

Studentská vědecká konference
na
Fakultě potravinářské a biochemické technologie

Ročník 2005

Přednášková sekce: [Biotechnologie I](#)
[Biotechnologie II](#)
[Biotechnologie III](#)
[Aplikovaná mikrobiologie](#)
[Biochemie](#)
[Chemie a technologie sacharidů](#)
[Analýza potravin I](#)
[Analýza potravin II](#)
[Technologie zpracování potravin](#)

Plakátová sekce: [Bioanalytické metody](#)
[Enzymologie](#)
[Struktura a funkce bílkovin](#)
[Technologie zpracování potravin](#)
[Chemie přírodních látek](#)

Seznam účastníků:

Radka	Antoňů	Tatiana	Krapfová
Filip	Aunger	Anna	Krajčová
Irena	Bacíková	Alexandra	Krplová
Veronika	Bartáčková	Štěpánka	Kučková
Boris	Bartoš	Michal	Kuřec
Zdeněk	Bartoš	Hana	Laštůvková
Václava	Bauerová	Anna	Lojková
Bo-Anne	Bělková	Miroslav	Macíček
Marián	Bendík	Martina	Marešová
Klára	Bílá	Jakub	Minks
Kateřina	Boušová	Lenka	Moravcová
Marek	Buchtá	Jitka	Najmanová
Martina	Buriánková	Veronika	Najralová
Kateřina	Cinková	Michaela	Nápravníková
Sandra	Cirmaciová	Tereza	Neubauerová
Ivana	Čechová	Zdena	Nováková
Jana	Černá	Petr	Pachl
Zdeňka	Černovská	Zlata	Palkovičová
Irena	Doušková	Linda	Paulová
Zdeňka	Dupáková	Hana	Pavlíčková
Dana	Dušková	Tomáš	Podzimek
Josef	Dvořák	Miroslava	Poláchová
Jan	Dvořák	Jan	Prchal
Lucie	Dvořáková	Sabina	Purkrtová
Kateřina	Flajšmanová	Bc. Jana	Regnerová
Matyáš	Fleml	Renata	Rychtáriková
Šárka	Gebauerová	Štěpánka	Řežábková
Eva	Gotvaldová	Tomáš	Sára
Dana	Guřanová	Ivana	Sedláková
Markéta	Hakenová	Kateřina	Sedmíková

Eva	Havlová	Olga	Schreiberová
Kateřina	Hejtmánková	Jitka	Slovanová
Jana	Herinková	Kateřina	Součková
Jakub	Heřman	Klára	Sovová
Markéta	Heřmanová	Jaroslav	Spáčil
Jitka	Hlavatá	Ljuba	Stehlíčková
Klára	Hlavsová	Martin	Svoboda
Aleš	Hnízda	Jana	Svobodová
Pavla	Holubová	Juraj	Szőköl
Kateřina	Hončíková	Lenka	Šimková
Petra	Honzíková	Jana	Šindelářová
Květoslava	Horáková	Anna	Šmardová
Jan	Horníček	Monika	Šťastná
Petra	Hrádková	Jana	Šťávodá
Jitka	Hrdinová	Lucie	Štěrbová
Michaela	Hronová	Jana	Štikarová
Tereza	Hudcová	Radka	Štoplová
Eva	Hudečková	Eva	Šúchová
Barbora	Hynková	Pavla	Šúleková
Martina	Chmelíková	Marek	Těšínský
Zuzana	Chrastilová	Gabriela	Tlapáková
Jitka	Janšová	Jana	Urbanová
Ondřej	Jurček	Filip	Vávra
Jozef	Kasper	Stanislav	Vinopal
Eduard	Klíma	Veronika	Vodičková
Kristýna	Kneřová	Pavel	Vopálenský
Josef	Komárek	Irena	Voráčková
Jana	Kopecká	Alice	Vosečková
Lukáš	Koreň	Milena	Zachariášová
Marta	Kostelanská	Jana	Zlámáliková
Petr	Košin		

SEKCE: Biotechnologie I

KOMISE: Předseda: Ing. Pavel Dostálek, CSc.
Členové Ing. Tomáš Brányik Ph.D.
Ing. Jaromír Fiala, PhD.
Ing. Irena Kolouchová, PhD.
Ing. Hana Čížková

Vliv kvality sladů na průběh kvašení a vlastnosti piva

Autor: Klára Bílá
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Irena Kolouchová, Ph.D., Ing. Hana Čížková,

Kvalita použitého sladu má nezastupitelný význam v technologii, analytickém složení, koloidní a senzorické stabilitě piva. V kvalitě sladů a piv se promítají specifické rozdíly vlastností odrůd ječmene. Jedním z předpokladů úspěšného posouzení podílu vlivu surovin se zaměřením na slad je zajištění stejného průběhu celého technologického postupu. Vliv sladů byl hodnocen na čtvrtprovozním zařízení ÚKCHB, kde je nutné nejdříve ověřit schopnost opakovatelnosti várky v daných podmínkách při udržení minimálních odchylek. Byly sledovány hodnoty pH, extraktu, dosažitelný stupeň prokvašení, hořkost, barva, dusíkaté látky a další významné senzorické látky piva. Várky byly sledovány v celém průběhu kvašení a dokvašování, až do stádia hotového piva.

Získané výsledky potvrdily reálnou možnost výroby piva požadovaných vlastností při stejných vstupních surovinách a za dodržení stejných provozních podmínek varny. K přesnému zhodnocení vlivu odlišnosti jednotlivých sladů na výsledný charakter piva a jeho analytické parametry je zapotřebí trojnásobného opakování procesu s každým sladem.

Stanovení SO₂ v pivu elektrochemicky

Autor: Josef Dvořák
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Pavel Dostálek, CSc., Ing. Pavel Čejka, CSc.

Oxid siřičitý je velmi silným antioxidantem přítomným v pivu, který vzniká přirozeným způsobem činností kvasinek ze síranů. Oxid siřičitý je v pivu přítomen ve formě siřičitanů částečně ve volné formě, ale větší část je vázána na karbonylové sloučeniny, čímž omezuje vliv těchto sloučenin na chuť piva. Pro stanovení celkového obsahu oxidu siřičitého v pivu se v současné době používají EBC metody 9.25.1. – Celkový oxid siřičitý v pivu: destilační metoda a 9.25.2. – Celkový oxid siřičitý v pivu: enzymatická metoda. Alternativou k těmto metodám jsou metody elektrochemické. Voltametrické stanovení oxidu siřičitého bylo

prezentováno na EBC kongresu v Budapešti v roce 2001. U této metody se ale po okyselení vzorku uvolňuje oxid siřičitý destilačně a teprve pak se stanovuje. Námí navrhovaná metoda nepoužívá destilaci, ale využívá unikátního in-line separátoru, který odstraňuje interferující látky z piva. Oxid siřičitý generovaný po okyselení vzorku piva difunduje skrz semipermeabilní membránu do vodícího elektrolytu a je transportován do měřicí cely ve formě hydrogensířičitanů. Ty jsou nahromaděny na pracovní elektrodě a pak stanoveny rozpouštěcí chronopotenciometrií. Metoda byla validována a byla srovnána s výše zmíněnými. Z hlediska citlivosti a opakovatelnosti je výrazně lepší.

Biofilm na stáček lince v pivovaru

Autor: Pavla Holubová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Jaromír Fiala, Ph.D., Dr. Erna Storgårds

Stáčení piva je finálním krokem výroby, proto každé mikrobiální znečištění v této fázi výroby je velmi nebezpečné. Ve studii byla sledována tvorba bakteriálního biofilmu na 3 stáček linkách. Bakterie rostoucí v biofilmu jsou odolnější vůči prostředí a také sanitacím. Tvorba biofilmu na stáček linkách může být příčinou kontaminace a následného znehodnocení výrobku. Pro sledování biofilmu byly zvoleny dvě mikrobiologické metody, které se navzájem vhodně doplňují: tradiční metoda – kultivace a metoda PCR–DGGE. Cílem této práce bylo nalézt povrch resistantní vůči tvorbě biofilmu.

Byly porovnány 3 antibakteriální oceli a nerezová ocel jako referenční materiál. Tyto materiály byly umístěny do pivovaru na stáček linku. Po 2 měsících byly analyzovány stěry z povrchu ocelí. Po kultivaci na různých mediích byly získány informace o množství bakterií z povrchu materiálů. Po PCR-DGGE byla zjištěna diverzita-zastoupení různých bakterií na povrchu materiálů.

Použití fluorescenční techniky k sledování aktivity kvasnic

Autor: Petr Košín
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Irena Kolouchová, Ph.D.

Existuje celá řada fluorescenčních technik využitelných ke sledování fyziologického stavu kvasnic. Ke stanovení viability kvasnic jsou to například metody založené na esterázové aktivitě živých buněk (kalcein acetoxymethylester, fluorescein diacetát), propustnosti obalových vrstev mrtvých buněk a obarvení jejich obnaženého genetického materiálu (ethidium bromid, propidium jodid). Dále je možné fluorescenčními technikami posuzovat vitalitu kvasnic, a to např. stanovením obsahu glykogenu, ATP, DNA, trehalosy, sterolů nebo intracelulárního pH, nebo celých buněčných organel (jádro, mitochondrie, vakuola, nebo jizvy po pučení). V této práci byly použity některé fluorescenční techniky ke sledování aktivity pivovarských kvasnic. Byly sledovány čerstvé násadní pivovarské kvasnice před zakvašením, kvasnice odebrané v průběhu hlavního kvašení a kvasnice stažené po ukončení hlavního kvašení. Určité vybrané techniky bude možné zařadit jako rutinní analýzy na sledování fyziologického stavu kvasnic v pivovaru.

Sledování životaschopnosti kvasinek imobilizovaných na částice mláta v kontinuálním reaktoru: Biokatalyzátor pro kontinuální kvašení nealkoholického piva

Jméno: Michal Kuřec
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Tomáš Brányik, Ph.D.

Spotřeba nealkoholického piva celosvětově roste. Existuje několik možností jeho výroby, přičemž každá z nich má své výhody i nevýhody. Jednou z nich je kontinuální fermentace v reaktoru s imobilizovanou biomasou. Tato technologie se vyznačuje jak vysokou objemovou produktivitou, tak zvýšenými nároky na kontrolu procesu. Proces kontinuálního kvašení byl studován z hlediska dlouhodobé životaschopnosti (viabilita) imobilizovaných kvasinek rostoucích na syntetickém médiu v probublávané koloně. Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byly imobilizovány na částice pročištěného mláta, což je odpadní produkt výroby piva. Viabilita imobilizované biomasy byla sledována v průběhu tvorby kvasničného biofilmu a k jejímu stanovení byly použity tyto metody: barvení buněk fluorescenčním barvivem (propidium jodid) s použitím průtokového cytometru a počítání mrtvých buněk obarvených methylenovou modří. Procento mrtvých buněk rostlo s délkou kultivace v důsledku stárnutí imobilizovaných kvasinek (v 1. vrstvě od 8%, na začátku, do 16% mrtvých buněk, po 480 hodinách) a s hloubkou imobilizace v biofilmu (např. v čase 240 hod.: 1.vrstva 8%, 2.vrstva 11%, 3.vrstva 12% mrtvých buněk). Srovnáním výsledků obou metod vycházely procenta mrtvých imobilizovaných buněk přibližně o 15% vyšší u průtokového cytometru.

Fotochemické transformace resveratrolu a jeho analogů

Autor: Lenka Moravcová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Irena Kolouchová, Ph.D.

Resveratrol(3,5,4'-trihydroxystilben) se v podobě monomeru vyskytuje jako *trans*- a *cis*-isomer. *Trans*-resveratrol je ve své krystalické formě velice stálý, jeho stabilita se mění až po převedení do roztoku, kdy dochází k fotoizomerační reakci a tím k izomeraci *trans*-isomeru na *cis*-formu. K této fotoizomerační reakci dochází i u dalších polyfenolů červeného vína jako jsou pterostilben a pinosylvin. Důvod proč se tyto látky a jejich deriváty zkoumají, je v jejich farmakologických a antimikrobních účincích. Mezi zjištěné pozitivní vlastnosti patří např. antioxidační účinky, preventivní účinky proti rakovině a řada dalších. Nevyskytují se pouze v červeném víně, ale i v dalších rostlinných materiálech jako je zelenina a rostlinné druhy révě vinné příbuzné. Cílem této práce bude zkoumání podmínek za kterých k fotoizomeraci dochází, zvláště podmínek koncentračních a účinku UV záření.

Detekce glukosy pomocí imobilizovaného enzymu GOD

Autor: Jaroslav Spáčil
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Tomáš Brányik, Ph.D.

Byla měřena aktivita imobilizovaného enzymu *glukosaoxidasa*. Cílem práce bylo změřit aktivitu enzymu *glukosaoxidasa* (GOD), který je různými metodikami imobilizován na podložním skle s Ormocerem a rutheniovým komplexem a poté vyhodnotit procentuální nárůst doby dosvitu (lifetime) fluorescence. Dále na základě zjištěných výsledků vybrat sklo, které má nejlepší odezvu na glukosu. Této skutečnosti by se dalo v budoucnu využít pro sestavení senzoru na glukosu.

Koncentrace glukosy v roztoku se měří pomocí biosenzoru sestávajícího ze dvou vrstev, z nich jednu tvoří polymer Ormocer s rutheniovým komplexem a druhou enzym *glukosaoxidasa* imobilizovaný různými technikami. V průběhu měření se sleduje doba dosvitu fluorescence. Po přidavku glukosy do roztoku vzroste doba dosvitu fluorescence z toho důvodu, že kyslík, který se vhání do měřicí cely, je spotřebováván enzymem a tudíž nezháší fluorescenci.

Fluorescence se měří pomocí přístroje „MATINOES glucose sensor system“ obsahující excitační LED diodu a detektor (fotonásobič). Přenos záření je zajišťován pomocí svazku optických vláken. Vyhodnocení a zpracování dat je prováděno v počítači s měřicím softwarem.

Stanovení karbonylových sloučenin v pivu

Autor: Jana Šindelářová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Vedoucí: Ing. Pavel Dostálek, CSc., Ing. Marcel Karabín

Karbonylové sloučeniny, převážně pak aldehydy, významně ovlivňují chuť piva. I když koncentrace těchto látek v pivu je velmi nízká, u většiny z nich je i prahová koncentrace vnímání nízká, proto patří mezi značně sledované sloučeniny. Karbonylové sloučeniny v pivu vznikají několika základními reakcemi: Streckerovou degradací aminokyselin, oxidací isohumulonů, oxidací vyšších alkoholů, oxidační degradací lipidů, aldolovou kondenzací aldehydů a sekundární oxidací nenasycených vyšších aldehydů. Obsah karbonylových sloučenin v pivu se během stárnutí značně mění. Byly měřeny různé staré vzorky piva, aby se zjistily změny v obsahu sledovaných karbonylových sloučenin.

Pro stanovení byla použita metoda založená na extrakci na tuhé fázi (SPE) – silikagel potažený okyseleným derivatizačním činidlem 2,4 – dinitrofenylhydrazinem (DNPH). Karbonylové sloučeniny selektivně reagují s DNPH za vzniku 2,4 – dinitrofenylhydrazonů příslušné karbonylové sloučeniny. Hydrazony byly z SPE kolonky eluovány 20 ml acetonitrilu a analyzovány pomocí vysoko rozlišovací kapalinové chromatografie (HPLC) s Photo Array Diode (PAD) detekcí. Karbonyly byly ze vzorku vytěšňovány inertním plynem (dusík). Stanovovány byly následující sloučeniny: acetaldehyd, diacetyl, furfural, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2-methylpropanal, pentanal, hexanal a (E)-2-nonenal.

SEKCE: Biotechnologie II

KOMISE: Předseda: Prof. Ing. Mojmír Rychtera, CSc.
Členové: Dr. Ing. Petra Patáková
Dr. Ing. Leona Paulová
Ing. Věra Hábová

Vliv kultivačních podmínek na kinetické parametry procesu kultivace rekombinantní kvasinky *Pichia pastoris* a tvorbu produktu

Autor: Dana Dušková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a biochemie
Školitel: Dr. Ing. Leona Paulová

Cílem této práce bylo studium vlivu kultivačních podmínek na kinetiku procesu kultivace rekombinantní methylotrofní kvasinky *Pichia pastoris* a také jejich vlivu na tvorbu žádaného produktu.

K práci byl použit *Pichia* kmen X33/pPICZαA/AOX /Mut+ produkující trypsinogen s rezistencí na antibiotikum zeocin, který byl vybrán z šesti testovaných kmenů jako nejvhodnější pro práci v laboratorním bioreaktoru. Druhým použitým *Pichia* kmenem byl pPICZαA-pTryp#3, který má též rezistenci k zeocinu. Testování obou kmenů bylo prováděno vsádkovou a kontinuální kultivací v laboratorním bioreaktoru s různými uhlíkatými zdroji a jejich směsí. Byly stanovovány kinetické parametry produkčních mikroorganismů a dále byla prováděna kvantifikace produktu.

Regulace koncentrace rozpuštěného kyslíku dávkováním živného média do reaktoru

Autor: Jan Dvořák
Ročník: 5.
Ústav: Kvasná chemie a bioinženýrství
Školitel: Prof. Ing. Mojmír Rychtera, CSc., Ing. Stanislav Ferzik

Aplikace flexibilní kontroly byla zkoušena na aerobní termofilní směsné populaci bakterií, kde koncentrace kyslíku byla regulována dávkováním glycerolového média. Automatická regulace v tomto úkolu byla zajištěna použitím flexibilní kontrolní jednotky BIO-2. Řídící jednotka je založena na programovatelném mikroprocesoru, který umožňuje relativně snadno a rychle měnit a opravovat program. Cílem práce bylo zajistit regulaci rozpuštěného kyslíku dávkováním média. Koncentrace rozpuštěného kyslíku (DOC) je velmi užitečnou hodnotou pro regulaci aerobního procesu. Tato hodnota je velmi snadno měřitelná

kyslíkovou elektrodou. Pro většinu aerobních procesů se kritická hladina rozpuštěného kyslíku pohybuje mezi 20 a 10%. Protože rozpustnost kyslíku při vyšších teplotách je ve vodě malá, byl vzduch používán k aeraci dosycován. Řízení může být použito pro kontrolu fermentace v bioreaktorech různých výrobců. Kultivace byly provedeny na bioreaktoru (efektivní objem 1,5 L) B.Braun.

Analýza obrazu při pozorování obrovských kolonií kvasinek

Autor: Jakub Heřman
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Dr. Ing. Petra Patáková

Práce byla naměřena s pěti druhy kvasinek (*Pichia anomala*, *Pichia*, *Rhodotorula glucinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Saccharomyces cerevisiae*). Cílem měření bylo sledování makro a mikro změn při růstu tzv. obřích kolonií na Sabouradově agaru. Sledovanými veličinami u makro obrazů, snímaných kamerou, byly plocha kolonie, kruhovitost, ekvivalentní průměr kolonie a barevná změna. Dále byly vyhodnocovány změny tvaru a velikosti jednotlivých buněk při pozorování mikroskopických preparátů. Buňky pro přípravu těchto preparátů byly odebírány vždy ze středu a z kraje obří kolonie v pravidelných intervalech společně se snímáním makro obrazů.

Studium morfologických změn bakterií rodu *Thermus* s využitím obrazové analýzy

Autor: Květoslava Horáková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Barbora Sekavová, Doc. Ing. Karel Melzoch, CSc.

Bakterie rodu *Thermus* jsou využívány k produkci termostabilních enzymů používaných jako katalyzátory biochemických reakcí, dále mohou být také aplikovány v průmyslu při zpracování a odbourávání odpadů nebo při biodegradacích vedlejších produktů vznikajících při různých průmyslových procesech.

Tato práce je zaměřena na studium morfologie jednotlivých buněk při různých teplotách v průběhu submersní kultivace a na analýzu kolonií rostoucích na pevné půdě. Studovány byly mikrobiální druhy *Thermus species*, *Thermus ruber* a *Thermus aquaticus*, které byly kultivovány v Luria-Bertani médiu. Jednotlivá pozorování byla zaznamenávána ve formě digitálních fotografií, které byly dále zpracovány softwarem Lucia pro obrazovou analýzu. Vyhodnocovány byly následující parametry: délka, šířka, plocha, cirkularita a elongace. Mezi nejvýznamnější morfologické změny, které byly pozorovány, patří prodlužování analyzovaných částic (buněk) vlivem stoupající teploty a nárůst plošného obsahu během exponenciální fáze růstu.

Vsádková kultivace kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* M002 v míchaném bioreaktoru

Autor: Jozef Kasper
Ročník: 5. ročník
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Doc. Ing. Karel Melzoch, CSc.

Byla provedena vsádková kultivace kvasinky *Rhodotorula mucilaginosa* M002, která produkuje epoxidhydrolasu. Epoxidhydrolasa této kvasinky je cytoplasmatický, konstitutivně syntetizovaný, enzym, který v buňce štěpí oxiranový cyklus na příslušný vicinální diol a tak chrání buňku před oxidativním stresem. Enzym současně vykazuje enantioselektivitu. Enantioselektivní epoxidhydrolasy je možno použít při syntéze chirálně čistých epoxidů a diolů, které mají další upotřebení v organické syntéze a farmaceutické výrobě. Vsádková kultivace byla provedena v míchaném bioreaktoru v mediu xxxxx: pracovní objem 8 l, koncentrace rozpuštěného kyslíku v mediu byla udržována na hodnotě $pO_2 = 15\%$, pH udržováno na hodnotě 6,2, kultivační teplota 28°C. Koncentrace O_2 byla udržována prostřednictvím frekvence míchání a vzdušněním. Tyto kultivační parametry byly zapojeny do kaskády. V průběhu kultivace byly sledovány základní parametry růstu: koncentrace biomasy (optická denzita kultury a suchá hmotnost buněk), koncentrace zbytkové glukosy v médiu, specifická aktivita enzymu a koncentrace proteinů. Kultivace byla vedena s cílem získat maximální koncentraci biomasy pro izolaci a charakterizaci enzymu. Kultura dosáhla stacionární fáze růstu po 19 hodinách, kdy optická denzita dosáhla hodnoty kolem $OD = 36$.

