužel pivo připravené v neaerovaném kontinuálním systému propadlo a umístilo se na posledním (pátém) místě. Lze se domnívat, že příčina byla v nekvalitní vstupní surovině (práškový mladinový koncentrát).

Povrchové vlastnosti pivovarských kvasinek a jejich vliv na imobilizaci adhezí na částice mláta v gas-lift reaktoru

Kuřec Michal, Brányik Tomáš

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Schopnost mikroorganismů ulpívat na pevné povrchy nebo vzájemně mezi sebou má značný význam nejen v klasickém pivovarském procesu (flokulace) ale i při tvorbě biofilmu a imobilizaci buněk na pevné částice (mláto, celulózní materiály). Podstatný vliv na buněčnou adhezi a flokulaci mohou mít fyzikálně-chemické povrchové vlastnosti kvasinek (hydrofobicita a povrchový náboj). Účinnost adheze může být předpovězena pomocí DLVO teorie a mezifázových volných energií a to z experimentálně naměřených parametrů (kontaktní úhly kapalin na vrstvě buněk, zetapotenciál). V této práci byly pro různé kmeny *Saccharomyces cerevisiae* (spodně kvasící č. 96 a svrchně kvasící č. 75 a 128 sbírky VÚPS, neflokulující kmen CCMI890) sledovány jejich povrchové vlastnosti a schopnost adheze na částice mláta během kontinuální fermentace v gas-lift reaktoru. Pomocí výše uvedených přístupů bylo pak možné vypočítat výsledné interakční energie v systémech buňka-buňka a buňka-nosič a tyto teoretické předpoklady byly srovnány s reálnou imobilizací.

Zatímco svrchně kvasící kmeny neulpívaly na částice mláta během kontinuální fermentace vůbec, buňky spodně kvasícího kmene stejně jako buňky neflokulujícího kmene CCMI890 vykazovaly značnou adhezi k povrchu nosiče. Povrchové vlastnosti neflokulujícího kmene CCMI890 byly ale spíše podobné svrchně kvasícím kmenům a odlišné od spodně kvasícího kmene č. 96, u něhož byla navíc pozorována vysoká schopnost flokulace buněk během kontinuální fermentace. Vypočítané interakční energie také vykazovaly rozpor s reálnou imobilizací. Tento rozpor pravděpodobně ukazuje na významný příspěvek specifických biochemických interakcí na adhezi buněk na pevné částice.

Jedna z možných uplatněných specifických interakcí může být založena na principu flokulace, tyto interakce jsou kódovány tzv. FLO geny. Podle několika nedávných vědeckých publikací je gen FLO11 zodpovědný za schopnost kvasinek ulpívat na pevné povrchy. Přítomnost tohoto genu byla proto sledována a potvrzena u všech studovaných kmenů. Pro vysvětlení a potvrzení vlivu FLO11 genu na adhezi kvasinek na částice mláta bude tedy nutné sledovat jeho expresi u jednotlivých kmenů.

Faktory ovlivňující cytometrické stanovení buněčné viability u kvasinky *Pichia pastoris*

Linhová Michaela, Branská Barbora

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo analyzovat faktory ovlivňující značení fluorescenčními sondami s následnou detekcí průtokovou cytometrií s ohledem na stanovení buněčné viability a později i dalších parametrů fyziologického stavu kvasinky *Pichia pastoris*. K tomuto studiu byly uskutečněny kultivace na třepaných baňkách a pro srovnání sloužily vzorky odebírané z kontinuální kultivace. V kultivacích byl použit rekombinantní kmen Mut⁺ kvasinky *P. pastoris*, který po indukci methanolem produkuje extracelulárně trypsinogen, dále kmen geneticky modifikovaný pro intracelulární produkci β -galaktosidasy a geneticky neupravovaný kmen.