Sledování vlivu kultivačních podmínek na fyziologický stav rekombinantní kvasinky *Pichia pastoris* pomocí průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie

Autor: Veronika Najralová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a biochemie
Školitel: Ing. Barbora Sekavová

Methylotrofní kvasinka *P.pastoris* je využívána na produkci rekombinantních proteinů pro využití v genovém inženýrství. Její výhodou je růst na jednoduchém a levném minerálním médiu a vysoká výtěžnost rekombinantních proteinů. Pro studium fyziologického stavu kvasinek byla použita průtoková cytometrie a fluorescenční mikroskopie. První část práce byla zaměřena na optimalizaci podmínek barvení rekombinantní kvasinky *P.pastoris* fluorescenčními barvivy. V další části práce se bude pokračovat studiem vlivu kultivačních podmínek na fyziologický stav kvasinky. Při práci byly využívány kmeny kvasinky *Pichia pastoris* s plastidem pPGAPZaa a rezistencí vůči antibiotiku zeocin, jeden kmen obsahoval promotor AOX a druhý kmen promotor GAP. Optimalizace podmínek barvení fluorescenčními barvivy spočívala ve zjištění nejhodnější koncentrace daného barviva a doby inkubace kvasinek těmito fluorescenčními barvivy. Optimální koncentrace barviva byla stanovena jako nejnižší možná koncentrace, při níž bylo barvivo již dostatečně účinné a přitom byl eliminován vliv autofluorescence kvasinek. Při sledování doby inkubace kvasinek jsme zjistili, že optimálním časem pro inkubace je čas, v němž se přestala intenzita fluorescence v závislosti na čase příliš měnit. Kvasinky byly barveny propidium jodidem

a fluorescein diacetátem pro sledování viability buněk a Rhodaminem 123 a bis-oxonolem pro sledování transmembránového potenciálu.

Izolace DNA z mezofilních a termofilních bakterií a identifikace těchto bakterií pomocí PCR

Autor: Anna Šmardová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Dr. Ing. Petra Patáková

Práce byla prováděna se pěti termofilními (2 kmeny *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Bacillus acidocaldarius*, 2 kmeny *Geobacillus starothermophilus*) a třemi mezofilními druhy (*Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*) bakterií. Byly srovnány různé způsoby izolace DNA, doporučované v odborné literatuře a na Internetu, s izolací pomocí komerčního kitu od firmy Roche. Izolovaná DNA byla namnožena metodou RAPD PCR a detekce RAPD produktů byla provedena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu, obsahujícím ethidiumbromid. Dále byla pro účely identifikace zkoušena restriční enzymová analýza RFLP s využitím restričních enzymů *Cfo I*, *Alu I* a *Hae III*.

SEKCE: Biotechnologie III

KOMISE: Předseda: Doc. Ing. Jan Masák, CSc.
Členové: Doc. Ing. Alena Čejková, CSc.
Ing. Martina Siglová, PhD.
Ing. Martin Halecký, PhD.

Význam inokula pro pracovní charakteristiku biofiltrů

Autor: Irena Doušková
Ročník: 5.
Ústav: ÚKCHB
Školitel: Ing. Martin Halecký, Ph.D., Prof. Ing. Jan Páca, DrSc

Během experimentu se zjišťoval vliv inokulace biofiltrů na jejich pracovní charakteristiky. Pro měření byly využity tři laboratorní biofiltry se shodnými parametry: $J_s = 50 \text{ mm}$, $h = 27 \text{ cm}$, $V_g = 0,5 \text{ l.min}^{-1}$, náplň: kompost a perlit v poměru 4:1 obj. Biofiltry byly označeny následovně: „sterilní“ (vysterilizován včetně náplně), „neinokulovaný“ (obsahující pouze mikroflóru přirozeně se vyskytující v kompostu) a „inokulovaný“ (zaočkován směsnou kulturou degradující aromatické uhlovodíky ze sbírky laboratoře). Vstupní vzduch byl kontaminován toluenem a xylenem v poměru cca 1:1 hm. o celkové koncentraci v rozmezí $350 - 600 \text{ mg.m}^3$. Před i za biofiltry byly umístěny filtry pro eliminaci kontaminace. Cílem práce bylo: 1. Zjistit schopnost zvýšení účinnosti inokulací selektovanou populací, 2. Zjistit degradační schopnosti přirozených degradérů na použitých nosičích, 3. Porovnání charakteristik biofiltrů. V prvních dnech provozu byla účinnost inokulovaného i neinokulovaného biofiltru shodná. Sterilní biofiltr vykazoval po celou dobu pokusu velmi nízkou degradační účinnost a nulovou produkci CO_2 (patrně se takto projevovala pouze fyzikální sorpce). Po dvacátém dnu došlo k poklesu degradační aktivity i koncentrace CO_2 u neinokulovaného biofiltru, což bylo zřejmě následkem inhibičního efektu vyšší vstupní koncentrace na přirozenou mikroflóru. Inokulovaný biofiltr vykazoval po celou dobu pokusu $RE > 80\%$.

Kontinuální biodegradace nitrotoluenů

Autor: Tereza Hudcová
Ročník: 5.
Ústav: ÚKCHB
Školitel: Ing. Martin Halecký, Ph.D., Prof. Ing. Jan Páca, DrSc.

Degradace byly prováděny v laboratorním náplňovém reaktoru za aerobních podmínek. Parametry reaktoru: vnitřní průměr 22mm, výška lože 240mm, pracovní teplota 30°C . Náplňovým materiálem byla expandovaná břídllice o velikosti částic 4-8mm. K inokulaci byla použita definovaná směs bakterií. Byla studována adaptační fáze a biodegradace 4-NT, 3-NT a 2-NT individuálně a také ve směsi. Výsledky

ukázaly, že všechny tři isomery mononitrotoluenů byly degradovány současně a totálně (bez vzniku intermediátů). Degradční rychlosti všech tří isomerů byly téměř stejné za podmínek, že látky byly degradovány individuálně a v přebytku kyslíku. V případě degradace směsi isomerů byly zjištěny vzájemné interakce v metabolismu těchto sloučenin.

Odbourávání anilinu pomocí bakteriálních populací

Autor: Jitka Hrdinová
Ročník: 5.
Ústav: ÚKCHB
Školitel: Ing. Jiří Mikeš

Anilin je již dlouhou dobu považován za toxickou a karcinogenní látku. Způsobuje mnoho zdravotních problémů jako žaludeční nevolnost, poškození jater a cyanózu. Do biosystémů se dostává díky nedostatečně přečištěné odpadní vodě z výroby barviv a léčiv. Monitorování anilinu ve vodě je důležité i proto, že je vodě poměrně stabilní a může se v ní akumulovat. První část práce byla zaměřena na zavedení vhodné analytické metody pro jeho stanovení, která se následně uplatnila při pokusech spojených s jeho biologickým odbouráváním. Byl sledován růst bakteriálních kmenů A22 (*rod Ochrobacter*) a A1100 (*rod Comamonas*) na anilinu jako zdroji uhlíku a energie v rozmezí koncentrací 500 – 1500 mg/l. Biomasa byla stanovována jako hodnota O.D. při 400 nm na spektrofotometru, aktuální koncentrace anilinu měřena také spektrofotometricky při vlnové délce 615 nm. Zvolená metoda je vhodná pro vodné vzorky s koncentrací anilinu 0,2 – 15 mg/l. Je založena na jeho reakci s chromogenním činidlem, které je připraveno smícháním 8-hydroxychinaldinu a N-chlorsukcinimidu v bezvodém rozpouštědle (N,N-dimetylformamidu). Prostředí je upravené roztokem NaOH na hodnotu pH 10-11. Cílem práce je nalezení maximální koncentrace anilinu, které jsou kmeny A22 a A1100 ještě schopné za optimálních podmínek využívat.

Vliv stresu na buněčné struktury kvasinek

Autor: Miroslava Poláchová
Ročník: 5.
Ústav: Kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Jiří Hašek, CSc., prof. RNDr. Vladimír Jirků, DrSc.

Cytoskelet je vysoce dynamická struktura, která je neustále reorganizována během toho, jak buňka mění tvar, dělí se, nebo reaguje na změny ve svém okolí. Cytoskelet je doménou eukaryotních buněk, proto byly pro jeho studium zvoleny kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* s intragenovým značením pomocí fluoreskujících proteinů. Ke studiu změn organizace cytoskeletu je využito poznatků z fluorescenční mikroskopie, pomocí níž získáváme informaci o živých buňkách nepotřebující fixaci, informace jsou rychlé a především popisují stav in vivo. Byly zkonstruovány kmeny se značeným tubulinem, endoplasmatickým retikulem, mitochondriemi a aktinovými filamenty. Modifikované kmeny byly vystaveny stresorům, jako je vyšší iontová síla, teplotní šok a přítomnost huminových substancí. Stresové podmínky působí na tvorbu agregátů, např. u aktinových vláken, jež se mohou po určité době znovu navracet do původního stavu. Huminové kyseliny zrychlují u kvasinek metabolismus.

Porovnání růstu kmenů bakterie *Rhodococcus erythropolis* disponujících odlišnou aktivitou enzymů degradujících fenol

Autor: Olga Schreiberová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Dagmar Feifičová, Doc. Ing. Alena Čejková, CSc.

Ve spolupráci s genetickou laboratoří Mikrobiologického ústavu AV ČR byly připraveny nové kmeny bakterie *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595 degradující fenol. Modifikace byla provedena posílením dóze plasmidů nesoucích geny pro enzymy počátečních kroků biodegradační dráhy fenolu. Tak byly vytvořeny dva kmeny disponující vysokou aktivitou fenolhydroxylasy, resp. katechol-1,2-dioxygenasy. Získané kmeny by měly mít zvýšenou schopnost degradace fenolu. Cílem této práce je porovnání růstu původního, neupraveného kmene *Rhodococcus erythropolis* CCM 2595 a obou upravených kmenů. Srovnání bylo provedeno sledováním růstu uvedených kmenů za přítomnosti dvou typů zdroje uhlíku a energie - fenolu a glukosy. U nejlépe rostoucího kmene byly dále hledány optimální koncentrace těchto nutrientů, při nichž bylo dosaženo nejlepších růstových charakteristik. Získané informace byly dále využity při následném studiu vlivu huminové kyseliny PAB 32 na růst těchto kmenů v přítomnosti výše uvedených nutrientů. Huminové látky jsou přírodní makromolekuly s potenciální schopností ochrany mikroorganismů před nepříznivými vlivy prostředí.

Význam složení obalových vrstev z hlediska jejich schopnosti interagovat s ionty těžkých kovů

Autor: Ljuba Stehlíčková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Jiří Mikeš, Doc. Ing. Alena Čejková, CSc.

Tato práce se věnuje studiu vlivu těžkých kovů na složení buněčné stěny plísní. Při studiu této problematiky bylo použito plísní *Aspergillus terreus* a *Fusarium proliferatum*, u kterých je předpokládána schopnost odstraňovat ionty těžkých kovů z prostředí.

Byla izolována buněčná stěna a stanoveno poměrné zastoupení jejích jednotlivých složek. Poté bylo zjištěno složení buněčné stěny při kultivaci v přítomnosti iontu kovu (kadmium, kobalt, měď, nikl) v kultivačním mediu.

Kromě submersního způsobu kultivace bylo složení buněčné stěny a interakce s ionty kovů studováno také při kultivaci obou plísní na pevných půdách. Zde se také sledovaly morfologické změny makrokonií v kontextu přítomnosti výše zmíněných kovů.

Podářilo se prokázat vliv iontů těžkých kovů na složení buněčné stěny plísní.

Genové manipulace u kmene *Rhodococcus erythropolis* degradujícího fenol

Student: Juraj Szóköl

Ročník: 5.

Ústav Kvasné chemie a bioinženýrství

Školitel: Ing. Miroslav Pátek, CSc., prof. RNDr. Vladimír Jirků, DrSc.

Rod *Rhodococcus* je Gram-pozitivní bakterie vykazující široké spektrum katabolických aktivit. Kmen *Rhodococcus erythropolis* CCM2595, disponuje geny, které determinují enzymy, schopné degradovat monoaromatické látky, mezi jinými i fenol, který patří v současné době mezi rozšířené látky znečišťující životní prostředí. V mojí práci jsem se zaměřil na enzym katalyzující přeměnu fenolu na katechol: fenol hydroxylasu- (EC 1.14.13. 7). Fenol hydroxylasa je heteromer determinován operonem, který se skládá z genů *pheA1* a *pheA2* kodující malou a velkou podjednotku a regulátorem transkripce. Mezi geny *pheA1*, *pheA2* a regulátorovým genem je oblast, ve které se nacházejí promotory. Vyštěpením tohoto operonu a jeho následným vložením do vektoru, jenž byl *pSRK21*, jsem vytvořil konstrukt, který jsem selektivně získal z *E. coli* transformované ligační směsí. Pak jsem jej vpravil do *R. erythropolis*. Kultivoval jsem kmen *R. erythropolis* s novým konstruktem v médiu s fenolem jako jediným zdrojem uhlíku a energie. Výsledky ukazují větší nárůst v porovnání s divokým kmenem. Další výzkum bude směřován k naklonování promotorové oblasti do vektoru *pEPR*, s reportérovým genem *GFP*.

Biodegradace chlorovaných aromátů zástupci prokaryot

Autor: Pavla Šúleková

Ročník: 5.

Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

Školitel: Ing. Martina Siglová, PhD., Doc. Ing. Jan Masák, CSc.

V této práci je studován průběh dehalogenace aromatických chlorovaných uhlovodíků v přítomnosti primárních uhlíkatých zdrojů u bakteriálních kmenů *Rhodococcus erythropolis*, *Xanthobacter autotrophicus* CCM 4398 a *Sphingomonas paucimobilis* UT 26, které jsou schopné využít alifatické uhlovodíky jako jediný zdroj uhlíku a energie. Chlorované aromatické uhlovodíky (2 – chlorbenzoová kyselina, 4 – chlorbenzoová kyselina, 2,4 – dichlorbenzoová kyselina, 2 – chlorfenol, 4 – chlorfenol, 2,4 – dichlorfenol) nejsou uvedenými kmeny využívány jako výhradní zdroj uhlíku a energie. Nejprve byla věnována pozornost toxicitě těchto polutantů vůči uvedeným bakteriálním kmenům v přítomnosti alternativních růstových substrátů (glukosa a syrovátka). Nejvyšší tolerance se prokázala u kmene *Rhodococcus erythropolis*. Vůči *Xanthobacter autotrophicus* CCM 4398 a *Sphingomonas paucimobilis* UT 26 vykazovaly výše uvedené halogenované aromáty letální účinky i při nejnižších aplikovaných koncentracích. Z tohoto důvodu byly pro další experimentální práci vybrány kmeny *Pseudomonas putida* a *Pseudomonas fluorescens*, jejichž schopnost využít halogenované aromáty je v literatuře často popisována a byla následně ověřena i v naší laboratoři.

Vývoj technologických procesů pro bioremediaci kontaminovaných půd a vod znečištěných ropnými uhlovodíky

Autor: Marek Těšínský
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Martina Siglová, PhD.

V současné době se stále častěji řeší problematika kontaminace životního prostředí ropnými látkami. Znečištění ropnými polutanty patří často k dlouhodobým ekologickým problémům. Kromě odstraňování polutantů fyzikálně-chemickými metodami jsme svědky rozvoje kontrolovaného a praktického využití biologických systémů pro rozkládání chemických polutantů v životním prostředí. Biotechnologie, zaměřené především na dočišťování zasažených lokalit, jsou závislé na biodegradační aktivitě mikroorganismů.

Schopnost mikroorganismu rozkládat organické polutanty je ovlivňována vnějšími podmínkami, jimž je vystaven. Proto se v technologii hledají takové podmínky, při nichž daný mikroorganismus poskytne co nejvyšší degradační potenciál.

Předkládaná práce se zabývá vyhledáním nejen nejvhodnějších, ale i limitujících podmínek pro degradační činnost mikroorganismů. Jde zejména o zjištění vlivu teploty, pH a koncentrace síranových solí na reprodukční a s tím spojenou degradační aktivitu bakteriálních kmenů *P. putida* atyp., *P. fluorescens*, *P. veronii* a kvasinky *Yarrowia lipolytica*. Ze změřených růstových charakteristik je patrné jaké podmínky preferuje nejaktivnější mikroorganismus, se kterým se počítá pro další použití v pokusech vedoucích k optimalizaci technologie.

Biodegradační potenciál kmenů získaných z lokalit dlouhodobě kontaminovaných různými typy polutantů

Autor: Gabriela Tlapáková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství
Školitel: Ing. Martina Siglová, PhD.

Cílem práce bylo nalezení technologicky významných mikroorganismů, u kterých může být jejich biodegradační potenciál využit v bioremediačních procesech. Bylo testováno deset kmenů bakterií a jeden kvasinkový kmen (*Yarrowia lipolytica*) na čtyřech polutantech aromatického charakteru (toluen, naftalen, fenol a 2,4-dichlorbenzoát) a na trichlorethylenu.

Prvotní screening mikroorganismů z hlediska schopnosti odbourávat testované kontaminanty byl prováděn přes reprodukční aktivitu (jako OD_{400} nebo OD_{wb}), protože většina testovaných polutantů sloužila jako jediný zdroj uhlíku a energie. Výsledkem jsou růstové křivky odpovídající různým C-zdrojům. Byla použita média BSM a živný bujon a veškeré experimenty byly prováděny za běžných laboratorních podmínek. Měření růstu probíhalo v Erlenmeyerových baňkách na třepačkách a v mikrokultivačním zařízení Bioscreen C. Na základě těchto výsledků byla dále zjišťována intenzita degradace naftalenu na plotnách Petriho misek v závislosti na počtu mikroorganismů a schopnost opakovaného nárůstu mikroorganismů v prostředí, kde výše uvedené polutanty tvořily jediný zdroj uhlíku a energie. Z testovaných kmenů se jako technologicky významné ukázaly bakterie rodu *Pseudomonas* (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* a *Pseudomonas veronii*) a dále rody *Variovovax* a *Gordonia*.

Optimalizace metod pro ověřování antibakteriálních účinků skel potažených vrstvou iontů Ag⁺

Autor: Kateřina Sedmíková, Zlata Palkovičová

Ročník: 3.

Ústav: Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

Školitel: Ing. Martina Siglová, PhD.

Je známo, že materiály obsahující příměs stříbrných iontů vykazují antibakteriální účinky. Stříbrné ionty prostupují do bakterií a inaktivují jejich enzymy, ovlivňují bakteriální DNA nebo příp. jsou spojeny s vývojem peroxidu vodíku, který má baktericidní účinky. K ověřování těchto účinků bylo vyvinuto mnoho metod, jejichž spolehlivost se liší 1. podle způsobu úpravy skla; 2. podle zvolené detekční metody; 3. podle vybraných vnějších podmínek; 4. podle plochy testovaného skla, která byla ve styku s bakteriální suspenzí. Pro ověřování účinku skel dodaných Ústavem skla a keramiky byla srovnávána "kapková" a "ponorná" metoda, které byly vybrány jako ty nejspolehlivější a snadno aplikovatelné. Chyba metod je asi jeden řád.

Jako pokusný mikroorganismus byla používána bakterie *Escherichia coli*, která byla vybrána jako běžná, přiměřeně rezistentní bakterie vzhledem k zamýšlenému využití skel. Při "kapkové" metodě byla skla pokryta kapkou 0,2 ml roztoku bakteriální suspenze ve fosfátovém pufru a ponechána při pokojové teplotě, při "ponorné" metodě pak byla skla do roztoku ponořena a ponechána v termostatu při teplotě 37°C. Vzhledem k dosaženým výsledkům byla vyhodnocena jako výhodnější "ponorná" metoda, jejíž použití nebylo tolik závislé na vnějších podmínkách (např. teplota).

SEKCE: Aplikovaná mikrobiologie

KOMISE: Předseda: Prof. Ing. Demnerová Kateřina, CSc.
Členové Doc. Dr. Ing. Macková Martina
Ing. Lovecká Petra
Ing. Haubová Šárka

Interakce retrovirového proteinu p12 se SUMOligasou Ubc9

Autor: Lucie Dvořáková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. Ing. Tomáš Ruml, Ph.D.; Ing. Zdenek Knejzlík, Ph.D.

Protein SUMO (z *angl.* small ubiquitin-related modifier) může být pomocí ligasy Ubc9 kovalentně navázán prostřednictvím svého C-konce na postranní lysinový zbytek převážně jaderných proteinů za vzniku isopeptidové vazby. Modifikovaný lysinový zbytek je přítomen v konsenzuální sekvenci Φ KXE (Φ -hydrofóbní aminokyselina, X-jakákoliv aminokyselina), která je nezbytná pro vazbu Ubc9 na substrát a následnou SUMOylaci. V primární struktuře proteinu p12 z Mason-Pfizerova opičího viru, nezbytného pro skládání nezralé virové částice v infikované buňce, jsme našli dva potenciální aminokyselinové motivy zodpovídající za interakci s Ubc9. p12 a jeho některé mutantní formy byly schopny interagovat *in vivo* s Ubc9 v dvojhybridním kvasinkovém systému. Interakce byla také ověřena pomocí proteinů ve fusi s GFP a DsRed v savčích buňkách COS-1. S použitím rekombinantních proteinů exprimovaných v *E.coli* bylo potvrzeno, že Ubc9 byl schopen vázat p12 také *in vitro*. Toto zjištění však nebylo potvrzeno s použitím radioaktivně značených proteinů translatovaných v králíčím lyzátu retikulocytů a získaná data z nezávislých experimentů naznačují na mnohem komplexnější rozsah vzájemné interakce studovaných proteinů. Za účelem dalšího studia této interakce byly připraveny expresní konstrukty pro jednotlivé enzymy SUMOylační kaskády.

Degradace chlorbenzoátů bakteriálním kmenem ***Achromobacter xylosoxidans* A8**

Autor: Martina Chmelíková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. RNDr. Václav Pačes, DrSc.

Znečištění životního prostředí chloraromáty je vážným ekologickým problémem. Některé bakteriální kmeny jsou schopné za aerobních podmínek tyto látky využívat jako jediný zdroj uhlíku a energie. Tyto

degradace jsou umožněny přítomností specifických dioxygenas, které odbourávají chloraromáty na příslušné chlorkatecholy. Tyto sloučeniny jsou dále přeměňovány modifikovanou *ortho*-metabolickou dráhou (mocp) až na meziprodukty základního metabolismu.

Bakteriální kmen *Achromobacter xylosoxidans* A8 byl izolován v České republice z půdy kontaminované polychlorovanými bifenoly. Degraduje 2-chlor, 3-chlor, 2,5-dichlor, 2,3-dichlorbenzoát a benzoovou kyselinu. Sekvenční analýzou plasmidu pA81 tohoto kmene byly nalezeny geny pro *ortho*-halobenzoátdioxygenasu a mocp-dráhu. Jednotlivé geny byly klonovány a exprimovány v *Escherichia coli* BL21(DE3).

Tato práce je zaměřena na studium *ortho*-halobenzoátdioxygenasy, která je zodpovědná za přeměnu chlorbenzoátů na příslušné chlorkatecholy. Tento enzym se skládá ze dvou podjednotek OhbA a OhbB a ke katalýze vyžaduje přítomnost ferredoxinu a ferredoxinreduktasy.

Transformace rostlin *Nicotiana tabacum* bakteriálním genem *bphC*, studium jeho přítomnosti a exprese

Autor: Zuzana Chrastilová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Doc. Ing. Martina Macková, PhD., Ing. Martina Nováková

Jedním z mnoha druhů organických polutantů životního prostředí jsou polychlorované bifenoly (PCB). Vedle fyzikálně-chemických metod existuje možnost odstraňování těchto látek z půdy např. fytořemediací (tzn. pomocí rostlin). S cílem zvýšit účinnost biodegradace PCB byl do rostlin *Nicotiana tabacum* vnesen bakteriální gen *bphC* (gen degradační dráhy PCB), který kóduje enzym 2,3-dihydroxybifenylyl-1,2-dioxygenasu. V minulosti byly připraveny konstrukty obsahující gen *bphC* ve fúzi s detekčními markery GUS (gen pro β -glukuronidasu), LUC (gen pro luciferasu) a s histidinovou kotvou (His). Možnost exprese připravených genů byla prokázána po transienční expresi *bphC*/GUS a *bphC*/His v rostlinném organismu poskytující rychlou, avšak ne trvalou expresi. Trvalé zabudování genu *bphC* do rostlin bylo provedeno transformací pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí příslušné geny. Bylo připraveno 12 linií transgenních tabáků obsahujících gen *bphC* – 3 linie obs. gen *bphC*/GUS, 5 linií obs. gen *bphC*/LUC a 4 linie obs. gen *bphC*/His. Přítomnost genu *bphC* v rostlinném genomu na úrovni DNA a RNA byla ověřena metodou PCR a RT-PCR. Expese genu *bphC*/GUS byla dokázána histochemickou detekcí markeru pro β -glukuronidasu. Expese genu *bphC*/His byla potvrzena metodou Western blot s následnou imunochemickou reakcí.

Vývoj DNA microarray pro detekci *Campylobacter* spp. v potravinách

Autor: Eduard Klíma
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Doc. RNDr. Jarmila Pazlarová CSc.

Campylobacter spp. je potravní patogen způsobující enteritidu. V průběhu posledních let se stal, hned po *Salmonella* spp., druhou nejčastější příčinou gastroenteritálních onemocnění v České Republice. Podle

údajů Centra epidemiologie a mikrobiologie Státního zdravotního ústavu v Praze (EPIDAT) se počet případů kamylobakterií zvýšil za posledních 10 let 8x. Klasická desková metoda pro stanovení kamylobakterů je pracná a časově náročná, proto se vyvíjí rychlé postupy založené na molekulárně-genetických nebo imunochemických metodách. Tato práce je zaměřená na vývoj DNA microarray k detekci *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* v potravinách. Prezentované výsledky jsou součástí projektu číslo 1B44068 Národní Agentury pro Zemědělský Výzkum (NAZV). Vzorky *Campylobacter* spp. se připravují v prvním kroku pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR). Pro amplifikaci byly vybrány specifické úseky 5 cílových genu (*fur*, *glyA*, *ceuB-ceuC*, *23S rDNA* a *tox*) nalezených v literatuře. Z těchto navržených cílových genů se nepodařilo uspokojivě amplifikovat *tox* gen a proto byl vyřazen z dalších experimentů. Dalším krokem bude microarray analýza amplifikované DNA. Tři geny (*fur*, *glyA* a *23S rDNA*) jsou navrženy pro identifikaci termotolerantního kamylobaktera a gen *ceuB-ceuC* je navržen pro odlišení *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*.

Studium vlivu mikrobiální diverzity na odbourávání PCB u rostlin ***Nicotiana tabacum* a *Solanum nigrum***

Autor: Miroslav Macíček
Ročník: 4.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Doc.Ing.Martina Macková CSc

Polychlorované bifenyly (PCB) patří do skupiny chlorovaných aromatických látek, které byly ve velké míře používány v průmyslu, a jejichž produkce byla kvůli zjištěné toxicitě zakázána v osmdesátých letech. Fyzikálně-chemické metody odbourávání PCB jsou technologicky náročné a nákladné. Bioremediace oproti tomu představuje relativně levný, dostupný a široce použitelný způsob degradace polychlorovaných látek. V experimentu byl zkoumán vliv přítomnosti a kultivace rostlin tabáku a lilku černého na půdní mikroorganismy. Rostliny byly vysazeny do půdy kontaminované směsí kongenerů PCB (DELOR 103) a byl přidán PCB degradující kmen *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JAB1. Plynovou chromatografií byl stanoven obsah polychlorovaných bifenyly v půdě před výsadbou a následně měsíc po vysazení rostlin a přidání PCB degradujícího kmene JAB1. Bylo stanoveno množství bakterií v půdě a jednotlivé kmeny byly izolovány. Bakterie kultivované na minimálním médiu s přidavkem bifenyly, induktoru exprese bifenylového operonu, byly identifikovány Gramovým barvením a Neferm testy. Pomocí polymerázové řetězové reakce a následnou elektroforézou byla zjištěna přítomnost *bphA* genu kódujícího enzym biphenyldioxygenasu, první enzym bifenylového operonu sloužícího k mikrobiální degradaci PCB. Byl analyzován vliv rostlin na celkové množství PCB degradujících bakterií.

***Saccharomyces cerevisiae* s geneticky modifikovanou buněčnou** **stěnou jako biosorbent pro bioremediace těžkých kovů**

Autor: Stanislav Vinopal
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Ing. Pavel Kotrba, PhD.

Biosorpce těžkých kovů jejich chemisorpcí a adsorpcí na polysacharidy buněčné stěny a s ní asociované molekuly a funkční skupiny představuje efektivní a ekonomicky výhodnou cestu pro rekuperaci kovů

z průmyslových odpadních vod. Expozice nových vazebných míst pro kovy genetickou modifikací buněčné stěny biosorbentu je v posledním desetiletí extenzivně studovaným přístupem pro přípravu biosorbentů se zvýšenou vazebnou kapacitou a afinitou pro daný ion těžkého kovu. Byl vyvinut expresní systém pro zakotvení specifických vazebných peptidů (MBS) nebo glykosylačních signálů (pro zvýšení podílu větvených fosforylovaných mananů) na povrchu *S. cerevisiae*. Byla zkonstruována sada 5 rekombinantních proteinů nesoucích MBS (krátké repetitivní sekvence bohaté na His a Cys a 15,8 kDa Hg-specifický MerR protein) nebo *N*-glykosylační signály ve formě *N*-terminálních fúzí. Povrchová expozice fúzních proteinů byla potvrzena imunofluorescenční mikroskopií a u proteinů izolovaných z buněčných stěn imunochemicky Western blotem. Byl testován vliv nových vazebných míst na akumulaci Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} a Hg^{2+} za růstových podmínek a v klasickém vsádkovém sorpčním experimentu s živou biomasou i s buňkami s energetickým metabolismem (aktivním transportem) blokováným 2-deoxyglukosou.

Hodnocení vlivu PCB přítomných v půdě na vývoj rostlin a indigenní mikroflory

Autor: Jana Zlámalíková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. Ing. Kateřina Demnerová; CSc., Ing. Petra Lovecká

Půda kontaminovaná polychlorovanými bifenyly (skládku nebezpečného odpadu Lhenice) byla osázena rostlinou *Solanum nigrum* (lilek černý) a inokulována PCB degradující bakterií *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JAB 1. Ve třech postupných odběrech byla sledována toxicita půdy standardními testy ekotoxicity, celkový počet a počet PCB degradujících mikroorganismů, fyziologie rostlin a úbytek PCB v půdě.

Toxicita byla testována ve vodných výluzích kontaminovaných vzorků půdy následujícími testy:

- luminiscenčním testem s bakterií *Vibrio fischerii*, jejichž luminiscence je nepřímo úměrná toxicitě, výsledkem měření je relativní inhibice luminiscence v %,
- testem klíčivosti salátu setého podle ISO 11269-1, výsledkem je inhibiční koeficient v %,
- kontaktním testem se semeny salátu setého, výsledkem je inhibiční koeficient v %.

Obsah PCB v půdě byl stanoven plynovou chromatografií s ECD detektorem.

Mikrobiální diversita byla hodnocena porovnáním profilů izolované DNA v jednotlivých odběrech po amplifikaci pomocí primerů pro 16S rDNA a primerů pro TGGE analýzu.

SEKCE: Biochemie

KOMISE: Předseda: Prof. RNDr. Valentová Olga, CSc.
Členové: Doc. Ing. Macek Tomáš, CSc.
Ing. Mičková Barbora, PhD.
Ing. Vošahlíková Miluše

Příprava intracelulární aspartátové proteasy ACP z kvasinky *Candida albicans*

Autor: Václava Bauerová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. Tomáš Ruml, CSc.

Candida albicans náleží mezi oportunní patogeny, které jsou častým původcem mykotických infekcí u imunosuprimovaných pacientů. V rámci rodu *Candida* patří *C. albicans* k nejčastějším lidským patogenům, vyskytující se v 70-90 % onemocnění kandidózou. Cílem práce je popsat dosud necharakterizovaný enzym tohoto klinicky významného druhu a porovnat vlastnosti autentického proteinu a rekombinantního proteinu, tedy zjistit zda dochází k posttranslačním modifikacím, případně jaký mají tyto modifikace vliv na aktivitu enzymu.

Gen pro ACP (Apr 1) vykazuje vysoký stupeň homologie s genem pro vakuolární aspartátovou proteasu ze *Saccharomyces cerevisiae* (PEP4) a genem pro lyzozomální aspartátovou proteasu katepsin D, vyskytující se u obratlovců. Za účelem izolace autentického proteinu byla proto využita modifikace protokolu na izolaci katepsinu D a částečně také protokolu na izolaci vakuolárního enzymu ze *S. cerevisiae*. Rovněž byly připraveny syntetické peptidy pro imunizaci a získány protilátky proti ACP, které by mohly usnadnit izolaci ACP. Rekombinantní protein ACP by měl být získán vnesením již připravených insertů do plasmidu pET24d+ a produkcí v buňkách *E. coli*.

Využití acetyltyraminfluoresceinu pro detekci oxidovaných proteinů krevních destiček

Autor: Kristýna Kneřová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Ing. Jiří Suttner, Csc.

Působením produktů oxidačního stresu dochází ve struktuře proteinů ke změnám, které provázejí různá onemocnění, ale mohou mít i význam při regulaci procesů v buňce. Reaktivní kyslíkaté látky (ROS)

způsobují kromě tvorby karbonylových derivátů bílkovin, přeměny sulfhydrylů na disulfidy apod. i vznik hydroxytyrosylových derivátů. Ty je možno detegovat fluorescenčně značeným tyraminem, takzvaným tyraminfluoresceinem (TyrFluo). ROS reagují jak s tyrosylovými zbytky bílkovin tak s hydroxybenzoovou částí TyrFluo za vzniku radikálů, které spolu mohou vzájemně reagovat. TyrFluo reaguje pouze s povrchovými proteiny, protože membrána buňky je pro něj nepropustná. Proto musí být převeden do acetylované formy na acetyltyraminfluorescein (acetylTyrFluo), který buněčnou membránou prochází bez problémů a je tedy schopen označit intracelulární oxidované proteiny.

AcetylTyrFluo byl připraven ve dvou krocích. Tyramin vytvořil se sukcinimidoesterem 6-(fluorescein-5-karboxamido)hexanové kyseliny konjugát tyramin-fluorescein (TyrFluo), který byl následně acetylován acetanhydridem za vzniku acetylTyrFluo. Ten byl přidán k izolovaným krevním destičkám, které byly následně aktivovány kolagenem, jehož účinek vede mimo jiné ke vzniku ROS (H_2O_2 , $\cdot OH$, $\cdot OOH$,...). Oxidované destičkové proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE, převedeny na PVDF membránu a vizualizovány pomocí protilátky proti fluoresceinu.

Vliv oxidované celulózy na aktivaci krevních destiček

Autor: Josef Komárek
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof., Ing. Jan E. Dyr, DrSc.

Celulóza je biokompatibilní a velmi účinný materiál užívaný k zástavě kapilárního a parenchymatózního krvácení. V přítomnosti oxidované celulosy dochází k aktivaci krevních destiček a následné zástavě krvácení. Mechanismus tohoto působení na krevní destičky však dosud není zcela znám a k jeho bližšímu pochopení přispívá i předkládaná studie. Praktické využití této znalosti pak spočívá v cílené modifikaci a zlepšování vlastností oxidované celulosy.

V experimentech byl použit roztok mikrodisperzní oxidované celulózy s obchodním označením *m•doc*TM Alltracel. Byl pozorován vliv na krevní destičky resuspendované v normální plasmě a v plasmě se sníženou koncentrací určitého koagulačního faktoru. Aktivace destiček byla vyjádřena jako podíl celkového serotoninu uvolňovaného z destičkových granulí během aktivace. Koncentrace serotoninu byla stanovena metodou HPLC-RP s fluorimetrickou detekcí. Jinou možností stanovení aktivace destiček je měření vznikajícího zákalu turbidimetricky při 365 nm.

Zjistili jsme, že časový průběh aktivace charakterizuje 5-10 min. dlouhá lag fáze, po níž následuje rychlý nárůst koncentrace serotoninu. Tato lag fáze je výrazně prodloužena (o 10-15 min) při inkubaci s destičkami resuspendovanými v plasmě s deficiencí faktoru VIII, IX a XII, nikoli však s deficiencí faktoru XIII, což napovídá, že aktivace destiček oxidovanou celulosou probíhá s využitím faktorů vnitřní cesty koagulační kaskády. Nověji přecházíme na metodu měření délky lag fáze turbidimetricky. Tato metoda se jeví vhodnější díky podstatně nižší časové a přístrojové náročnosti.

Úloha rostlinných peroxidas při transformaci PCB

Autor: Jitka Najmanová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitelé: Doc. Ing. Tomáš Macek, CSc.; Doc. Dr. Ing. Martina Macková.

Funkce a mechanismus působení rostlinných enzymů při transformaci xenobiotik nejsou doposud zcela dostatečně prostudovány. Peroxidas jsou považovány za potenciální účastníky v řadě těchto transformací. S cílem vysvětlit účinek peroxidasy izolovaných z různých druhů rostlin, byly z buněk rostlinných tkáňových kultur *Nicotiana tabacum*, *Armoracia rusticana* a *Solanum nigrum* izolovány surové enzymové extrakty. Ty, po částečné purifikaci síranem amonným, byly testovány z hlediska schopnosti katalyzovat přeměnu PCB. Preparát izolovaný z *Nicotiana tabacum* prokázal různou aktivitu vůči testovaným, strukturně odlišným PCB. Nejvyšší přeměna, až 80%, byla zaznamenána v případě PCB 3 a PCB 9. Při analýze produktů po reakci PCB 9 s peroxidasou byl identifikován dihydroxy-2,5-dichlorobifenyl. Při srovnání s výsledky pokusů s preparáty z ostatních rostlinných druhů bylo zjištěno, že účinnost přeměny je druhově specifická. Pro bližší pochopení mechanismu transformace byly rostlinné preparáty purifikovány s cílem získat jednotlivé isoenzymy použitelné pro další studium.

Izolace a charakterizace antimikrobiálních peptidů z larev mouchy ***Neobellieria bullata***

Autor: Tereza Neubauerová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Doc. Dr. Ing. Martina Macková

Stále klesající účinnost dosud vyvinutých antibiotik staví do popředí mikrobiologických výzkumů hledání nových látek s antimikrobiálním účinkem, například na basi peptidů. Jako zdroj izolace takových peptidů jsme vybrali organismus, který často přichází do střetu s bakteriálními infekcemi – masařku *Neobellieria bullata*. Indukci antibakteriálních peptidů jsme prováděli bakteriálním patogenem (*E. coli*) u larev *Neobellieria bullata*. Po několika hodinové inkubaci byla získána hemolymfa a postupnou centrifugací a srážením byly izolovány nízkomolekulární peptidy. Ty byly dále děleny chromatografickými metodami (RP-HPLC, absorpční chromatografie). Jednotlivé heterogenní frakce byly identifikovány a charakterisovány pomocí SDS-PAGE, tryptickým štěpením a hmotnostní spektrometrií po porovnání s údaji z databází molekulových hmotností. Antimikrobiální aktivita frakcí byla detegována metodou vyhodnocování odezvy růstu pathogenních mikroorganismů v závislosti na přítomnosti testované látky na přístroji BIOSCREEN. Pro testování byly použity bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. V izolovaných frakcích se nám podařilo identifikovat již známé peptidy: *transferin*, *Sapecin C* a dipeptid β -*alanyltyrosin*. Další peptidy jsou postupně izolovány a analysovány z hlediska antimikrobiálních vlastností.

Syntéza a sekvenace cyklických peptidů specificky interagujících **s cAMP**

Autor: Martin Svoboda
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. RNDr. Milan Kodíček, CSc.; Ing. Martin Strohal

Cílem tohoto projektu je syntéza cyklického peptidu, jenž specificky interaguje s cyklickým 3'-5'-AMP, přičemž tato interakce by měla být detegovatelná spektrofotometricky. Chromoforní skupinou by byla azovazba, přes kterou je peptid cyklizován. Syntéza různých sekvencí peptidů se bude provádět

automatickým syntezátorem metodou peptidové knihovny. Naším úkolem poté bude určit sekvenci interagujícího peptidu pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF-PSD (rozpad za iontovým zdrojem). Zatím jsme ve stádiu syntézy modelových peptidů klasickou cestou v roztoku a ověřování metody sekvenování. Podařilo se připravit 6 peptidů, na nichž testujeme následnou analytickou metodu. Vyzkoušeli jsme dvě matrice a to α -kyano-4-hydroxykyselinu (CCA) a 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinu (DHB). Z dosažených výsledků je patrné, že při ionizaci peptidu laserem při použití matrice DHB se překvapivě azovazba redukuje na dvě aminoskupiny a peptid se otevírá; tato skutečnost je velmi výhodná pro určení sekvence. K stanovení sekvence z PSD spektra používáme program mMass. Dosavadní výsledky ukazují, že touto metodou lze sekvenci studovaných cyklických peptidů určit s dostatečnou spolehlivostí.

Modifikace fibrinogenu systémem metmyoglobin/H₂O₂

Autor: Jana Štikarová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Ing. Jiří Suttnar, CSc.

Oxidační stres je jednou z příčin vaskulárního poškození vedoucího ke vzniku aterosklerosy. Během něj dochází k působení volných radikálů na proteiny, které mění své vlastnosti. Z plazmatických proteinů je nejnáze modifikován fibrinogen.

Fibrinogen (Fbg) je glykoprotein o relativní molekulové hmotnosti 343 000. Jde o dimer skládající se ze tří párů neidentických řetězců spojených disulfidovými můstky. Během fyziologického působení trombinu dochází k odštěpení fibrinopeptidů, tvorbě fibrinmonomeru a následné polymerizaci na fibrinovou síť.

Oxidačně modifikovaný Fbg vznikající za podmínek oxidačního stresu má pravděpodobně pozměněnou schopnost tvořit fibrinovou síť, což může mít fyziologický význam. Pro modelování podmínek oxidačního stresu jsme použili systém metmyoglobin/H₂O₂, o kterém je známo, že vede k tvorbě proteinperoxyradikálů schopných oxidace bílkovin.

Metmyoglobin (metMb) byl připraven působením hexakynoželezitanu draselného na myoglobin a následně přečištěn gelovou filtrací na koloně Sephadexu G-10. Reakcí modifikovaného Fbg s dinitrofenylhydrazinem bylo spektrofotometricky zjištěno (při 370 nm), že dochází ke karbonylaci molekul Fbg v závislosti na koncentraci činidla a délce jeho působení.