V práci byly sledovány změny počtu značených mikroorganismů v populaci *P. pastoris* v závislosti na rozdílných postupech značení fluorescenčními sondami (propidium jodid, ethidium bromid, sytox green, fluorescein diacetát, karboxyfluorescein diacetát, dihydroethidium, dichlorodihydrofluorescein diacetát, 3,3'-diethyloxakarbokyanin jodid, Rhodamin 123, bis-oxonol) a operacích s buňkami. Byly testovány: vliv reakčního prostředí (fosfátového pufru, HBS pufru, H₂O a BMGY média), různých teplotních podmínek (10 minut při 0°C, 10 minut při 25°C, 10 minut při 0°C s následujícími 10 minutami při 25 °C, 10 minut při 25 °C s následujícími 10 minutami při 0°C, 10 minut při 40°C) a přidavku depolarizačních (CCCP, azid sodný) a permeabilizačních (triton, ethanol) činidel. Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že vliv reakčního prostředí na značení byl zanedbatelný, z teplotních režimů byl zaznamenán největší posun intenzity fluorescence při 40°C a důsledky depolarizace a permeabilizace buněk byly vnímány různými sondami odlišně. Vybrané metody poté byly aplikovány na sledování fyziologických změn při kultivaci na třepaných baňkách a kontinuálních kultivacích ve fermentoru v uspořádání chemostat, kde byly porovnávány různé kultivační substráty a kmeny *Pichia pastoris*. Předpokládaný negativní vliv methanolu jako zdroje uhlíku a energie na produkci ROS se nepotvrdil pro žádný zkoumaný kmen *P. pastoris*, ale byl zjištěn negativní vliv akumulace nespotřebovaného methanolu v médiu na fyziologický stav kvasinky.

Jako referenční test ke stanovení viability pomocí průtokové cytometrie byly použity klasické metody určování životaschopnosti buněk: barvení methylenovou modří a kultivační stanovení. Bylo zjištěno, že barvení methylenovou modří dobře koreluje s výsledky získanými průtokovou cytometrií, naopak u kultivačního stanovení docházelo k výraznému podhodnocení způsobenému nejspíše přítomností vícebuněčných struktur.

Využití různých substrátů při expresi proteinů kvasinkou *Pichia pastoris*

Marek Jan, Paulová Leona

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Cílem této práce bylo zmapovat růst geneticky modifikovaného kmene kvasinky *Pichia pastoris* Mut+ a kinetiku tvorby produktu, kterým je vepřový trypsinogen na různých substrátech. Exprese heterologního genu je vložena pod kontrolu AOX promotoru a indukována v přítomnosti methanolu.

Při kontinuálních kultivacích v uspořádání chemostatu byly proměřovány ustálené stavy a tranzientní stavy na různých jednoduchých a směsných substrátech. Růstové charakteristiky byly zjišťovány na substrátech, které obsahovaly jako zdroj uhlíku a energie methanol, glycerol, glukosu, sorbitol a nebo jejich směs s methanolem v poměru obsahu uhlíku ve směsi 1:1. Byly určeny maximální růstové rychlosti produkčního kmene na jednoduchých substrátech, sorbitolu ($0,03 \text{ h}^{-1}$), methanolu ($0,11 \text{ h}^{-1}$), glukose ($0,20 \text{ h}^{-1}$), glycerolu ($0,25 \text{ h}^{-1}$) a směsných substrátech glycerolu s methanolem ($0,20 \text{ h}^{-1}$) a glukosy a methanolu ($0,26 \text{ h}^{-1}$) pomocí vyplavovacích experimentů.