SEKCE: Chemie a technologie sacharidů

KOMISE: Předseda: Doc.Ing. Josef Přihoda, CSc.
Členové Ing. Marie Hrušková, CSc.
Ing. Vladimír Pour, CSc.
Mgr. Andriy Synytsya, PhD.
Ing. Evžen Šárka, CSc.

Ověření charakteristik pšenično-žitného chleba

Autor: Marek Buchta
Ročník: 5.
Ústav: Ústav chemie a technologie sacharidů
Školitel: Ing. Marie Hrušková, CSc.

Jakost chlebových pekárenských výrobků závisí na kvalitě pšeničné a žitné mouky a charakteristikách kvasu jako klasické technologické složky. Kvas má nejen přímý vliv na konečný objem výrobku, ale je i nositelem jedinečných sensorických vlastností typických pro základní druhy chleba. Tradiční způsob nepřímého vedení výroby, který spočívá ve vyvádění žitných kvasů, je procesem časově náročným a závislým na dodržování optimálních podmínek přípravy. Z těchto důvodů je tendence výrobu chleba racionalizovat užitím kvasových koncentrátů.

Cílem práce bylo porovnání účinku čtyř druhů kvasových koncentrátů (Roggoferm, Beta base, Kwas 330, Bass) stanovením vlivu na měrný objem, kyselost a sensorické hodnocení finálních výrobků. Vliv jednotlivých přípravků na tyto parametry byl zjišťován uzanční metodou pokusného pečení, sensorickou analýzou (poloprovozní pekárna Zeelandia s.r.o., Malšice) a měřením čísla kyselosti (ČSN 56 0226-10).

Mezi jednotlivými kvasy byl zjištěn průkazný rozdíl ve vlivu na všechny sledované parametry. Největší měrný objem byl naměřen pro pšenično-žitný chléb s přísadkou Roggofermu, zatímco nejlepší sensorické hodnocení dosáhl chléb stejné receptury s přísadkou Beta base.

Stanovení obsahu β -glukanů v houbách rodu *Pleurotus* sp. a *Agaricus* sp.

Autor: Jana Černá
Ročník: 5.
Ústav: Chemie a technologie sacharidů
Školitel: PharmDr. Kateřina Míčková

Jedlé houby jsou vhodným zdrojem vlákniny. Buněčné stěny hub obsahují zvláště chitin, hemicelulosa, mannany a nejzajímavější funkční sloučeniny, β -glukany. Již více jak 40 let jsou β -glukany považovány za imunomodulátory. Je prokázán jejich synergismus s antibiotiky¹, mají antioxidační vlastnosti a protinádorovou aktivitu² a mohou chránit živé organismy před zářením³.

Ve vybraných kmenech hub *Pleurotus* sp. a *Agaricus* sp. byl stanoven obsah β -glukanů pomocí enzymového setu Megazyme K-YBGL 7/2004. Naměřené hodnoty byly porovnány s obsahem vlákniny. Bylo zjištěno, že třeně hub, které jsou méně vyhledávané pro kulinářské využití, jsou vhodným zdrojem β -glukanů pro potravinářské doplňky. Třeně hub mají ve srovnání s klobouky vyšší obsah těchto polysacharidů.

1. Vetvicka V., Terayama K., Mandeville R. (2002): *Jana* **5**, 1-5.
2. Mizuno T. (1995): *Food Rev. Int.* **11**,7-21.
3. Wasser S.P. (2002): *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 258-274.

Vliv 24-epibrassinolidu na chemické složení semen obilovin

Autor: Eva Gotvaldová
Ročník: 5.
Ústav: Chemie a technologie sacharidů
Školitel: Prof. Pavel Kadlec, DSc.

Byl sledován vliv postřiku 24-epibrassinolidu během vegetace na obsah tuku, bílkovin, celkového a poškozeného škrobu v semenech ozimé a jarní pšenice. U 24-epibrassinolidu byla prokázána antistresová aktivita, která napomáhá rostlinám růst i za nepříznivých podmínek. Je to steroidní látka řazená mezi růstové regulátory rostlin (fytohormony). V minulosti bylo prokázáno, že obsah bílkovin u rostlin stresovaných vysokou teplotou a suchem klesá, zatímco obsah tuků, škrobů a poškozených škrobů roste, což souvisí se zmenšeným kořenovým systémem rostlin. Tyto změny, pokud jsou intenzivnější, mají vliv i na řadu vlastností rostlin v následujícím vegetačním období.

Analyzována byla zrna třech odrůd jarní pšenice: Helena, Molera, Lucia a třech odrůd pšenice ozimé: Ebi, Samanta, Estica, přičemž od každé odrůdy byl analyzován vzorek standardní a vzorek ošetřený 24-epibrassinolidem.

Analýza jakostních znaků pšeničného pečiva

Autor: Marta Kostelanská
Ročník: 5.
Ústav: Ústav chemie a technologie sacharidů
Školitel: Ing. Marie Hrušková, CSc.

Jakost pekařských výrobků z hlediska spotřebitelské kvality určuje zejména tvar, měrný objem a vlastnosti střídy pečiva, které se zpravidla hodnotí subjektivně sensorickou analýzou. Moderní způsob hodnocení střídy z hlediska vzhledu (velikost a rozložení pórů na řezu) je využití analýzy obrazu jako objektivní metody.

Cílem práce bylo posoudit jakostní znaky pečiva pomocí pekařského pokusu (metodika VŠCHT Praha), který byl proveden s moukami ze sklizně 2003 a 2004. Současně byl sledován vliv základních recepturních složek (sůl, cukr, tuk), mléčných komponent (sušená mléka, syrovátka a mléčné náhrady) a zlepšujících pekařských přípravků (výrobce: Kontinua Praha, Perner Svijany) na vlastnosti pečiva hodnocením měrného objemu, penetrace a vlastností střídy pomocí analýzy obrazu (Image Analysis – Program Lucia G/3, ČR).

Základní recepturní složky se projevují ve vlastnostech pečiva diferencovaně v závislosti na použité mouce. Mléčné komponenty mají spíše negativní vliv na měrný objem pečiva, ale nebyl prokázán jejich pozitivní účinek na charakteristiky střídy. Sledované zlepšovací přípravky průkazně ovlivňují měrný objem pečiva, penetraci a výrazným způsobem i znaky střídy.

Stanovení primární struktury vybraných polysacharidů

Autor: Martina Marešová
Ročník: 4.
Ústav: Chemie a technologie sacharidů
Školitel: Ing. Anežka Trilčová

Nejdůležitější stavební jednotky polysacharidů jsou hexosy D-glukosa, D-mannosa, D-galaktosa a D-fruktosa. V polysacharidech řas se může vyskytovat také L-galaktosa. Dále se v polysacharidech vyskytují pentosy L-arabinoza a D-xyloza, z deoxycukrů přicházejí v úvahu L-fukosa a L-ramnosa. V polysacharidech vyšších rostlin se také nachází uronové kyseliny, hlavně kyselina D-glukuronová a D-galakturonová, v polysacharidech řas pak kyselina D-manuronová a D-glukuronová. Živočišné a bakteriální polysacharidy a polysacharidy nižších rostlin mimo jiné obsahují glukosamin a galaktosamin. Před vlastním stanovením stavebních jednotek polysacharidů je třeba nejprve polysacharidy z příslušné matrice extrahovat a hydrolyzovat vhodným postupem.

Z kakaového prášku byly izolovány polysacharidy vodnou extrakcí při 80°C. Extrakce polysacharidů z hub se lišila podle druhu zkoumaného materiálu. Izolované polysacharidy byly hydrolyzovány Semanovou hydrolyzou¹. Vzniklé monosacharidy byly zredukovány a pak acetylovány^{2,3}. Vzniklé alditolacetáty byly analyzovány plynovou chromatografií.

1 Selvendran R.R., March J. F., Ring S.G.: Anal. Biochem. 96, 282 (1979).

2 Blakeney A. B., Harris P. J., Henry R. J., Stone B. A.: Carbohydr. Res. 113, 291 (1983).

3 Harris P. J., Blakeney A. B., Henry R. J., Stone B. A.: J. AOAC Int. 71, 272 (1998).

Stanovení vlákniny potravy ve vybraných odrůdách lupiny

Autor: Bc. Jana Regnerová
Ročník: 5.
Ústav: Chemie a technologie sacharidů
Školitel: Ing. Marcela Sluková, PhD.

Lupina je pro lidskou výživu významná především vysokým obsahem bílkovin a významným množstvím vlákniny potravy. Vláknina potravy (označovaná také jako balastní nebo nevyužitelné sacharidy) je tvořena řadou chemických sloučenin, které jí dodávají specifické fyziologické, funkční a nutriční vlastnosti. Význam vlákniny pro lidský organismus spočívá především v její ochranné funkci proti civilizačním chorobám a dále se podílí na léčbě některých onemocnění: zejména rakoviny tlustého střeva, vysoké hladiny cholesterolu a glukosy v krvi.

Cílem práce bude stanovit obsah rozpustné a nerozpustné vlákniny potravy ve vzorcích mouk pomocí enzymově-gravimetrické metody (mezinárodní metoda AOAC 991.43). Mouky byly získány ze semen vybraných odrůd lupiny bílé (*Lupinus albus*). Sledované mouky byly dále charakterizovány obsahem sušiny, popela, bílkovin a tuku.

Spektrofotometrické studium komplexace amino a karboxy derivátů glukosy s přechodnými kovy

Autor: Ivana Sedláková
Ročník: 5.
Ústav: Chemie a technologie sacharidů

Školitel: Mgr. Andriy Synytsya, PhD.

Polysacharidy obsahující amino nebo karboxylovou skupinu (chitosan, pektin) prokázaly mimořádné komplexační schopnosti s kationty řady těžkých kovů a radionuklidů, což lze využít k odstranění těchto kovů z kontaminovaných půd či vod. Některé kationty kovů, například Fe^{3+} , Cr^{3+} a VO^{2+} , mají nezastupitelný biologický význam (kofaktory enzymů, transport kyslíku, součást lékových preparátů). Zajímavý je také vliv některých kationtů kovů na tvorbu gelu polysacharidů. Názorným modelem pro studium biologicky významných interakcí polysacharidů jsou jejich strukturní jednotky - mono- a oligosacharidy. Předmětem této práce bylo spektroskopické studium komplexace derivátů glukosy (glukosamin, glukuronát a glukonát sodný) s kationty přechodných kovů (Co^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , VO^{2+}) pomocí UV-Vis spektrofotometrické titrace (200-900 nm) ve vodném roztoku za neutrálního pH. V řadě případů byla prokázána tvorba chelátů na základě změn charakteristických pásů kationtů jako jsou modré (hypsochromní) či červené (bathochromní) posuny, hyperchromní nebo hypochromní efekty a také existence isosbestických bodů. Výsledky UV-Vis spektroskopie byly použity pro stanovení komplexačních konstant a odhad prostorového uspořádání vzniklých komplexů.

Stanovení obsahu vlákniny v houbách rodu *Pleurotus* sp. a *Agaricus* sp.

Autor: Radka Štoplová
Ročník: 5.
Ústav: Chemie a technologie sacharidů
Školitel: Ing. Marcela Sluková, PhD.

Jedlé houby jsou vhodným zdrojem vlákniny. Vlákna je tvořena celou řadou chemických sloučenin, které jí dodávají specifické fyziologické, funkční a nutriční vlastnosti. Vlákna může mít pozitivní zdravotní účinky při prevenci některých onemocnění; zejména rakoviny tlustého střeva, srdečních chorob a cukrovky. Napomáhá snížení cholesterolu a využívá se v nejrůznějších speciálních výživách při léčbě obezity.

Ve vybraných kmenech hub *Pleurotus* sp. a *Agaricus* sp. byl stanoven obsah rozpustné, nerozpustné a celkové vlákniny pomocí enzymového setu Megazyme TDFR 06/01 s použitím metody AOAC 991.43. Principem uvedené metody je enzymově-gravimetrické stanovení vlákniny, které spočívá v postupné degradaci rostlinného materiálu amylolytickými a proteolytickými enzymy, a tím se simuluje průběh trávení v zažívacím traktu. Vzorky hub byly dále definovány obsahem bílkovin a popela.

SEKCE: Analýza potravin I

KOMISE: Předseda: Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.
Členové Dr. Ing. Kateřina Holadová
Dr. Ing. Jan Poustka
Ing. Tomáš Čajka

Stanovení obsahu vybraných syntetických barviv (azo-barviv)

Autor: Radka Antoňů
Ročník: 5.
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Školitel: Dr. Ing. Věra Schulzová

Azo-barviva patří do skupiny látek, které lze díky jejich struktuře snadno rozštěpit na karcinogenní aromatické aminy. Jejich aplikací lze maskovat nepříznivý vzhled potraviny pro spotřebitele. Toto jednání lze pokládat za klamání spotřebitele, z těchto důvodů je jejich používání v potravinářství zakázáno.

V předložené studii byla popsána úprava stávající metody stanovení obsahu azo-barviv (sudan I-IV, sudan orange, para red, sudan red) a syntetického barviva rhodaminu B. Barviva byla stanovována ve vzorcích instantních nudlových polévek a ve vzorcích koření. Izolace analytů byla provedena extrakcí směsí acetonitrilu a 1% kyseliny octové v poměru 95:5. Separace a kvantifikace barviv byla provedena technikou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) na přístroji HP 1100 series (Agilent) s hmotnostním detektorem Finnigan LCQ Deca. Separace byla provedena gradientovou elucí na koloně s reverzní fází. Vyvinutá metoda významně zkracuje dobu analýzy a umožňuje stanovení dalších analytů (rhodamin B). Je zároveň vhodnější pro LC-MS aplikace.

Ve vyšetřených vzorcích koření a instantních polévek nebyl zjištěn přídavek azo-barviv.

Hodnocení detekčních limitů při stanovení reziduí pesticidů v jablkách

Autor: Markéta Hakenová
Ročník: 4.
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Školitel: prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc., Ing. Jana Tichá

Kontrola reziduí pesticidů v potravinách je součástí ochrany zdraví konzumenta. Multireziduální metoda (MRM) pro stanovení reziduí celkem 88 pesticidů reprezentujících různé fyzikálně chemické vlastnosti vyvinutá v Akreditované laboratoři Ústavu chemie a analýzy potravin VŠCHT Praha, spočívá v extrakci

navážky vzorku ethylacetátem a přečištění extraktů pomocí vysokoúčinné gelové permeační chromatografie (HPGPC). Identifikace a kvantifikace analytů v přečištěných extraktech je realizována metodou plynové chromatografie (GC) s využitím selektivní detekce (detektor elektronového záchytu - ECD, dusíko-fosforový detektor - NPD). Pro potvrzení pozitivních nálezů je využívána metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS). Cílem předkládané studie je porovnání pracovních charakteristik dosažitelných pomocí nového modelu hmotnostně spektrometrického detektoru s jednoduchým kvadrupolovým analyzátozem MSD 5975N firmy Agilent a porovnání s MSD 5973, který byl dosud v laboratoři používán. Experimenty jsou zaměřeny na rezidua vybraných pesticidů reprezentujících různé fyzikálně chemické vlastnosti, jako matrice byla zvolena jablka odrůdy Golden Delicious, standardní odrůda pro výrobu dětské a kojenecké výživy.

Stanovení obsahu patulinu

Autor: Kateřina Hejtmánková
Ročník: 4.
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Školitel: Dr. Ing. Věra Schulzová

Patulin je mykotoxin laktónového typu produkovaný zejména plísněmi *Penicillium expansum* a *Penicillium patulinum*. Vyskytuje se v přezrálých nebo poškozených jablkách, méně v hruškách, meruňkách a hroznovém vínu. Je to relativně běžný kontaminant ovocných koncentrátů a džusů, který může sloužit jako indikátor kvality použitého ovoce a dodržení výrobního procesu. Vzhledem k jeho kancerogenitě a mutagenitě jsou jeho obsahy sledovány, a to hlavně v dětské a kojenecké výživě. Podle směrnice (EC) No 1425/2003 je hygienický limit pro kojeneckou výživu 10 µg/kg. Existuje řada metod stanovení, z nichž nejběžnější je HPLC/DAD.

Byla testována různá extrakční činidla a různé typy detekce. Nejnižší detekční limit měla metoda, kdy patulin byl extrahován 84% acetonitrilem, extrakt byl přečištěn pomocí SPE (Mycosep®228 AflaPat), odpařen do sucha a rozpuštěn v 0,005% kyselině octové. Vzorek byl stanoven HPLC/DAD při 276 nm. Detekční limit této metody je 5 µg/kg a jeho snížení je předmětem další práce.

Perfluorované perzistentní kontaminanty ve vodním ekosystému

Autor: Petra Hrádková
Ročník: 4.
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Konzultant: Ing. Kateřina Hájková
Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.

Řada perfluorovaných sloučenin představuje vedle polychlorovaných a polybromovaných látek další skupinu halogenovaných kontaminantů, které mohou negativně působit na biotickou složku. Patří mezi perzistentní sloučeniny s bioakumulačním potenciálem a jejich přítomnost byla zjištěna především ve vodním ekosystému. Mohou však také pronikat do potravinového řetězce člověka. Mezi nejsledovanější zástupce řadíme perfluorooktansulfonát a jeho soli (PFOS), kyselinu perfluorooktanovou (PFOA) a perfluorooktansulfonamid (PFOSA). V současné době se výzkumem perfluorovaných látek v potravních řetězcích zabývá i Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority – EFSA).

Na Ústavu chemie a analýzy potravin byla optimalizována metoda pro stanovení výše zmíněných zástupců perfluorovaných sloučenin. Oddělení analytu od matrice je založeno na tvorbě relativně hydrofobního iontového páru a jeho následné extrakci do methyl-*tert*-butyletheru. K identifikaci a

kvantifikaci perfluorovaných sloučenin se využívá techniky kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS) a analyzátozem iontů typu iontová past (ITD).

V práci bude prezentována validace metody a dokumenty nálezy těchto látek v živočišných vzorcích.

Potenciál UPLC v multireziduální analýze pesticidů

Autor: Anna Krajčová

Ročník: 4.

Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin

Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.; Ing. Tomáš Kovalczuk, Mgr. Martin Jech

V současné době jsou pro sledování hladin reziduí semipolárních pesticidů v rostlinných matricích používány především LC-MS metody. Díky pokrokům ve strategii pro přípravu vzorků stejně díky použití vysoce selektivní tandemové hmotnostně-spektrometrické detekci (MS/MS) je možno analyzovat nepřečištěné extrakty. Inovací v současné HPLC technologii je dostupnost vysokotlakých pump umožňujících provozovat kolony s konvenčními rozměry a velmi malými částicemi stacionární fáze (<2 μm). Jak vyplývá z van Deemterova vztahu lze za těchto podmínek dosáhnout v širokém rozmezí lineární průtokové rychlosti velmi nízkých hodnot ekvivalentu teoretického patra. V předložené studii bude dokumentována optimalizace metody pro stanovení 67 moderních pesticidů s využitím extrémě účinného chromatografu Acquity (Waters, USA) a hmotnostního detektoru Quattro Premier (Waters, USA) s tandemovým kvadrupólovým analyzátozem. Separace byla realizována na koloně Acquity BEH C18 (100x2,1 mm; 1,7 μm)

Optimalizace metody stanovení 17 β -estradiolu v krevní plasmě

Autor: Hana Pavlíčková

Ročník: 5.

Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin

Školitel: Ing. Jaromír Lojza, Dr. Ing. Věra Schulzová

17 β -estradiol je představitelem rozsáhlé skupiny estrogenů - samičích pohlavních hormonů, které mají vliv na vývoj samičích sekundárních znaků a u dospělých zvířat navozují říjí. K metabolismu estrogenů dochází hlavně v játrech. Vzniklé metabolity jsou konjugovány na glukuronidy a sulfáty a poté vyloučeny močí nebo přechází do krevního řečiště.

Práce je zaměřena na optimalizaci metody stanovení 17 β estradiolu v krevní plasmě. Metoda se sestává z následujících kroků: (i) enzymová hydrolýza přítomných konjugátů pomocí enzymu glykosidáza/sulfatáza, kdy byly testovány podmínky hydrolýzy (délka hydrolýzy, koncentrace enzymu); (ii) izolace 17 β estradiolu z plazmy pomocí LLE extrakce směsí ethyl acetát:cyklohexan; (iii) vlastní stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC/FLD).

Optimalizovaná metoda bude dále využita ke stanovení fytoestrogenů daidzeinu a genisteinu v krevní plazmě, kdy z důvodu absence standardů glukuronidů jednotlivých analytů není možné metodu optimalizovat přímo.

Využití techniky SPME ke srovnávacím analýzám olivového oleje

Autor: Jitka Slovanová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Školitel: Dr. Ing. Kateřina Holadová, Ing. Eva Klimánková

Cílem práce bylo srovnání profilu aromatických látek v několika druzích panenského olivového oleje a zjištění případných rozdílů. Typické aroma olivových olejů tvoří více jak 70 sloučenin, mezi které patří zejména produkty oxidativní degradace nenasycených mastných kyselin jako jsou aldehydy, například hexanal, nonanal, 1-hexanol nebo 2,4, decadienal. Dále se na aroma podílí alifatické a aromatické uhlovodíky, alkoholy, ketony, ethery a estery.

Pro účely srovnávacích analýz byla optimalizována analytická technika mikroextrakce na tuhou fázi (SPME). Použito bylo vlákno se stacionární fází PDMS-DVB-CX. Jako instrumentální koncovka byla použita plynová chromatografie s hmotnostně spektrofotometrickou detekcí (GC/MS). V průběhu vývoje metody byla optimalizována řada parametrů ovlivňujících sorpci analytů-výběr stacionární fáze SPME vlákna, teplota, doba inkubace a sorpce.

Celkem bylo dodáno 316 vzorků olivového oleje pocházejících z devíti odrůd oliv. Nejvýznamnější rozdíly v obsahu složek mezi dodanými vzorky byly zejména v obsahu hexanal, 3-karenu, 2-hexen-1-olu, kys. octové a farnesenu.

Rozšíření multireziduální metody pro sledování moderních pesticidů v rostlinných matricích

Autor: Jana Urbanová
Ročník: 4
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová CSc., Mgr. Martin Jech

Metody pro stanovení reziduí pesticidů v rostlinných matricích prochází průběžným vývojem. Aktualizován je nejen rozsah sledovaných pesticidů, tak jak dochází k registraci nových a vyřazování starých přípravků, ale potřeba inovace vyvolávají i nové legislativní požadavky (změny hygienických limitů).

V předložené studii byla rozšířena stávající LC/MS-MS metoda pro stanovení 67 semipolárních pesticidů v ovoci a zelenině o nové analyty: fluazinam, trifloxistrobin, fenpropidin, fenpropimorph, pendimethalin, jejichž sledování je vyžadováno producenty surovin pro dětskou výživu.

V prezentaci bude porovnán v laboratoři dosud používaný způsob přípravy vzorku (extrakce acetonitrem, filtrace, převedení do methanolu) s inovativní strategií QuEChERS(Quick Easy Cheap Effective Rugged Save), která k přečištění primárního acetonitrilového extraktu využívá disperzní extrakce na tuhou fázi (sorbent typu PSA).

Vývoj HPLC – MS/MS metody pro stanovení fusariových mykotoxinů

Jméno: Veronika Vodičková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Školitel: Dr. Ing. Jan Poustka

Trichothecenové mykotoxiny tvoří největší skupinu toxinů produkovaných plísněmi rodu *Fusarium*, jsou celosvětově rozšířeny a nejčastěji se vyskytují na obilovinách. Patří k toxinům s akutními a chronickými účinky na zdraví člověka i živočichů. Proto je nezbytné sledovat jejich obsahy v potravním řetězci.

Ke stanovení trichothecenů je tradičně používána metoda GC-ECD po derivatizaci sledovaných sloučenin. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) představuje novou, rychlou metodu vhodnou pro současné stanovení významných trichothecenových mykotoxinů (dexynivalenol, nivalenol, Fusarenon X, 3-acetyldeoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, HT-2 toxin, T-2 toxin) a zearalenonu. K přečištění vzorku je využíváno kolonek Mycosep™ #226. Pro zmíněné mykotoxiny byla optimalizována HPLC separace s gradientovou elucí, po které následuje stanovení pomocí hmotnostního spektrometru v MS/MS módu s využitím APCI ionizace.

SEKCE: Analýza potravin II

KOMISE: Předseda: Prof. Ing. Vladimír Kocourek, CSc.
Členové Dr. Ing. Věra Schulzová
Ing. Jana Kohoutková, Ph.D.

Dynamika tvorby akrylamidu při pražení kávy

Autor: Veronika Bartáčková

Ročník: 5

Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin

Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.

Podobně jako řada tepelně zpracovávaných potravin, tak i pražená káva může obsahovat významné množství akrylamidu. Tato látka, která je považována za lidský karcinogen, vzniká při pražení kávy Mailardovou reakcí z přítomných prekurzorů a její hladiny závisí na odrůdě kávy a stupni pražení.

Akrylamid byl ze vzorku extrahován vodou. Před extrakcí byl ke vzorku přidán vnitřní standard ($^{13}\text{C}_3$)-akrylamid. Pro přečištění hrubého extraktu byly použity SPE kolonky Oasis HLB (0,2 g) a Isolute (0,3 g). Jako analytická koncovka této nově vyvinuté metody byla použita kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS.

Jako hlavní faktory ovlivňující hladiny akrylamidu byly sledovány potenciální prekurzory jeho vzniku obsažené v syrové kávě (zejména asparagin a redukující cukry).

V tomto příspěvku bude diskutován rozdíl mezi dvěma odrůdami kávy Arabica a Robusta praženými při teplotě 230°C po dobu 256-418 s.

Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) v uzeném sýru

Autor: Kateřina Boušová

Ročník: 5.

Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin

Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc., Ing. Marie Jánská

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) reprezentují skupinu všudypřítomných kontaminantů životního prostředí. S ohledem na jejich mutagenní a karcinogenní potenciál je jejich výskytu v potravinách věnována mimořádná pozornost. Rizikem spojeným s dietárním příjmem se také zabývá Scientific Committee on Food (Commission recommendation 2005/108/EC, 4 February 2005), která nedávno stanovila maximální limit pro benzo[a]pyren (B[a]P) pro většinu uzených výrobků na 5 µg/kg (Commission Regulation 208/2005, 4 February 2005).

Vedle znečištění imisemi z životního prostředí, ke kontaminaci potravin PAU může také docházet při některých kulinárních úpravách jakou je grilování, uzení, smažení atd.

Cílem této práce bylo porovnat stupeň kontaminace PAU v uzených sýrech pocházejících z různých udících procesů. K izolaci PAU byla použita Soxhletova extrakce, přečištění získaných extraktů bylo

provedeno pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) a k identifikaci a kvantifikaci cílových PAU byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC/FLD). Zatímco v uzených sýrech pocházejících z moderních komerčních provozoven byly nálezy PAU nízké, a proto by v tomto ohledu neměly představovat pro spotřebitele riziko, ve vzorcích pocházejících z tradiční domácí udirny byly zjištěny až desetinásobně vyšší hladiny uvedených škodlivin.

Perzistentní organické polutanty (POPs) ve svalovině ryb: sledování znečištění vodního ekosystému

Autor: Eva Havlová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.
Konzultant: Ing. Jana Pulkrabová

Mezi významné zástupce perzistentních organických polutantů (POPs) se řadí polychlorované bifenyly (PCB), organochlorované pesticidy (OCP) a bromované retardátory hoření (BFR). Obecně se tyto látky vyznačují relativně vysokou rezistencí vůči degradaci, vysokou lipofilitou a schopností bioakumulace v tukové tkáni živých organismů. Hlavními zdroji kontaminace POPs je dietární příjem. Zdrojem kontaminace BFR jsou vstupy jiné, např. inhalace a dermální příjem.

Cílem naší studie bylo sledovat stupeň znečištění vodního ekosystému ČR indikátorovými kongenery PCB, vybranými OCP (isomery DDT a jeho metabolity, isomery HCH, HCB, OCS), polybromovanými difenylethery (PBDE) a hexabromocyklohexanem (HBCD). Pilotní studie byla realizována ve spolupráci s VÚRH ve Vodňanech. Vzorky ryb byly odloveny na řece Labi „nad“ a „pod“ potenciálními zdroji kontaminace a na řece Vltavě v okolí největší městské aglomerace ČR, tj. Prahy.

Pro izolaci analytů ze vzorků ryb byla použita Soxhletova extrakce. Přechištění získaného extraktu bylo provedeno pomocí gelové permeační chromatografie (GPC). Identifikace a kvantifikace PCB a OCP byla provedena pomocí vysokorozlišovací plynové chromatografie s využitím detektorů elektronového záchytu (GC/ECD), pro PBDE a HBCD byla provedena vysokorozlišovací plynovou chromatografií s hmotnostně selektivní detekcí provozované v módu negativní chemické ionizace (GC-MS/NCI).

Mateřské mléko: bioindikátor pro zhodnocení zátěže populace organohalogenovými kontaminanty

Autor: Eva Hudečková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc.; Ing. Jana Pulkrabová

Polychlorované bifenyly (PCB) a organochlorové pesticidy (OCP) se bioakumulují v potravním řetězci, což je způsobeno jejich lipofilitou a relativně vysokou rezistencí vůči degradaci. Hlavními zdroji kontaminace PCB, OCP a PCDD/F je dietární příjem. Zdrojem kontaminace BFR (bromované retardátory hoření) jsou jiné vstupy např. inhalace a dermální vstup.

Zaměření naší studie bylo určit hladiny hlavních perzistentních organochlorových kontaminantů vyskytujících se v mateřském mléce, které bylo odebráno matkám žijícím v Olomouckém regionu. Byly sledovány indikátorové kongenery PCB (28, 52, 101, 118, 138, 153 a 180) a vybrané OCP jako izomery DDT a jeho metabolity, HCB a izomery HCH. Pilotní studie byla realizována v rámci projektu EU FIRE. Vzorky mléka byly vyšetřeny nejprve na přítomnost PBDE. Byly zhodnoceny trendy (porovnání

s předchozími studiemi), posouzena zátěž matek jednotlivými skupinami a zohledněny další faktory (věk, váha, dietární zvyklosti atd.).

Pro izolaci analytů z mateřského mléka byla použita extrakce kapalina-kapalina. Přečištění získaného extraktu bylo provedeno pomocí gelové permeační chromatografie (GPC). Identifikace a kvantifikace PCB a OCP byla provedena dvourozměrnou vysokorozlišovací plynovou chromatografií s využitím detektoru elektronového záchyty (HRGC/2ECD).

Sledování vlivu kulinárních úprav a skladování na obsah biologicky aktivních látek v rajčatech

Autor: Petra Honzíková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Školitel: Dr. Ing. Věra Schulzová

Rajčata (*Lycopersicon*), patřící mezi lilkovité rostliny (*Solanaceae*), obsahují biologicky aktivní látky, mezi které lze zařadit karotenoidy a glykoalkaloidy. Karotenoidy, β -karoten a lykopen, patří z chemického hlediska do skupiny tetraterpenoidů a jedná se o oligomery isoprenu. Tyto látky mají antioxidační účinky a hrají pozitivní úlohu v lidském organismu. V rajčatech se však také přirozeně vyskytují toxické glykoalkaloidy α -tomatin a dehydrotomatin, odvozené od aglykonu spirosolanu.

Cílem práce bylo sledovat vliv kulinárních úprav a délky skladování (při 4°C) na obsah těchto významných karotenoidů a glykoalkaloidů v rajčatech. Z kulinárních úprav bylo posuzováno vaření, pečení a mikrovlnný ohřev.

Sledována byla distribuce karotenoidů a glykoalkaloidů v jednotlivých částech rajčete, tj. ve slupce, dužnině a zrníčkách. Dále byla studována stabilita standardů β -karotenu a lykopenu a směsi rajčatových extraktů, které byly skladovány ve vialkách v mrazáku (-18°C), lednici (4°C) a při laboratorní teplotě. Lykopen a β -karoten byly stanoveny metodou kapalinové chromatografie s UV detekcí (HPLC/UV), glykoalkaloidy metodou kapalinové chromatografie s MS detekcí (LC-MS/MS).

Produkce sekundárních metabolitů vláknitých hub rodu *Fusarium*

Autor: Alexandra Krplová
Ročník: IV.
Ústav: ÚCHAP
Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc., Ing. Kateřina Lancová

Mykotoxiny, sekundární metabolity mikroskopických vláknitých hub, mohou kontaminovat široké spektrum potravin a krmiv. Nejvýznamnější producenti těchto toxických látek jsou vláknité houby rodu *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium*. Mykotoxiny se dostávají do potravního řetězce zvířat i lidí, tím mohou způsobovat onemocnění souhrnně nazývaná mykotoxikózy. K nejvíce sledovaným mykotoxinům vyskytujících se v plodinách pěstovaných v klimatických podmínkách mírného pásma patří fusariové mykotoxiny. Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou trichotheceny - deoxynivalenol, nivalenol, T-2 a HT-2 toxiny a dále estrogen zearalenon. Jejich koncentrace v napadené plodině a relativní zastoupení je dáno typem producenta a jeho virulencí. Právě na hodnocení tohoto aspektu se zaměřila předkládaná práce.

Vyšetřeny byly vzorky kultur, které byly naočkovány nejvýznamnějšími druhy mikroskopických vláknitých hub rodu *Fusarium* (*F. poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sporotrichioides*, a *F. equiseti*)

získanými z banky mikroorganismů ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby (VÚRV Praha), na obsah trichothecenových mykotoxinů a zearalenonu.

Dále byl zjišťován výskyt a obsah jednotlivých trichothecenů v uměle infikovaných rostlinách ječmene a kukuřice. Naklíčené obilky byly naočkovány třemi nejběžnějšími druhy rodu *Fusarium* – *F. graminearum*, *F. culmorum* a *F. poae*.

Využití pasivních vzorkovačů pro monitoring znečištění ovzduší organohalogenovanými kontaminanty

Autor: Michaela Nápravníková
Ročník: 4.
Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin
Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc., Ing. Jana Pulkrabová

Organohalogenované uhlovodíky, jsou nedílnou součástí životního prostředí jako důsledek antropogenních aktivit. Tyto látky jsou značně perzistentní díky své lipofilitě a relativně vysoké odolnosti vůči biodegradaci. Významnými reprezentanty těchto kontaminantů jsou polychlorované bifenylly (PCB), organochlorové pesticidy (OCP) či v posledních letech intenzivně sledované bromované retardátory hoření (BFR). Zatímco v případě PCB a OCP je pro člověka nejvýznamnějším zdrojem expozice dieta, v případě BFR je to navíc i inhalace kontaminovaných prachových částic.

Hlavním cílem této studie bylo zjistit stupeň kontaminace ovzduší v různých lokalitách ČR a otestovat možnosti analýzy vzorků z pasivních vzorkovačů (PUF-polyuretanové filtry), které byly pro tento účel použity. V rámci validace metody byla testována různá délka extrakce ve vztahu k výtěžnosti analytů a posuzována opakovatelnost použitého postupu.

Pro izolaci analytů byla použita extrakce dle Soxhleta. Získaný extrakt byl přečištěn pomocí gelové permeační chromatografie (GPC). Identifikace a kvantifikace PCB a OCP byla provedena vysokorozlišovací plynovou chromatografií se dvěma paralelními detektory elektronového záchytu (HRGC/2ECD). Pro BFR byla použita technika plynové chromatografie s hmotnostně selektivním detektorem využívajícím negativní chemickou ionizaci (GC/MS-NCI).

Distribuce fusariových mykotoxinů v zru pšenice

Autor: Kateřina Součková
Ročník: 5.
Ústav: Chemie a analýzy potravin
Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc., Ing. Kateřina Lancová

V poslední době vzrůstá zájem o informace o zdravotní nezávadnosti potravin. Řada potravin a krmiv podléhá napadení mikroskopickými houbami, které mohou za přítomných podmínek produkovat velmi toxické často chemicky stabilní sekundární metabolity, souhrnně nazývané mykotoxiny. Tyto přírodní toxiny mohou vyvolat řadu onemocnění jak u zvířat tak člověka. Jednou z klíčových otázek je distribuce zmíněných toxinů v zru obilovin a následně jejich přechod do jednotlivých frakcí při zpracování.

V rámci projektu NAZV byla realizována studie zaměřená na tuto problematiku. Frakce získané při mletí byly vyšetřeny na obsah 7 trichothecenových mykotoxinů (nivalenol, deoxynivalenol, fusarenol, HT-2-toxin, T-2 toxin, 3-acetyldeoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol). Zjištěné výsledky ukazují kumulaci fusariových mykotoxinů především do obalových částí zru. Pro zajištění kontroly získaných dat byl připraven referenční materiál.

Sledování výskytu mykotoxinů v obilovinách při pěstování různými technologiemi

Autor: Milena Zachariášová

Ročník: 5.

Ústav: Ústav chemie a analýzy potravin

Školitel: Prof. Ing. Jana Hajšlová CSc., Ing. Monika Gocieková

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity některých mikroskopických vláknitých hub. Mohou způsobovat onemocnění souhrnně nazývaná mykotoxikózy a jsou také častou příčinou vysokých ekonomických ztrát v zemědělství. Zájmem výzkumných pracovišť je objasnění vlivu klimatických a technologických podmínek na napadení obilovin mikroskopickými vláknitými houbami rodu *Fusarium* a následné produkci mykotoxinů.

Ve spolupráci se Zemědělským výzkumným ústavem Kroměříž (ZVÚ) byla realizována studie zaměřená na zhodnocení vlivů různých technologií pěstování (orba, podmítka, předplodina aj.) na obsah fusariových mykotoxinů v obilovinách.

Vzorky obilovin byly analyzovány nově vyvinutou a validovanou metodou LC-MS/MS (extrakce směsí acetonitril:voda, přečištění extraktu na SPE kolonách MycoSep 226, kvantifikace pomocí LC-MS/MS).

Pro ověření správnosti metody byly vybrané vzorky také analyzovány akreditovanou metodou KM 25 validovanou na Ústavu chemie a analýzy potravin (extrakce směsí acetonitril:voda, přečištění extraktu na SPE kolonách MycoSep 225, derivatizace trifluoracetanhydridem, kvantifikace pomocí GC/ECD).

SEKCE: Technologie zpracování potravin

KOMISE: Předseda: Doc. Ing. Miroslav Marek CSc.
Členové Doc. Ing. František Kvasnička CSc.
Ing. Kamila Klaudivová PhD.
Dr. Ing. Jana Chumchalová
Ing. Iveta Fabíková
Ing. Aleš Rajchl

Doplňky stravy pro sportovce

Autor: Bartoš Zdeněk
Ročník: 5.
Ústav: Konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Doc. Ing. František Kvasnička

Práce je zaměřena na problematiku bezpečnosti doplňků stravy pro sportovce zejména využívané v oblasti silových sportů jako jsou vzpírání, kulturistika a podobné. Cílem práce je zhodnotit vybrané markery (kreatin, karnitin, kofein, taurin, aj.) jako důležité součásti sportovních doplňků z hlediska kladného i záporného působení na sportovce. Část práce je věnována analytickým metodám stanovení vybraných markerů.

Měření antioxidační kapacity různých odrůd brambor

Autor: Buriánková Martina
Ročník: 5.
Ústav: Konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Ing. Rudolf Ševčík

Přírodní antioxidanty jsou různorodé látky přírodní povahy. Mají schopnost eliminovat negativní účinky volných radikálů, které jsou u člověka dávány do souvislosti se stárnutím a vznikem různých onemocnění (kardiovaskulárních a nádorových). Mezi ně patří v první řadě vitamín E, vitamín C, některé karotenoidy a flavonoidy. Dále to pak jsou enzymy, které mají schopnost volné radikály rozkládat. Ke svému působení potřebují tzv. kofaktory (riboflavin a niacin). Pokud má organismus dostatek potřebných látek, lze předpokládat, že antioxidační ochranný systém bude eliminovat nežádoucí přebytečné volné radikály. Antioxidanty se vzájemně ve svých účincích doplňují, a proto je důležité přijímat pestrou a vyváženou stravu. Cílem práce bylo posoudit antioxidační kapacitu 13 různých odrůd brambor s odlišně zbarvenou dužninou (modrou, červenou, bílou a žlutou). K měření antioxidační kapacity byly použity metody založené na zhášení volných radikálů (komerční set RANDOX a metoda DPPH).

Příprava bioaktivních a biodegradovatelných obalů

Autor: Sandra Cirmaciová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Doc. Ing. Miroslav Marek, CSc.
Konzultant: Ing. Hana Smítková

Cílem práce je připravit bioaktivní a biodegradovatelný obal na bázi škrobu, který by splňoval požadavky kladené na moderní obalové materiály (odolnost vůči vodě a jiným nepříznivým fyzikálním vlivům, ochrana výrobku proti mechanickému i mikrobiálnímu poškození).

K základnímu škrobovému obalu byla přidávána různá hmotnostní procenta otrub a jiných aditiv (stearan vápenatý, kaolin) a bylo zkoumáno, jak se změní vlastnosti vzniklého obalu. Na základě měření fyzikálních vlastností (sorpce vzdušné vlhkosti, nasákavost při přímém kontaktu s vodou, mechanická odolnost) byl zvolen poměr škrobu a otrub a takto vybraný materiál byl potažen tenkou vrstvou 30% Kombilaku L1917 a opět studován z hlediska jeho funkčních vlastností. Do povrchové vrstvy vybraných vzorků bylo také imobilizováno 5 hm% kyseliny benzoové – v potravinářské praxi běžně používaného konzervačního činidla.

S ohledem na skutečnost, že povrchová úprava přírodních polymerů byla prováděna syntetickým polymerem s imobilizovaným antimikrobiálním činidlem, byla ověřována biologická odbouratelnost takto upravených obalů pomocí směsné kultury mikroorganismů (používané pod názvem ASANOL) obsahující rody *Acinetobacter* a *Klebsiella*.

Sledování účinku dezinfekčních prostředků na biofilm *Asaia bogorensis* v průtočných systémech

Autor: Zdeňka Dupáková
Ročník: 5.
Ústav: Konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Dr. Ing. Miroslav Čeřovský, Ing. Petra Sedláčková

Biofilm představuje biologicky aktivní matrix bakteriálních buněk, zachycených na pevném nosiči pomocí extracelulárních polymerních látek (EPS). Buňky vázané ve složité struktuře biofilmu vykazují vyšší rezistenci k sanitačnímu ošetření než buňky žijící volně v suspenzi. Dosud byla účinnost sanitačních prostředků testována zpravidla na suspenzích mikroorganismů. Tato studie se zabývá adhezí bakteriálních buněk a tvorbou biofilmu za dynamických podmínek, při nichž byla následně testována účinnost sanitačních prostředků.

Cílem práce je testování účinnosti sanitačních prostředků na buňky *Asaia bogorensis* adherované na pevné nosiče (nerezová ocel, polyethylen) za dynamických podmínek, které lépe simulují reálnou tvorbu biofilmu v provozních podmínkách. Účinnost sanitačního postupu je vyhodnocena metodou stěru ošetřené plochy s následnou mikrobiologickou kultivací.