Při růstu kultury na glukosovém či glycerolovém médiu nebyla detekována tvorba produktu, neboť tyto substráty působí represivně na AOX promotor. Naproti tomu při růstu na sorbitolu byla zaznamenána exprese nízké hladiny produktu i bez přítomnosti methanolu. Na směsných substrátech, které obsahovaly glukosu, glycerol nebo sorbitol v kombinaci s methanolem byla v tranzientních stavech po indukci methanolem sledována kinetika tvorby trypsinogenu. Tvorba produktu byla zaznamenána vždy bezprostředně po indukci methanolem, v žádném případě nebyla zaznamenána jakákoli lag fáze v tvorbě produktu. V průběhu kontinuálních kultivací se s výjimkou růstu na směsném substrátu sorbitol/methanol nepodařilo dosáhnout ustáleného stavu vzhledem k tvorbě produktu. Koncentrace produktu dosáhla vždy maximální hodnoty mezi 4. až 8. hodinou od indukce a následně měla klesající trend. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na směsném substrátu, kdy zdrojem uhlíku a energie byl sorbitol, společně s methanolem v poměru uhlíků 1:1. Při zředovací rychlosti $0,03 \text{ h}^{-1}$ bylo po 7 hodinách od indukce dosaženo maximální koncentrace trypsinogenu 203 mg.l^{-1} . V tomto případě bylo dosaženo ustálení tvorby produktu na průměrné koncentraci 170 mg.l^{-1} .

Mykotoxiny ve sladařství a pivovarství

Bryzgal Tomáš, Bražina Michael, Rouč Michal, Knytl Martin, Fiala Jaromír

Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha

Mykotoxiny jsou jako toxické sekundární metabolity některých rodů mikroskopických vláknitých hub (plísňí), při jejich parazitickém růstu, známy už řadu let. Široce se zkoumal a zkoumá jejich vliv na zdraví člověka. U některých druhů mykotoxinů byla zjištěna karcinogenita, mutagenita nebo nefrotoxicita. Z těchto důvodů je žádoucí sledovat množství mykotoxinů vyskytujících se v lidské dietě.

Zvýšené koncentrace mykotoxinů byly zjištěny u polních plodin, mezi které řadíme i ječmen, jakožto surovinu pro výrobu sladu respektive piva. Na koncentraci mykotoxinů v ječmeni mají především vliv klimatické podmínky během vegetačního období, ale i podmínky při uskladnění již sklizeného ječmene. V ideálním případě by měly být všechny podmínky takové, aby docházelo k minimálnímu nárůstu a rozmnožování plísňí.

Z ječmene kontaminovaného mykotoxiny přecházejí dále mykotoxiny do sladařského a pivovarského procesu a jejich konečných produktů. Během výrobního procesu sladu respektive piva může docházet ke změnám koncentrace mykotoxinů, což do jisté míry může záviset na zvoleném technologickém postupu.

V současné době nejvíce sledované a studované mykotoxiny jsou tzv. Fusariové mykotoxiny, kam se řadí převážně mykotoxiny ze skupiny trichothecénů (deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glukosid, nivalenol, T-2 toxin, HT-2 toxin) a dále například zearalenon.

RYCHLÁ KONTROLA PRŮBĚHU KVAŠENÍ V CKT POMOCÍ NIR SPEKTROMETRIE

Brož Adam ^{1,2}, Košin Petr ^{1,2}, Šavel Jan ²

¹ Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

² Budějovický Budvar, n.p., České Budějovice

SOUČASNÉ POUŽÍVÁNÍ NIR

- ☐ Rozbor nakupovaného sladu (extrakt, bílkoviny, rozpustný dusík, Kolbachovo číslo, RE 45 °C, vlhkost; dosažitelné prokvašení, viskozita sladiny, β -glukany)
- ☐ Rychlé stanovení obsahu α - a β -hořkých kyselin ve chmelu
- ☐ Stanovení alkoholu, relativní hustoty, extraktu a prokvašení v pivu či kvasící mladině

NASTAVENÍ FT-NIR SPEKTROMETRU

FT-NIR MPA (Multi Purpose Analyzer) – Bruker Optics, Německo

- měření prošlého světla – transmise
- optická délka 1 mm
- sonda s optickým vláknem – Liquid Probe
- rozlišení 8 cm^{-1}
- spektrální rozsah $12\,800 - 4\,000\text{ cm}^{-1}$
- zdroj – halogenová žárovka
- dělič paprsků – quartz
- detektor TE-InGaAs
- software OPUS 5.5 QUANT, Bruker, metoda PLS

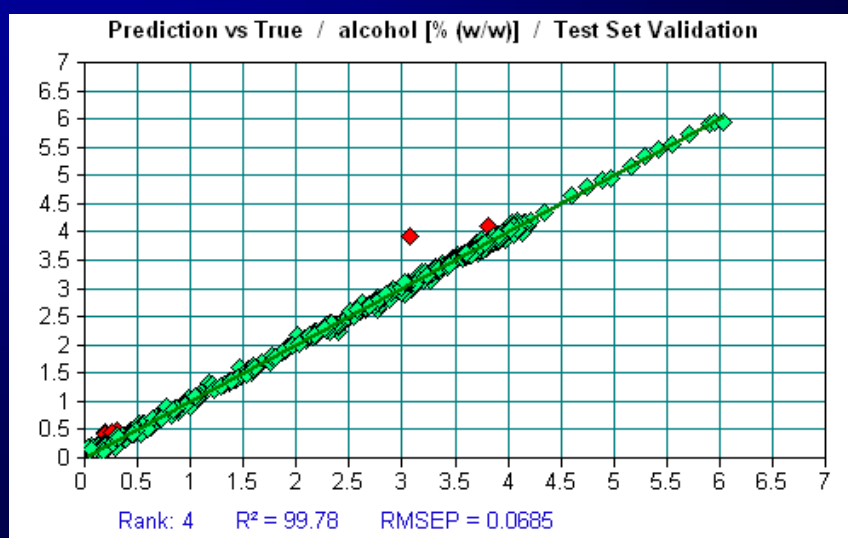
SESTAVENÍ A OVĚŘENÍ MODELŮ

- ☐ Více než 800 vzorků kvasící mladiny z CKT v různých fázích kvašení (měřeno po dni)
- ☐ Mladiny 10%, 12%, 16%
- ☐ Referenční analýza SCABA 5600
- ☐ Ověřeno test set validací, kdy $\frac{1}{2}$ vzorků byla využita jako kalibrační soubor a $\frac{1}{2}$ byla testovací, robustnost ověřena záměnou kalibračních a testovacích vzorků