Uplatňování požadavků norem GFSI ve výrobě potravin

Autor: Gebauerová Šárka
Ročník: 5.
Ústav: Konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Doc. Ing. Michal Voldřich, CSc.

V posledních letech existuje stále silnější nátlak distribučních řetězců na dodavatele potravinářských výrobků v oblasti zavádění standardů jakosti a bezpečnosti ve výrobě potravin. Některé řetězce používají vytvořily vlastní standardy, vývoj však všeobecně směřuje k zavádění požadavků mezinárodních standardů schválených v rámci Global Food Safety Initiative: IFS, BRC, SQF, The Dutch HACCP. Práce se věnuje uplatňování požadavků International Food Standard v podmínkách konkrétní potravinářské společnosti. Jsou diskutována řešení některých prvků systému řízení jakosti a bezpečnosti potravin jako jsou HACCP, systém sledovatelnosti, řízení neshodného výrobku, specifikace výrobků a primárních materiálů a specifické požadavky na manipulaci s výrobky.

Změny aktivity enzymů a obsahu fenolických látek u jablek po napadení Monilii fructigenou

Autor: Guřanová Dana
Ročník: 5.
Ústav: Konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Ing. Jana Schováňková

Cílem práce bylo sledování obranné reakce jablek po napadení významným patogenem ovoce Monilií fructigenou. Byly sledovány změny aktivity enzymů polyfenoloxidas, katalasy, fenylalanin-amoniumlyasy a stanoveny celkové fenoly a antioxidační kapacita u dvou odrůd jablek – Angold a Golden Delicious.

Obě odrůdy byly naočkovány plísní Monilia fructigena a změny zvolených parametrů byly sledovány jak ve zdravých, tak i v napadených částech plodů a porovnány s čerstvými nenačkovanými plody. Změny byly měřeny jeden a dva týdny po inokulaci.

Aktivita sledovaných enzymů i obsah fenolických látek se ve zdravých částech napadených plodů první týden po naočkování nejprve zvyšovaly, což souvisí s obrannými mechanismy jablek, po dvou týdnech však již klesaly. V napadených částech plodů se hodnoty postupně snižovaly.

Golden Delicious a zejména Angold jsou odrůdy s velkou antioxidační kapacitou, což je způsobeno vysokým obsahem fenolů a vysokou aktivitou katalasy. Po naočkování se antioxidační kapacita a obranné schopnosti pletiva v napadené části plodů snižovala.

Odrůda Angold více podléhala změnám způsobených inokulací a infekce se rychleji šířila; po 2 týdnech už u této odrůdy nezůstala žádná zdravá část. Golden Delicious se projevil jako odolnější, a tedy i vhodnější pro dlouhodobé skladování.

Aktivita polyfenoloxidas a enzymové hnědnutí ovoce

Autor: Heřmanová Markéta
Ročník: 4.
Ústav: Konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Ing. Hana Opatová CSc.

Enzymy s fenoloxidasovou aktivitou jsou v rostlinách široce zastoupeny. Z hlediska technologického je zejména u ovoce a zeleniny jejich aktivita nežádoucí, neboť tmavnutí pletiv zhoršuje sensorickou kvalitu plodin a má tedy i dopad ekonomický. Z hlediska fyziologického hrají pozitivní roli např. v obranných reakcích pletiv. Aktivita polyfenoloxidas a koncentrace fenolů, které jsou substrátem pro reakce enzymového tmavnutí, se liší podle druhu a odrůd ovoce a mění se rovněž během zrání a skladování. Studium různých odrůd jablek si klade za cíl jednak určit, které odrůdy podléhají enzymovému hnědnutí více a které méně a dále zjistit, zda existuje přímá korelace mezi množstvím fenolových látek v plodu a aktivitou enzymů.

Hodnocení účinnosti sanitačního zákroku při odstraňování alergeních bílkovin arašídů

Autor: Kateřina Hončíková
Ročník: 5.
Ústav: Konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Ing. Jan Pivoňka

Odhaduje se, že asi 5 % dětí a 2 % dospělých trpí alergiemi na potraviny. Nejčastěji se potravinová alergie vyskytuje u kojenců a malých dětí, se vzrůstajícím věkem se její výskyt snižuje. Alergie dětí na vejce a kravské mléko se obvykle s věkem vytrácí, avšak alergie na ořechy, luštěniny, ryby a korýše zůstává. Z těchto důvodů je žádoucí garantovat spotřebiteli, že určité potraviny alergeny neobsahují. Během výrobního procesu může docházet ke kontaminaci alergenů křížovou kontaminací, která může mít za následek výskyt neočekávaných alergických reakcí po konzumaci potravin, které by daný alergen neměly obsahovat. Jedna z možností jak omezit náhodnou kontaminaci alergenů je sledování postupů při čištění výrobních zařízení, ve kterých se s alergeny zachází.

V této práci byly ověřovány různé sanitační postupy a jejich účinnost při odstraňování alergenních bílkovin arašídů z různých povrchů. Obsah alergenů byl detekován za pomoci sandwichové ELISA metody v oplachových vodách po použití sanitačních prostředků pracujících na různé bázi.

Antimikrobiální vlastnosti kyseliny palmitové

Autor: Janšová Jitka
Ročník: 5.
Ústav: Mléka a technologie tuků
Školitel: Prof. Ing. Jan Šmidrkal

Stanovovaly se antimikrobiální vlastnosti mastných kyselin a jejich derivátů (monoacylglycerolů, esterů sacharosy a esterů glukosy). Konkrétně šlo o kyseliny C10 – C15. U všech těchto látek bylo pozorováno jejich působení při pěti různých koncentracích (0,8 mmol/l, 0,4 mmol/l, 0,2 mmol/l, 0,1 mmol/l a 0,05 mmol/l). Bylo pozorováno jejich působení na následující mikroorganismy: kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, a bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. U bakterií *Pseudomonas aeruginosa* bylo sledováno působení výše zmíněných sloučenin v součinnosti s konstantní koncentrací chelatonu 3. Sledování vlivu přítomnosti mastných kyselin a jejich derivátů na mikroorganismy probíhalo po dobu 10 dní.

Biogenní aminy ve fermentovaných potravinách

Autor: Jana Šťávková
Ročník: 5.
Ústav: Konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Doc. Ing. František Kvasnička

Biogenní aminy jsou dusíkaté látky, nezbytné složky živých buněk. Nejdůležitějšími biogenními aminy vyskytující se v potravinách jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermin, sperimidin a fenylalanin. Jejich vysoký obsah se často nachází v fermentovaných potravinách, jejichž surový materiál obsahuje velké množství proteinů. Vysoký obsah biogenních aminů v potravinách je často považován jako důsledek mikrobiální aktivity a často také spojován s obavami, ze zkažení potravin nebo její bezpečnosti. Alkoholické nápoje, jako je pivo a víno, fermentované sýry, zelenina, ryby a masné výrobky jsou pak častými zdroji biogenních aminů. Vybrané výrobky byly podrobeny analýze a budou experimentálně diskutovány.

Sledování stability jogurtové kultury a *Bifidobacterium bifidum* CCDM94 v sójových fermentovaných výrobcích v průběhu skladování

Autor: Eva Šůchová
Ročník: V.
Ústav: Ústav technologie mléka a tuků
Školitel: Dr. Ing. Jana Chumchalová

Výrobky s jogurtovými a probiotickými kulturami obecně patří mezi potraviny s kladnými účinky na lidský organismus. Proto je důležité, aby buňky obou kultur přežily nepříznivé podmínky skladování v co nejvyšším počtu až do chvíle konzumace výrobku.

V této práci byla sledována stabilita jogurtové a probiotické kultury *Bifidobacterium bifidum* CCDM94 v sestaveném sójovém médiu v týdenních intervalech po dobu čtyř týdnů. Kultury byly zaočkovány a kultivovány odděleně za příslušných kultivačních podmínek v sójovém médiu stejného složení. Po dokončení fermentace byla média smíchána v různých poměrech a skladována po dobu čtyř týdnů při teplotě 4 °C.

Výsledkem zkoumání bylo zjištění, že kultury jsou vhodné pro přípravu fermentovaného sójového výrobku daného složení. Počty *B. bifidum* CCDM94 se po kultivaci a v průběhu skladování stabilně udržely na průměrné hodnotě v řádu 10^8 JTK·g⁻¹, která odpovídá terapeutickým požadavkům pro fermentované výrobky s probiotickou kulturou. U laktobacilů klesly počty v průběhu skladování o půl až dva řády, konečné hodnoty se pohybovaly v rozmezí řádu 10^4 - 10^6 JTK·g⁻¹. U streptokoků se stabilně udržely počty vyšší než 10^7 JTK·g⁻¹.

Využití technologie Flash MX 2004 pro výuku na VŠCHT

Jméno: Vávra Filip
Ročník: 5.
Pracoviště: Ústav konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Ing. Lenka Votavová, Ph.D.

Práce je dalším pokračováním projektu na vytvoření výukové aplikace, nahrazující tištěná skripta. Popisuje metody vytváření, porovnává možnosti různého softwaru, používaného pro studijní účely a dokládá výhody užívání v rámci interní sítě VŠCHT. Ukazuje také možnosti využití nových technologií ve výuce na VŠCHT zítřka.

SEKCE: Bioanalytické metody

KOMISE: Předseda: Doc. Ing. Fukal Ladislav, CSc.
 Členové Doc. RNDr. Pazlarová Jarmila, CSc.
 RNDr. Zídková Jarmila, CSc.
 Ing. Hochel Igor

Imunochemické stanovenie 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosteronu (7 α -OH-DHEA) metódou ELISA

Autor: Marián Bendík
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školiteľ: Doc. Ladislav Fukal CSc.

Dehydroepiandrosteron (DHEA) je neurosteroidný hormón. V ľudskom sére sa jeho koncentrácia pohybuje v $\mu\text{g/ml}$, avšak mechanizmus účinku nie je zatiaľ známy. Sú zodpovedné 7-hydroxylované metabolity DHEA za neuroprotektívny účinok DHEA?

Na stanovenie 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosteronu (7 α -OH-DHEA) bola vyvinutá nepriama kompetitívna ELISA so spektrofotometrickou detekciou. Použili sa 2 sady králičích polyklonálnych protilátok proti 19-O-(carboxymethyl)-oxim hovädzí sérový albumín (BSA). Zlepšenie parametrov sigmoidy bolo dosiahnuté výberom najvhodnejšej koncentrácie protilátky, poťahovaného konjugátu, doby inkubácie, sýtenia doštičky. Kalibračnú závislosť sa nepodarilo vytvoriť u konjugátu s BSA, a preto sa nasyntetizoval nový konjugát 19-O-(carboxymethyl)-oxim ovalbumín. Detekčný limit metódy je 0,21 ng/ml, čo je postačujúce na stanovenie v ľudskom sére.

Vliv supplementu na stanovení listerií

Autor: Kateřina Cinková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školiteľ: Ing. Barbora Holubová, PhD., Ing. Martina Blažková

Rod *Listeria* je v prírode hojně rozšířený, ale jen *Listeria monocytogenes* je potvrzeným patogenem lidí. Konzumace kontaminovaných potravin způsobuje závažné onemocnění, listeriosu, která postihuje zejména lidi se sníženou imunitou a vyznačuje se až 30% mortalitou. Proto je věnována velká pozornost kontrole výskytu *Listeria monocytogenes*. Současná normativní metoda je pracná a časově náročná. Identifikace listerií v reálném vzorku trvá 5-6 dní. Na základě toho je kladen velký důraz na vyvinutí imunochemických a genetických metod, které se vyznačují svojí rychlostí, jednoduchostí a schopností zpracovat velké množství vzorků najednou.

V naší laboratoři byla vyvinuta nepřímá kompetitivní ELISA metoda se spektrofotometrickou detekcí pro stanovení rodu *Listeria* spp. a druhu *Listeria monocytogenes* v modelových podmínkách. Cílem této práce je snaha aplikovat vyvinutou metodu na reálné vzorky. Pro přechod na reálné vzorky je důležité testování vlivu suplementu na růst bakterií rodu *Listeria* spp. a na citlivost detekce ELISA metodou. Ze získaných výsledků vyplývá, že suplement má poměrně významný vliv na stanovení listerií, hlavně při nízkých vstupních koncentracích bakterií.

Srovnání metod immunodot a elisa pro detekci sérologických markerů celiakie

Autor: Jitka Hlavatá
Ročník: 5.
Ústav: Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1.LF UK a VFN,
Školitel: MuDr. Petr Kocna, CSc.

Cílem studie je porovnání dvou technologií detekce sérologických markerů celiakie, rutinní laboratorní metody a testu ImmunoDot. Stanoveny byly protilátky proti gliadinu (AGA-IgA, IgG) a proti tkáňové transglutaminase (atTG-IgA, IgG) metodou ELISA na mikrotitračních destičkách a metodou ImmunoDot. Vyhodnoceno bylo 48 nemocných ve třech kategoriích hodnot.

V případě negativní a vysoce pozitivní atTG-IgA se obě techniky shodly ve 100%. Hodnoty atTG-IgA lehce nad hranicí cut-off 10-20U/ml (n=30) byly vyhodnoceny metodou ImmunoDot v 53,3% pozitivně a v 46,7% negativně.

Hodnoty atTG-IgG získané metodou ImmunoDot mnohem lépe odpovídaly ostatním markerům, a to v celém spektru. U obou pacientů, kteří měli velmi nízkou hodnotu atTG-IgA a velmi vysokou hodnotu AGA-IgG, byly shodně stanoveny vysoké hodnoty i pro atTG-IgG narozdíl od rutinních testů.

Stanovení AGA-IgA a AGA-IgG se liší celkově ve 18,7% případů. Důvodem je pravděpodobně zvolený antigen - gliadin, rutinně používaná metoda pracuje s purifikovaným α -gliadinem. Srovnáním vizuálního hodnocení proužků ImmunoDot a jejich softwarového hodnocení jsme dospěli pouze k 13% rozporů, ve většině případů byl negativní výsledek vizuálně chybně určen jako pozitivní. Metoda ImmunoDot je vhodná pro laboratoře s menšími počty vzorků, nevyžaduje speciální vybavení laboratoře.

Identifikace proteinových pojiv v obrazech E. Muncha pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Autor: Štěpánka Kučková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. RNDr. Milan Kodíček, CSc.

Bílkovinná pojiva stmelují syké pigmenty v některých barevných vrstvách uměleckých děl, kde jsou však zastoupena pouze asi deseti hmotnostními procenty, přičemž zbytek tvoří anorganické pigmenty nebo organická barviva. V této práci se zabýváme identifikací proteinových pojiv, např. žloutku, bílku, eventuálně obou, kaseinu, želatiny a několika druhů klišů. Určení pojiva je velmi důležité pro správnou volbu postupu restaurování obrazů, zjištění techniky malby, autentikaci, atd. Identifikace pojiv byla až do nedávné doby velmi obtížná a často i nespolehlivá – nejčastěji se prováděla sledováním četnosti jednotlivých aminokyselin po kyselé hydrolýze na HPLC nebo po derivatizaci plynovou chromatografií.

Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, která byla pro tento účel poprvé použita v naší laboratoři, oproti těmto metodám pracuje s peptidovými fragmenty vzniklými po specifickém štěpení trypsinem. Díky vyšší spolehlivosti se tak může spotřeba cenného vzorku pohybovat jen kolem 0,5 µg. V této práci byla MALDI-TOF MS použita k identifikaci proteinových pojiv ve dvou obrazech norského malíře Edvarda Muncha (Odloučení a Portrét Friedricha Nietzscheho), kde byla předpokládána přítomnost kaseinové tempery na základě zvýšeného množství fosforu. Naše metodika však jednoznačně prokázala, že v obrazech byla použita vaječná tempera; zvýšený obsah fosforu byl způsoben přítomností fosforečnanu hlinitého, který byl následně zjištěn práškovou rentgenovou mikrodifrací.

Vyšetření methylace DNA genu pro α -Galaktosidasu A u žen s Fabryho chorobou

Autor: Jakub Minks
Ročník: 4.
Ústav: Ústav dědičných metabolických poruch, 1. LF UK
Školitel: MUDr. Ivan Šebesta, CSc.; MUDr. Martin Hřebíček

U žen (XX) je dvojnásobný počet pohlavních chromosomů X oproti mužům (XY) kompenzován inaktivací jednoho z X chromosomů. Preferenční inaktivace chromosomu nesoucího kopii genu bez mutace může u přenašeček gonozomálně recesivních onemocnění vést k závažnému průběhu choroby. Jedním ze znaků neaktivního X chromosomu je methylace cytosinů v CpG ostrovech. Rozlišení methylovaných (5mC) a nemethylovaných (C) cytosinů lze dosáhnout bisulfitovým sekvenováním (C se na rozdíl od 5mC působením bisulfitu deaminují na uracily).

Cílem naší práce je zavedení této metody pro zkoumání vlivu epigenetických modifikací DNA na tíži onemocnění u pacientek s dědičnými metabolickými poruchami. V pilotním projektu se zabýváme methylací CpG dinukleotidů v oblasti promotoru a prvního exonu genu pro lidskou α -Galaktosidasu A (EC 3.2.1.22), jejíž deficit je příčinou Fabryho choroby. Použili jsme dva různé přístupy ke kvantifikaci poměru 5mC/C: přímé sekvenování PCR produktu a analýzu jednotlivých molekul DNA ze zaklonovaných PCR produktů. Druhý postup je snáze optimalizovatelný a poskytuje data na úrovni jedné molekuly DNA, je však časově i finančně náročnější. U vyšetřených žen přibližně polovina sekvenovaných klonů nebyla methylována vůbec, methylované klony jeví vysokou variabilitu v poloze jednotlivých 5mCpG. Jejich funkce je předmětem dalšího výzkumu.

Příprava kmenů *E. coli* vhodných pro screening glykosidasových aktivit

Autor: Linda Paulová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof., Ing. Blanka Králová, CSc., Ing. Petra Lipovová, Phd

Glykosidasy jsou enzymy patřící do třídy hydrolas, které za fyziologických podmínek štěpí glykosidické vazby. Při změně reakčních podmínek jsou některé glykosidasy schopny katalyzovat transglykosylační reakce, během kterých vznikají příslušné oligosacharidy nebo různé glykokonjugáty. Tyto látky hrají důležitou úlohu v řadě fyziologických procesů, proto mají široké uplatnění hlavně ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. V poslední době jsou předmětem zkoumání i chladově aktivní glykosidasy a

jejich schopnost katalyzovat transglykosylační reakce, neboť jejich užití by mohlo usnadnit syntézu termolabilních glykokonjugátů.

Úkolem této práce je připravit buňky *E.coli* kmene DH5 α bez α -glukosidasové nebo α -galaktosidasové aktivity, které by mohly být použity pro vyhledávání genů kódujících odpovídající glykosidasy. "Knock out" příslušných genů je prováděn pomocí konstruktů (pUCR6K1, pUCR6K2) nesoucích počátek replikace R6K γ a úseky strukturálních genů spolu s kanamycinovou rezistencí. K přerušení genů dochází metodou homologní rekombinace, která spočívá ve schopnosti buněk začlenit cizí DNA do vlastní chromozomální DNA v místech, jež vykazují sekvenční homologii. Následně bude v takto upravených kmenech připravena genová knihovna z psychrotrofního mikroorganismu *Arthrobacter* sp. C2-2 s cílem nalézt geny vybraných chladově aktivních glykosidas.

Charakterizace a genotypová analýza izolátu *Campylobacter* spp. z drůbeže v České Republice

Autor: Sabina Purkrťová
Ročník: 4.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Doc. RNDr. Jarmila Pazlarova CSc.

Druhým nejčastějším potravním patogenem způsobujícím průjemová onemocnění se stal v posledních letech *Campylobacter* spp. Nejčastějším způsobem nákazy je křížová kontaminace připraveného pokrmu s tepelně neopracovaným syrovým masem. Teplokrevní ptáci zvláště pak drůbež jsou přirozenými rezervoary této bakterie. Tato práce představuje šestnáct kmenů *Campylobacter* spp. izolovaných z drůbeže, které byly klasifikovány pomocí standardní normativní metody (ISO) a pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR). Standardní normovaná metoda zahrnuje stanovení citlivosti na kyselinu nalidixovou a cefalotin a dále hydrolyzu hippurátu pro odlišení *C. jejuni* a *C. coli*. Tato metodika trvá minimálně 4 dny. Pomocí PCR bylo určeno příslušenství kmenu k termotolerantnímu rodu *Campylobacter* spp. založené na amplifikaci specifického úseku 16S DNA. Dále byly pomocí PCR odlišeny druhy *C. jejuni* a *C. coli*. Pro genotypovou analýzu se často používá rozdělení rozptýlené repetitivní DNA sekvence v genomu řady bakterií (enterobacterial repetitive intergenic consensus [ERIC]). Toto rozdělení bylo zjišťováno použitím primerů komplementárních k ERIC sekvenci a PCR. Soubor výsledných PCR produktů byl analyzován na agarosovém gelu. Genotypová analýza všech kmenů byla porovnána z hlediska geografických oblastí vyskytu izolátu a z hlediska časového období odebrání izolátu.

Vývoj imunochromatografického stanovení listerií

Autor: Štěpánka Řežábková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Ing. Barbora Holubová, PhD.

Listeria monocytogenes je jedním z nejobávanějších patogenů v potravinářském průmyslu. Listeriosa – nemoc vyvolaná touto bakterií je pro svou vysokou mortalitu považována za jedno z nejtěžších alimentárních onemocnění. Výskyt několika epidemií v 70. letech si vyžádal rychlé testování *Listeria monocytogenes* především v masném a mlékařenském průmyslu.

Lateral flow immunoassay (LFIA) je semikvantitativní metoda prováděná v jednom kroku. Je založena na principu imunochromatografie. Testovaný vzorek tvoří komplex s konjugátem (protilátka vázaná na barevnou částici) a migruje porézní vrstvou nitrocelulosoové membrány. Díky kapilárním silám vzlíná až k testovací zóně, kde vytváří vazbu s protilátkou imobilizovanou na membráně. Vizuální hodnocení je umožněno koloidní uhlíkatou částicí. Výhodou LFIA je rychlost, jednoduchost a nenáročné přístrojové vybavení umožňující realizaci testu v provozních podmínkách.

V naší laboratoři hledáme optimální podmínky pro detekci listerií touto metodou. Zabýváme se především odlišením pro člověka patogenní *Listeria monocytogenes* od ostatních druhů listerií a podobných bakterií. Cílem je zejména potvrzení specifity jednotlivých protilátek a odstranění nespecifických sorpcí volbou vhodných pufrů a přísad.

Konstrukce a charakterisace mikrobiálního biosensoru pro snadnou detekci Hg

Autor: Pavel Vopálenský
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Ing. Pavel Kotrba PhD.

Stanovení biodostupných těžkých kovů je obtížně proveditelné s použitím klasických analytických metod. Proto je v současné době konstruována řada buněčných biosensorů založených na genetické fusi striktně regulovaných promotorů systémů vyvinutých organismy pro detoxikaci těžkých kovů a vhodného reporterového genu. Fuse regulační oblasti (*merR-P_{mer}*) *mer* operonu, jenž zodpovídá za resistenci bakterií k sloučeninám rtuti, s různými reportérovými geny (*lacZ*, *gfp*, *lucFF*, *luxCDABE*) v bakteriálních buňkách umožňuje kolorimetrické, fluorescenční nebo luminiscenční stanovení obsahu Hg²⁺. Biosensor, který by umožňoval stanovení Hg²⁺ prostým sledováním růstu buněk, v kterých přítomnost Hg²⁺ spíná expresi genu, jenž buňkám přináší v daných podmínkách fyziologickou výhodu a umožňuje tak jejich růst (monitorovaný jako OD_{590nm}), by poskytoval jednodušší, široce dostupnou a levnější alternativu k výše uvedeným metodám. Jedním z přístupů, testovaných v této práci, bylo vytvoření fuse *merR-P_{mer}* s genem *npt* kódujícím resistenci ke Km. Buňky *E. coli* TG1 nesoucí tuto fusi vykazovaly v přítomnosti kanamycinu lineární závislost růstu na koncentraci Hg v rozmezí 10 - 100 nmol.l⁻¹. Biosensor neodpovídal na přítomnost samotného Cd²⁺, Cu²⁺ a Zn²⁺, zvýšená indukce kanamycinové resistance byla patrná pouze při současném přísadku 50 nM Hg²⁺ a Cd²⁺ od 50 nmol.l⁻¹. Dalším cílem je stanovení Hg v reálných vzorcích a zkoumání vlivu Cd na regulátor MerR.

SEKCE: Enzymologie

KOMISE: Předseda: Prof. RNDr. Kodíček Milan, CSc.
Členové Dr. Ing. Novotná Zuzana
Ing. Knejzlík Zdeněk, PhD.
Ing. Lipovová Petra, PhD.

α -D-Galaktosidasa z *Talaromyces flavus* CCF 2686, její produkce a vlastnosti

Autor: Ivana Čechová
Ročník: 5.
Ústav : Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Doc. Dr. Ing. Martina Macková; Doc. Ing. Vladimír Křen, DrSc

Mikrobiální glykosidasy mohou být využity jak při hydrolýze, tak syntéze glykosidických vazeb. Enzymová glykosylace je vhodnou alternativou chemické syntézy a nachází praktické uplatnění v oblasti biochemie, medicíny i průmyslu. Tato práce je součástí projektu zabývajícího se produkcí fungálních glykosidas, jejich charakterizací a použitím při syntéze glykosidů.

α -D-Galaktosidasa z *Talaromyces flavus* CCF 2686 (EC 3.2.1.22) je extracelulární indukovatelný enzym. Byla testována řada běžných induktorů fungálních α -D-galaktosidas (např. D-galaktosa, rafinosa, melibiosa), jediným vhodným induktorem pro tento enzym je 6-deoxy-D-glukosa. Jedinečnost α -D-galaktosidasy z *T. flavus* CCF 2686 spočívá především v její schopnosti akceptovat stéricky bráněné alkoholy (např. *tert*-butylalkohol). U purifikované α -D-galaktosidasy z *T. flavus* byla stanovena substrátová specifita vůči různým substrátům (např. melibiosa, maltosa, stachyosa, methyl- α -D-galaktopyranosid) a bylo zjištěno, že enzym vykazuje specifitu vůči vyšším oligosacharidům (rafinosa, stachyosa). Dále je sledována schopnost enzymu degalaktosylovat polymerní substráty, se záměrem najít souvislost mezi strukturou syntetických a přirozených substrátů tohoto enzymu. Inhibice α -D-galaktosidasy byla sledována v přítomnosti D-galaktosy, α -D-galaktopyranosylazidu a několika dalších látek.

Úloha fosfolipasy D při rozvoji získané systemické resistance u *Arabidopsis thaliana*

Autor: Matyáš Flemr
Ročník: 4.
Ústav: Ústav Biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. RNDr. Olga Valentová, Csc.

Produkty štěpení membránových fosfolipidů plní funkci sekundárních posílů v mnoha signálních drahách. Enzymy z rodiny fosfolipas, které toto štěpení katalysují, se proto v poslední době stále častěji stávají

předmětem výzkumného zájmu. Fosfolipasa D (PLD) hydrolyzuje strukturní membránové fosfolipidy na kyselinu fosfatidovou, která je významnou signální molekulou u rostlin. Cílem této práce je prokázat zapojení PLD v časně fázi obranné reakce rostlin na napadení patogeny, tzv. získané systemické resistenci (SAR), jejímž jedním projevem je akumulace kyseliny salicylové (SA). Exogenní aplikace SA spouští procesy vedoucí k resistenci rostlin.

Použili jsme modelovou rostlinu *Arabidopsis thaliana*, na níž lze snadno využít postupy molekulární biologie díky známému genomu a veřejným kolekcím inserčních mutantů. Možnou úlohu PLD jsme zjišťovali sledováním exprese obranných genů SAR po aplikaci SA metodou RT-PCR v T-DNA inserčních mutantech *A. thaliana* s vypnutým genem pro PLD α 1. Studium exprese markerových genů SAR u těchto mutantů jsme zjistili, že vypnutý gen *PLD α 1* má určitý význam pro rozvoj SAR. Toto zjištění jsme ověřili na buněčné suspenční kultuře a na celých rostlinách divokého typu po zablokování produkce kyseliny fosfatidové in vivo *n*-butanolem.

Studium funkce a struktury křenové peroxidasy a její podíl na odezvě k abiotickému stresu

Autor: Jana Herinková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: RNDr. Jarmila Zídková, CSc.

Křenová peroxidasa je velmi významný enzym ze třídy oxidoreduktas, která se využívá ke značení protilátek, v mnoha imunodiagnostických metodách a v neposlední řadě také při bioremediacích. Velký význam má její zařazení mezi glykoproteiny. Mnoho lidských alergenů má strukturu glykoproteinů a předpokládá se, že za jejich alergenicitu může být zodpovědná glykanová část případně její nejbližší okolí. První část předkládané práce se zabývá specifitou myších monoklonálních protilátek proti křenové peroxidase. U některých monoklonálních protilátek byla pozorována křížová interakce s dalšími glykoproteiny s velmi podobnou glykanovou částí: askorbát oxidasou a fosfolipasou A₂. Z našich dosavadních výsledků vyplývá, že monoklonální protilátka HPX15 by mohla rozpoznávat glykanovou část molekuly peroxidasy.

Tato skutečnost může mít velký význam při studiu úlohy peroxidas a srovnání vlastností peroxidas izolovaných z různých rostlinných druhů. Bylo zjištěno, že kromě funkcí popsaných v literatuře může křenová peroxidasa degradovat některá xenobiotika. Její konkrétní zapojení a účast izoform zatím popsány nebyly. Tato práce zkoumá indukci různých izoenzymů křenové peroxidasy a zvýšenou aktivitu izoform dalšího rostlinného druhu – lilku černého.

Aktivace lipasy z *Geotrichum candidum* 4013, určení její selektivity a využití jejích katalytických vlastností

Autor: Klára Hlavsová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc, Ing. Marie Zarevúcka, CSc

Kvasinka *Geotrichum candidum* 4013 byla využita jako zdroj extracelulární a na buňku vázané lipasy. Tyto lipasy jsou významné díky svým katalytickým vlastnostem, mají vysokou enantioselektivitu a výhodnou

substrátovou specifitu. Kultivace buněk *Geotrichum candidum* 4013 probíhala v tekutém médiu, jako zdroj dusíku byl použit kukuřičný výluh a zdrojem uhlíku byla glukosa. Indukce lipas probíhala v médiu obsahujícím pepton a jako aktivátor produkce lipas byl použit olivový olej. Průběh růstu buněk byl v časových intervalech sledován nefelometricky při vlnové délce 600 nm. Stacionární fáze růstu nastala ve 24. hodině. Aktivita na buňku vázané lipasy a extracelulární lipasy byla měřena titrační metodou. Jednotka aktivity je definována jako množství uvolněné olejové kyseliny z trioleinu za 1 minutu při pH 7,6 a teplotě 37°C. Regioselektivita a typoselektivita na buňku vázané lipasy byla určena pomocí hydrolysy 1,2-dipalmitoyl-3-oleoylglycerolu a 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerolu a ověřena esterifikací glycerolu palmitovou kyselinou, linolovou kyselinou nebo jejich směsí. Tato lipasa byla použita pro hydrolysu oleje ze semen černého rybízu (*Ribes nigrum*), který obsahuje množství polynenasycených mastných kyselin, zejména α -linolenové kyseliny a γ -linolenové kyseliny, které jsou velmi významné z farmaceutického hlediska.

Expresa, purifikace a charakterizace lidské rekombinantní cystathionin- β -synthasy A114V

Autor: Jana Kopecká
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. RNDr. Milan Kodíček, CSc.

Cystathionin- β -synthasa (EC 4.2.1.22, L-serin-hydrolyasa, CBS) je klíčový enzym metabolismu siřných aminokyselin. Váže pět ligandů, substráty L-serin a L-homocystein, kofaktory pyridoxal-5-fosfát (PLP) a hem a allosterický aktivátor S-adenosyl-L-methionin (AdoMet). V současné době je známo přes 130 mutací v genu pro CBS a homocystinurie z deficitu CBS je nejběžnější enzymopatie metabolismu siřných aminokyselin. Cílem naší práce je charakterizace mutace A114V, která patří mezi běžnější poruchy s projevy mírné homocystinurie. Podařilo se nám optimalizovat postupy exprese a purifikace, osvědčené při práci s enzymem bez mutace (CBS wild type). Teplotu exprese v prokaryotickém systému ve formě fúzního proteinu s glutathion-s-transferasovou kotvou (GST) jsme snížili ze 37 °C na 18 °C. Při purifikaci pomocí afinitní chromatografie jsme průtokovou kolonu nahradili vsádkovým způsobem navazování. Z důvodu agregace fúzního proteinu jsme upravili složení pufru (přídavek 5% glycerolu nebo 0,1% detergentu Brij 30). Na přečištěných proteinech jsme stanovovali katalytickou aktivitu CBS wild type i A114V a sledovali aktivaci AdoMet. Aktivita mutantního proteinu je podle očekávání nižší (70 % wild type), překvapivě však téměř vůbec nedochází k aktivaci AdoMet, zatímco u CBS wild type se aktivita zvýšila (2-5krát). Předmětem naší další práce bude srovnávání strukturálních vlastností CBS wild type a A114V, zejména měření cirkulárního dichroismu a fluorescenčních spekter.

Studium aktivity 13 kDa formy proteasy Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV) a hledání vhodných inhibitorů

Autor: Petr Pachl
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. Doc. Ing. Tomáš Ruml, CSc.

Detailní charakterizace mechanismů probíhajících v jednotlivých stádiích životního cyklu retrovirů je nutná pro zavedení nových léků, které se využívají při léčbě nemocí způsobených těmito viry. Vzhledem k vysokému vývoji resistance virů při léčbě doposud používanými léky, je vývoj nových terapeutik stále aktuální. Jedním z enzymů nezbytných pro infektivitu viru jsou proteasy. Tyto hydrolasy štěpí specificky peptidové vazby polyproteinového prekursoru nezralého virionu a umožní tak zrání částice. Hledání vhodného inhibitoru, látky schopné zastavit vývoj viru v této fázi, je jedno z řešení možné léčby.

V této studii testujeme látky peptidomimetické povahy a za pomoci kinetických experimentů popisujeme jejich vliv na průběh proteolytické reakce. K měření používáme rekombinantně připravenou a přečištěnou 13 kDa formu proteasy M-PMV a chromogenní peptidový substrát. Reakce je sledována spektrofotometricky v UV oblasti. Cílem práce je nalézt pevně se vážící inhibitor vhodný pro použití při krystalografických studiích proteasy.

Mutagenese chladově aktivní β -galaktosidasy z antarktického kmene *Arthrobacter* sp. C2-2

Autor: Tomáš Podzimek
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitelé: Prof., Ing. Blanka Králová, CSc., Ing. Petra Lipovová, PhD.

Enzym β -galaktosidasa patří do třídy hydrolas. Štěpí β -1,4 glykosidickou vazbu v laktose, ale i v syntetických substrátech (např. *o*-nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid). Studovaný enzym je zajímavý z hlediska adaptace na funkci při nízkých teplotách. Jsou známy krystalové struktury sedmi takto adaptovaných enzymů (α -amylasa, elastasa, trypsin, triosafosfátisomerasa, citrátsynthasa, malátdehydrogenasa, proteasa). Jednou z metod, jak objasnit vztah struktury a funkce těchto enzymů, je cílená mutagenese. Záměnou určitých aminokyselin za aminokyseliny, které se vyskytují u jejich mesofilních protějšků, by bylo možno změnit teplotní vlastnosti enzymu.

Mým úkolem je připravit mutanty chladově aktivní β -galaktosidasy, jejíž struktura byla objasněna naší pracovní skupinou. Byly navrženy tyto mutanty: E553D+H557Q, G402K, S609R, C999W a mutace smyčky 996-1003, která se nachází v blízkosti katalytických skupin a mohla by tak ovlivňovat katalytické vlastnosti enzymu. Mutanty G402K, C999W, S609R a E553D+H557Q již byly izolovány a částečně charakterisovány. U všech bylo stanoveno teplotní optimum, změřena stabilita a závislost aktivity na koncentraci substrátu. Tyto charakteristiky jsou pak porovnávány s vlastnostmi nemutovaného enzymu. Na základě těchto výsledků a ze znalosti struktury enzymu budou do budoucna připraveny další mutanty.

Expese a purifikace reverzní transkriptasy z Mason-Pfizerova opičího viru

Autor: Tomáš Sára
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR
Školitel: Prof. Tomáš Ruml, CSc.; Mgr. Jan Snášel, PhD.

Reverzní transkriptasa (RT) sehrává klíčovou roli v životním cyklu retrovirů. Mechanismus reverzní transkripce a integrace není však doposud zcela objasněn. Pro studium tvorby virového komplexu obsahujícího RT, integrasu, RNA a cDNA využíváme jako model Mason-Pfizerův opičí virus (M-PMV). Tato práce je věnována expresi, izolaci, purifikaci a charakterizaci M-PMV RT. Sekvence kódující RT byly klonovány do bakteriálního vektoru pET15b, obsahujícího úsek pro histidinovou kotvu. Expres RT byla nejprve provedena v buňkách *Escherichia Coli* BL-21 DE-3 při 37 °C. Za těchto podmínek však docházelo pouze k bazální expresi, a proto byla provedena její optimalizace. Nejvyšší produkce RT bylo dosaženo při kultivaci buněk při teplotě 15 °C, indukci exprese 1 mM IPTG a sklizni buněk 24 hodin po indukci. Výtěžek za těchto podmínek řádově vzrostl. RT byla z bakteriálního lyzátu purifikována pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA agarose, poly(U)- a heparin-sepharose. Získaný produkt však není dostatečně čistý pro další studium. Pro použití ionexové chromatografie probíhá v současné době stanovení izoelektrického bodu M-PMV RT. Izolovaný protein je velmi náchylný k agregaci při pH nižším než 6. Přítomnost glycerolu a Mg^{2+} iontů stabilizuje sbalení RT a její polymerasovou aktivitu, která je měřena pomocí inkorporace radioaktivně značeného [α - ^{35}S] dATP na templát poly r(U) a je vyhodnocována autoradiografií.

Podíl sérových proteas na degradaci thyreoliberinu

Jméno: Klára Sovová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Ing. Radovan Bílek, CSc.

Thyreoliberin (TRH, thyrotropin-releasing hormone) je hypothalamickým hormonem, jehož hlavní biologickou funkcí je stimulace sekrece hypofyzárního thyreotropinu (TSH). Prostřednictvím TSH sekundárně řídí biosyntézu thyroidálních hormonů trijodthyroninu a thyroxinu. Je znám i extrahypothalamický výskyt TRH imunoreaktivity, ale její význam zatím není podrobně prozkoumán. TRH je tripeptid s primární strukturou L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid. V cirkulaci je TRH nestabilní s poločasem rozpadu v řádu minut. Na jeho degradaci se podílí především prolylendopeptidasa a pyroglutamylaminopeptidasa I a II.

Ke stanovení TRH v biologické matrici byla použita kompetitivní radioimunoanalýza. Byly otestovány její podmínky a na základě optimalizovaného pracovního postupu byly změřeny sérové koncentrace TRH u 50 pacientů s různou thyreopathií. Ve vzorcích byly naměřeny minimální koncentrace TRH. Dále bude provedena imunoanalýza TRH v plazmě odebrané speciálním postupem, tj. s použitím proteasového inhibitoru, s náběry do ledu a s okamžitým stočením a zmražením. Aktivita proteas bude zkoumána z hlediska typu poruchy štítné žlázy použitím séra nebo plazmy s přidavkem TRH a TRH-like peptidu jak celkově, tak i po chromatografické, popř. i elektroforetické separaci. Výsledkem by měla být charakterizace aktivity jednotlivých TRH degradujících proteas v souvislosti s typem thyreopathie.

SEKCE: Struktura a funkce bílkovin

KOMISE: Předseda: Prof. Ing. Ruml Tomáš, CSc.
 Členové Doc. Ing. Sajdok Jiří, CSc.
 Ing. Smékalová Zdena
 Ing. Šantrůček Jiří

Anomálie při odsolování nekolagenních fibrilárních proteinů získaných z dentinu *Homo sapiens sapiens*

Autor: Filip Auinger
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Doc. Ing. Jiří Sajdok, CSc.

Při korelaci složení tkání *Homo sapiens sapiens* s věkem je pro další analýzu potřeba vzorky nejdříve zbavit anorganických solí. K tomu využíváme především dialýzu a gelovou permeační chromatografií. Při procesech odsolování nekolagenních fibrilárních proteinů získaných ze zubního dentinu byly nalezeny odlišnosti, které neumožňují vzorek odsolit. Dle dosavadních výsledků dochází při dialýze k průchodu proteinů přes membránu s řádově menšími póry, než je velikost separovaných proteinů. Proto byl vyzkoušen i druhý způsob, běžně používaný pro odsolování proteinů, tedy gelová permeační chromatografie. Ani při použití této metody nedošlo k odsolení směsi. Většina proteinů byla z kolony eluována společně se solemi. Bylo ověřeno, že na eluci proteinů nemají vliv nespecifické iontové interakce. U jiných směsí proteinů, jako je směs tryptických štěpů kaseinu, dochází k osolení na téže koloně bez problémů. Z experimentálních dat plyne, že oba výše zmiňované procesy jsou závislé na stérické povaze separovaných proteinů a může tedy docházet ke ztrátám proteinů podobných vlastností, jako mají nekolagenní proteiny zubního dentinu, i při odsolování jiných směsí proteinů výše uvedenými metodami.

Studium indukce obranných mechanismů řepky olejky vyvolaných kulturou *Leptosphaeria maculans* a kultivačním médiem

Autor: Irena Bacíková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. RNDr. Olga Valentová, CSc.

Leptosphaeria maculans je hlavní houbový patogen, jenž napadá významnou zemědělskou plodinu řepku olejku (*Brassica napus*). Práce se zabývá studiem elicitorů *L. maculans*, tj. produktů patogena vyvolávajících obranné reakce rostliny, pomocí sledování aktivace signálních drah obranných mechanismů *B. napus*. Časnou odezvou na stres je nárůst aktivity fosfolipasy D (PLD). Dlouhodobou

obrannou odpovědí je akumulace proteinů souvisejících s patogenezí (pathogenesis-related proteins; PR-proteins). Předchozí výsledky však naznačily, že pravděpodobně již samotné kultivační medium pro *L. maculans* indukuje v *B. napus* obranné reakce. Jednou ze složek tohoto média je kvasničný lyzát, který může obsahovat sekundární metabolity kvasinek, jako např. ergosterol, u něhož již byla indukce prokázána. Dosavadní výsledky stanovení účinnosti elicitorů *L. maculans* mohou být tímto do jisté míry ovlivněny. Proto byly nyní pokusy cíleny tak, aby se ověřilo, zda kvasničné medium expresi *PR* genů skutečně indukuje. Paralelně ke kvasničnému mediu bylo testováno zeleninové medium (V8) a frakce z *L. maculans*, v něm kultivované. Jako marker byl použit BTH, komerční induktor exprese *PR1* a *PR2*. Experimenty jsou založeny na izolaci RNA z infikovaných listů *B. napus*, RT-PCR s primery pro *PR1* a *PR2* a následné detekci exprese příslušných genů.