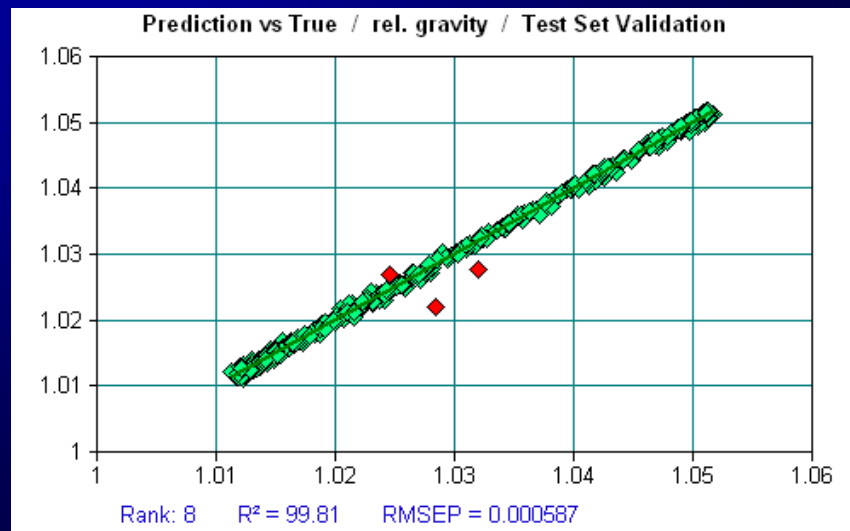
POUŽITÉ REGIONY SPEKTRA

Znak	Regiony spektra / Data pre-processing
Alkohol (w/w)	12 010 – 10 110 9 650 – 7 700 5 950 – 5 460 First derivative
Relativní hustota	10 300 – 9 020 8 420 – 7 700 7 280 – 5 460 Straight line subtraction
Zdánlivý extrakt (w/w)	10 300 – 8 420 7 750 – 5 940 5 470 – 4 000 No spectral data pre-processing
Skutečný extrakt (w/w)	9 650 – 9 020 8 420 – 7 700 7 280 – 5 460 Constant offset elimination
Zdánlivé prokvašení (%)	12 010 – 10 110 9 650 – 9 020 8 420 – 7 700 5 950 – 5 460 4 500 – 4 000 Second derivative
Skutečné prokvašení (%)	12 010 – 10 110 9 100 – 8 420 7 280 – 5 460 Constant offset elimination

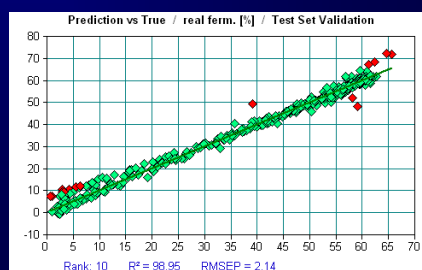
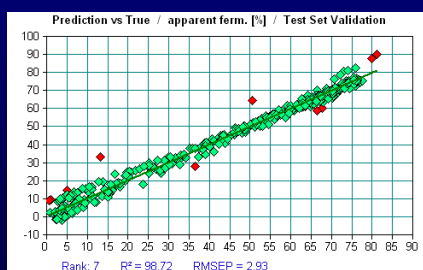
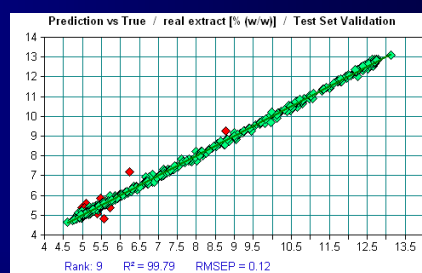
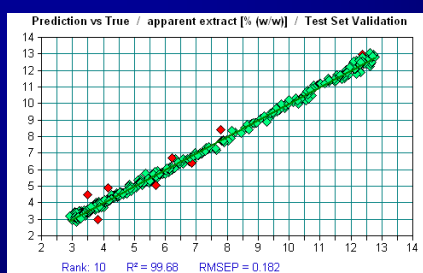
ALKOHOL HMOTNOSTNÍ



RELATIVNÍ HUSTOTA



EXTRAKT, PROKVAŠENÍ



PŘESNOST METODY

<i>Znak / Metoda</i>	Sacharometr	Alcolyzer	SCABA	MPA FT-NIR (RMSEP)
Alkohol (w/w)	-	0,01	0,02	0,07
Relativní hustota	-	0,00001	0,00001	0,00059
Zdánlivý extrakt (w/w)	0,20	-	-	0,18
Skutečný extrakt (w/w)	-	-	-	0,12
Zdánlivé prokvašení (%)	-	-	-	2,9
Skutečné prokvašení (%)	-	-	-	2,1

POROVNÁNÍ METOD

<i>Znak / Metoda</i>	Sacharometr	Alcolyzer	SCABA	MPA FT-NIR
Příprava vzorku	Filtrace přes křemelinu a papír, vytřepání CO ₂ , doba 5+10 min.			
Doba analýzy	1:00	4:00	3:50	0:20
Přesnost	+	+++	+++	++
Další použití	-			slad, chmel

ZÁVĚR

☐ Výhody NIR

- ☐ nejrychlejší a nejsnadnější stanovení
- ☐ potřeba malého množství vzorku
- ☐ další použití přístroje – slad, chmel
- ☐ možnost sestavení modelu pro jakýkoli znak

☐ Nevýhody NIR

- ☐ vysoká cena přístroje
- ☐ horší přesnost závislá na referenční metodě