Studium biochemických a imunologických vlastností proteinu CD36 a vliv RNA interference na jeho funkci

Autor: Boris Bartoš
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: RNDr. Jarmila Zídková CSc.

Protein CD36 je membránový integrální glykoprotein s mnoha posttranslačními modifikacemi. Podle předchozích studií je deficit CD36 jedním z potenciálních faktorů podporujících vznik metabolického syndromu zahrnujícího esenciální hypertenzi, inzulinovou resistenci a dyslipidemii. CD36 se podílí na transportu dlouhořetězcových mastných kyselin (LCFA) přes cytoplazmatickou membránu, dále je receptorem oxidovaných LDL (low density lipoprotein) u monocytů a makrofágů a také receptorem krevních destiček pro thrombospondin a kolageny I a IV. Dosavadní výsledky studia proteinu CD36 u inbredních kmenů laboratorního potkana SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) a WK (Wistar Kyoto) neprokázaly významné strukturní rozdíly proteinu CD36. Byly však nalezeny rozdíly v expresy proteinu CD36 na povrchu krevních destiček kmenů SHR a WK. Cílem této práce je studium efektu ovlivnění exprese (knockdownu) CD36 na metabolismus sacharidů, akumulaci lipidů a transport mastných kyselin přes cytoplazmatickou membránu. Modelovým systémem je linie 3T3-L1 myších pre-adipocytů, které po diferenciaci na adipocyty disponují potřebným tukovým metabolismem. K utlumení genové exprese CD36 je použita metoda RNA interference. K stanovení proteinu CD36 se využívá Western blot s následnou imunodetekcí. K analýze tukového metabolismu byla použita plynová chromatografie mastných kyselin a barvení intracelulárních zásobních lipidů pomocí Oil RedO.

Vliv polyproteinového prekursoru Env na lokalisaci matrixového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru v infikovaných buňkách

Autor: Kateřina Flajšmanová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. Ing. Tomáš Ruml, Ph.D.

Mason-Pfizerův opičí virus je prototyp retrovirů D typu, pro něž je charakteristické, že nezralé kapsidy skládají v cytoplasmě hostitelské buňky. Matrixový protein (MA), je součástí polyproteinového prekursoru Gag, který má centrální úlohu při skládání retrovirové částice. Je znám úsek 18 aminokyselin v matrixovém proteinu, který je odpovědný za morfogenesi D typu. Tento úsek je nezbytný pro cílení Gag na místo skládání virionu v cytoplasmě a byl nazván CTRS (cytoplasmic targeting/retention signal). Záměna argininu v pozici 55 za fenylalanin v tomto úseku má za následek změnu morfogenese viru z D typu na C typ. Předpokládá se, že cytoplasmatická distribuce Gag je závislá na jeho interakci s prekursorem obalových glykoproteinů Env. Naším cílem bylo prozkoumat vliv přítomnosti Env na lokalisaci MA divokého typu i mutantu R55F. Připravili jsme proto plasmidy, obsahující gen pro matrixový protein tak, že výsledný protein je ve fúzi s červeným fluorescenčním proteinem DsRed a také plasmidy, obsahující současně i gen pro polyproteinový precursor Env. Pomocí fluorescenční mikroskopie jsme studovali lokalisaci matrixového proteinu po vnesení těchto vektorů do tkáňových buněk COS-1. Studovali jsme lokalisaci MADsRed a prokázali jsme, že přítomnost prekursoru Env má vliv na jeho lokalisaci.

Studium reaktivity postranních řetězců histidinu pomocí hmotnostní spektrometrie na principu MALDI-TOF

Autor: Aleš Hnízda
Ročník: 5.
Ústav : Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. RNDr. Milan Kodíček, CSc.

Reaktivita postranních řetězců aminokyselin v molekulách bílkovin do určité míry koreluje s jejich povrchovou dostupností. V této práci jsme studovali možnost modifikace imidazolu diethylpyrokarbonátem v inzulínu, jenž sloužil jako modelová molekula. Přestože je diethylpyrokarbonát nejpoužívanějším modifikačním činidlem histidinu, reaguje také s α - a ϵ - aminoskupinou, hydroxylem tyrosinu nebo sulfhydrylovou skupinou cysteinu. K detekci reagujících řetězců jsme použili chymotrypsin a endoproteasu Glu-C, hmotnost peptidů vzniklých štěpením jsme určili pomocí MALDI-TOF-MS a modifikaci detegovali na základě definovaného zvýšení molekulové hmotnosti. Modifikovanou aminokyselinu lze také určit sekvenováním daného peptidu; tuto možnost jsme testovali na angiotensinu II. Další možnost, jak od sebe odlišit reagující řetězce, je působení hydroxylaminu; ten odstraňuje modifikaci histidinu a tyrosinu, zatímco v ostatních aminokyselinách zůstává modifikace zachována. Zjistili jsme, že pro specifitu jsou vhodnější nižší koncentrace činidla v reakční směsi; ovšem i při nich reagují kromě samotného histidinu i další skupiny, zejména pak α -aminoskupina. Přes tuto komplikaci se nám podařilo určit, které histidinové řetězce v inzulínu reagují, přičemž jejich reaktivita pak souhlasí s hodnotami povrchových dostupností vypočtených na základě známé prostorové struktury.

Studium nekovalentní interakce strukturního polyproteinu Gag z M-PMV s ubikvitinem

Autor: Hana Laštůvková
Ročník: 4.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Prof. Ing. Tomáš Ruml, Csc., Ing. Zdeněk Krejzlík, Ph.D.

Ubikvitin je vysoce konzervovaný protein o délce 76 aminokyselin. Molekula ubikvitinu může být prostřednictvím enzymatického aparátu kovalentně připojena svým C-koncem na postranní lyzinový zbytek některých buněčných proteinů za vzniku izopeptidové vazby. Tato kovalentní modifikace proteinu je signálem pro jeho degradaci nebo transport do místa určení. Tento vliv ubikvitinylationu na osud proteinu je vázán na existenci proteinů obsahující minimálně jednu ze šesti známých strukturně definovaných domén, které dokáží nekovalentně interagovat s molekulou ubikvitinu. Analýzou primární struktury polyproteinového prekursoru Gag z M-PMV jsme v oblasti kapsidového proteinu a p12 našli dva potenciální interakční motivy odpovídající konsenzus sekvenci domén GAT a CUE. Byly připraveny expresní konstrukty pro jednotlivé části Gag, které byly použity ve dvojhybridním kvasinkovém systému pro studium interakce s ubikvitinem. Tato interakce byla také ověřována *in vitro* pomocí imobilizovaného ubikvitinu na Ni-NTA nosiči a radioaktivně značených částí Gag. Dosud provedené experimenty poukazují na možnou nekovalentní vazbu ubikvitinu *in vitro* v oblasti kapsidového proteinu a p12.

Určení třírozměrné struktury dvojitého mutantu T41I/T78I matrixového proteinu Masonova-Pfizerova opičího viru

Autor: Jan Prchal
Ročník: 4.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: ing. Jan Lipov

Masonův-Pfizerův opičí virus (M-PMV) je prototypem D typu retrovirů. U B a D retrovirů se nezralá virová částice skládá v cytoplasmě, zatímco u C typu retrovirů (HIV) je Gag nejprve transportován k membráně, kde poté probíhá skládání nezralé kapsidy. N-koncová doména proteinu Gag, matrixový protein (MA), hraje ústřední roli v určení tohoto morfogenického rozdílu. Doposud je známa třírozměrná struktura divokého typu MA, a struktura mutantu R55F, který způsobuje změnu D typu na C typ. V této práci se zabývám určením třírozměrné struktury dvojitého mutantu T41I/T78I, který způsobuje formování kapsid jako u D typu, ale tyto kapsidy nejsou schopny pučet skrz membránu a akumulují se na ní. Strukturu proteinu určuji pomocí heteronukleární NMR spektroskopie. Za tímto účelem jsem si připravil ^{13}C , ^{15}N 100% obohacený rekombinantní protein a naměřil soubor experimentů, které slouží k přiřazení signálů a k výpočtu struktury. Podařilo se mi z větší části přiřadit resonance páteřních atomů polypeptidového řetězce a z částí i postranních řetězců. Na základě chemických posunů byl vypočten tzv. index chemického posunu, který definuje oblasti s pravidelnou sekundární strukturou. Porovnáním chemických posunů atomů mutantu s divokým typem mi umožnilo předpovědět oblasti hlavních strukturních změn.

Studium tvorby nezralých retrovirových kapsid *in vitro* a v *Escherichia coli* a jejich možné využití jako vektorů pro genové terapie

Autor: Irena Voráčková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav biochemie a mikrobiologie
Školitel: Ing. Pavel Ulbrich, PhD.

V mojí práci jsem se zaměřila na studium mechanismu tvorby retrovirových kapsid Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV) *in vitro* a v bakteriích *Escherichia coli*. Použila jsem deleční mutanty strukturního virového polyproteinu Gag a to fúzní kapsidový a nukleokapsidový protein (CA-NC), zkrácený CA-NC protein bez N-koncového prolinu (Δ ProCA-NC) a fúzní matrixový, kapsidový a nukleokapsidový protein (MA-CA-NC). Nalezla jsem vhodné podmínky pro tvorbu částic z těchto proteinů *in vitro* a jejich přítomnost jsem potvrdila pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM) a SDS-PAGE z frakcí sacharosového gradientu. Tvorbu virových částic jsem sledovala i v *E. coli* po expresi jednotlivých strukturních proteinů. Izolovala jsem částice tvořené z příslušných proteinů M-PMV a také viru HIV-1. Kapsidy jsem opět identifikovala pomocí TEM z částečně přečištěného lyzátu buněk. Smyslem práce bylo porovnání kapsid vzniklých v systému *in vitro* a v *E. coli* a také optimalizace tohoto procesu. Modifikovaných virových kapsid bychom chtěli využít při přípravě vektorů pro genové terapie.

SEKCE: Technologie zpracování potravin

KOMISE: Předseda: Doc. Ing. Jaroslav Dobiáš CSc.
Členové Ing. Hana Opatová CSc.
Dr. Ing. Miroslav Čeřovský
Dr. Ing. Lenka Votavová
Ing. Jarmila Jeleníková Ph.D

Barva masa v modifikované atmosféře s oxidem uhelnatým

Jméno: Bo-Anne Bělková
Ročník: 4
Ústav: Ústav konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Prof. Ing. Petr Pipek CSc.

Oxidaci hemových barviv se brání přidavkem konzervačních aditiv nebo se uchování barvy čerstvého červeného masa dosahuje balením do modifikované atmosféry (oxid uhličitý, kyslík, případě i inertní dusík). Kyslík však představuje určitý problém z hlediska oxidace tuků a současně zvyhodňuje do určité míry i růst aerobní mikroflóry. Jednou z alternativ se ukazuje použití oxidu uhelnatého, který stabilizuje barvu, aniž by měl tyto účinky kyslíkové atmosféry.

Pomocí videoanalýzy (LUCIA 4.11) a refleční spektrofotometrie (Minolta CM- 2600d) byla měřena barva mělněného masa baleného v modifikované atmosféře obsahující oxid uhelnatý. V programu LUCIA se použitím funkce prahování odstranily kousky svaloviny mělněného masa a následně se změřily její barevné podíly r, g, b; Minoltou se měřily hodnoty L*, a*, b*. Dále byla měřena refleční spektra libové hovězí svaloviny v rozmezí vlnových délek 360 až 740 nm. Maso balené v CO atmosféře si udržovalo červenou barvu po celou dobu skladování, a tudíž nedocházelo k oxidaci hemových barviv na metmyoglobin.

Ověření trvanlivosti kukuřičných extrudovaných výrobků

Jméno: Hronová Michaela
Ročník: 4
Ústav: Ústav konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Doc. Ing. Michal Voldřich CSc., Ing. Karolína Poláková

Potravinářské suroviny a výrobky jsou ve většině případů dlouhodobě neúdržný materiál, který podléhá pozvolna nebo rychle nežádoucím změnám. Tyto změny nemusí mít charakter úplné zkázy a většinou nemusí mít přímý vliv na zdravotní závadnost dané suroviny popřípadě výrobku. Charakter těchto změn souvisí s chemickými a organoleptickými vlastnostmi materiálů, a to především s chutí, vůní, barvou a texturou výrobku. K posouzení kvality může sloužit i měření některých degradačních produktů složek dané potraviny. Cílem práce bylo nalezení vhodných metod pro posouzení trvanlivosti kukuřičných extrudovaných výrobků. Byly sledovány změny profilů těkavých látek během skladování při různých teplotách metodou GC-MS a výsledky byly porovnány se senzorickou analýzou.

Metody posouzení kvality fritovacích olejů

Autor: Krapfová Tatiana
Ročník: 4.
Ústav: Ústav konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Dr. Ing. Miroslav Čeřovský; Ing. Lucie Janotová

Během smažení potravin v olejové lázni se v oleji hromadí degradační produkty, které zhoršují jeho technologické vlastnosti a ohrožují zdravotní nezávadnost smažených potravin. Proto musí být olej po určité době používání nebo po zpracování jisté dávky potravin vyměněn za čerstvý.

Kvalita používaných fritovacích olejů může být posuzována pomocí řady chemických a fyzikálních parametrů. Stanovuje se např. celkový obsah polárních látek, obsah polymerů, obsah volných mastných kyselin, peroxidové číslo, barva, viskozita, povrchové napětí, dielektrická konstanta a další parametry. Pro praxi to znamená, že olejová lázeň bude vyměněna teprve tehdy, když nastane nebezpečí, že nastavené maximální meze sledovaných kritérií budou překročeny.

Cílem práce bylo ověření využitelnosti na trhu nabízených přístrojů a setů pro rychlé stanovení kvality oleje a přípravků určených k prodloužení použitelnosti oleje ve smažící (fritovací) lázni.

Sledování růstu plísní na trvanlivých salámech pomocí analýzy obrazu

Jméno: Anna Lojková
Ročník: 4
Ústav: Ústav konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Prof. Ing. Petr Pipek CSc.

Problémem trvanlivých salámů může být výskyt plísní na jejich povrchu. Kontaminaci výrobků plísněmi během výroby, zrání a skladování není možné zabránit, proto je nutné jejich růstu zamezit nebo tento růst zpomalit. Růst plísní se potlačuje uzením, snížením aktivity vody, úpravou teploty a vlhkosti. V současné době se povrchové dekontaminace salámů dosahuje použitím antimikrobiálních látek.

Pomocí videoanalýzy byla sledována účinnost vybraných aditiv (kyselina mléčná 2% roztok, sorban draselný 0,2% roztok a přípravek na bázi natamycinu 0,1% roztok) určených k povrchovému ošetření trvanlivých tepelně opracovaných salámů. V programu LUCIA 3.52 se pomocí funkce prahování vybraly kolonie plísní, které byly spočteny a následně byla změřena jejich plocha. Z celkové plochy salámu a plochy plísní se vypočítal podíl plísní pokrývajících povrch salámů. Z vybraných aditiv určených k povrchovému ošetření salámů se ukázal jako nejúčinnější přípravek obsahující natamycin.

Použití komplexotvorných činidel při aktivním balení potravin

Autor: Renata Rychtáriková
Ročník: 5.
Ústav: Ústav konzervace potravin a technologie masa
Školitel: Doc. Ing. Jaroslav Dobiáš, CSc.

Aktivní balení je založeno na cílené interakci obalu s potravinou za účelem prodloužení skladovatelnosti potravin. Jednou z možných funkcí aktivního obalu může být i inhibice růstu mikroorganismů. Komplexotvorná činidla mohou potlačovat růst bakterií, kvasinek a plísní tím, že váží do pevných komplexů ty ionty kovů, které jsou nezbytné pro jejich životní funkce. Toho se využívá i v potravinářském průmyslu ke konzervaci potravin, kde se zatím jedná spíše o vedlejší účinek těchto látek. Práce se zabývá možností využití komplexotvorných činidel navázaných na obal, zejména EDTA a polyfosfátů, jako základ antimikrobních systémů aktivního balení.

Porovnání účinnosti práškových pracích prostředků

Autor: Jana Svobodová
Ročník: 5.
Ústav: Ústav technologie mléka a tuků, VŠCHT Praha
Školitel: Doc. Ing. Jan Šmidrkal, CSc.

Na českém trhu je řada pracích prášků o různé kvalitě a ceně. Výběr mezi všemi těmito výrobky není pro běžného zákazníka jednoduchý. Proti sobě stojí dvě základní kritéria výběru a to kvalita a cena. Kromě toho je zákazník ovlivněn četnými reklamami. Otázkou je, zda cena výrobku opravdu odpovídá jeho kvalitě.

Cenu a prací účinnost pracího prostředku určuje jeho složení. Hlavními složkami jsou anionické, kationické a neionické tenzidy, sekvestrační látky, optické zjasňující látky, alkálie, enzymy a další složky.

V této práci bylo porovnáno celkem patnáct pracích prášků, jak fosfátových tak bezfosfátových. U všech pracích prášků byl stanoven obsah tenzidů, fosfátů, aktivního kyslíku a chloridů. Dále byla stanovena prací účinnost při pěti různých teplotách prací lázně.

Z analýz je zřejmé, že levné prací prášky mají nižší obsah účinných složek (tenzidů) a současně vykazují nižší prací účinnost než dražší prací prášky. Tedy ve většině případů je účinnost a kvalita funkcí ceny.

Sledování oxidačních změn tuku v obalech s modifikovanou atmosférou

Autor: Monika Šťastná
Ročník: 5.
Ústav: Ústav technologie masa a konzervace potravin
Školitel: Doc. Ing. Jaroslav Dobiáš, CSc.

Balení v modifikované atmosféře je v současnosti velmi využívanou metodou. Cílenou změnou okolní atmosféry není možné zcela zastavit nežádoucí pochody probíhající v těchto potravinách, lze však výrazně prodloužit dobu skladovatelnosti. Doposud byl studován vliv propustnosti obalu na rychlost oxidace oleje, tato práce by však měla směřovat k reálným potravinám. V našem případě se jedná o smažené výrobky, např. krekry, bramborové lupínky. U těchto potravin se nejprve musí zjistit oxidační stabilita, proto je třeba nalézt metody, které by byly schopné postihnout průběh oxidace. Cílem studie je shrnutí vhodných metod, jenž by se mohly při výše zmíněné problematice nejefektivněji využít.

SEKCE: Chemie přírodních látek

KOMISE: Předseda: Doc. Ing. Karel Kefurt, CSc.
Členové Ing. Miroslav Ledvina, CSc.
Ing. Lukáš Werner

Staudingerova-aza-Wittigova reakce 3-O-acetylovaných derivátů methyl-2-azido-2-deoxy- α -D-mannopyranosidu

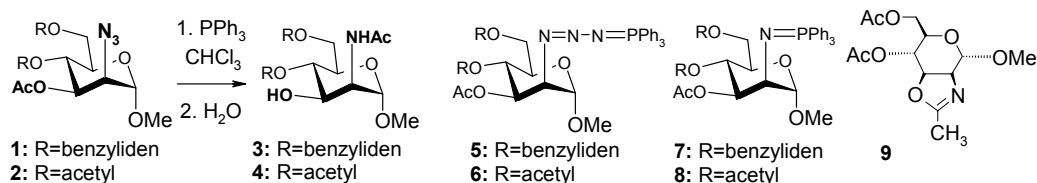
Autor: Zdeňka Černovská

Ročník: 4.

Ústav: Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Školitel: Prof. Ing. Jitka Moravcová, CSc., Ing. Alena Popelová

Staudingerova reakce umožňuje připravovat z azidodeoxyprekurzorů acetamidodeoxysacharidy. Ty jsou vyhledávány jako potenciální imunomodulátory, protože obdobné sacharidy hrají v přírodě důležitou roli v mezibuněčném rozpoznávání (včetně imunitní odpovědi). Pomocí trifluoromethylsulfonylace a azidace byl připraven methyl-3-O-acetyl-2-azido-4,6-O-benzyliden-2-deoxy- α -D-mannopyranosidu (**1**) a z něj methyl-3,4,6-tri-O-acetyl-2-azido-2-deoxy- α -D-mannopyranosid (**2**). U látek **1,2** byla redukována azidoskupina Staudingerovou reakcí. V přítomnosti vody byla sledována migrace acetylů z polohy 3 za vzniku acetamidů **3**, resp. **4**. V nepřítomnosti vody reaguje fosfinimin intramolekulární aza-Wittigovou reakcí za vzniku oxazolinového derivátu **9**. Struktura meziproduktů **5,6,7,8** a produktu **9** byla zjištěna pomocí NMR a MS měření.



Parametrizace silového pole MM3

Autor: Jan Horníček

Ročník: 5.

Ústav: Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Školitel: Ing. Ivan Raich

Práce se zabývá detailním rozбором silového pole MM3 do jednotlivých energetických příspěvků vyjádřených pomocí rovnic s empirickými parametry. Takto detailně rozebrané silové pole pak umožňuje jednak porovnat jednotlivé verze silového pole MM3, konkrétně MM3(1996) a MM3(2000), jednak ověřit implementaci tohoto silového pole v dalších balících programů pro molekulární modelování, jmenovitě v sadě programů Tanker. Cílem je jednak zpřesnění empirických parametrů pomocí *ab initio* výpočtů pro vybrané třídy látek, jednak možnost zahrnutí explicitního klastru rozpouštědla v molekulové dynamice, což jsou významná omezení základního balíku MM3.

Inhibitory glykosidas na bázi C-disacharidů

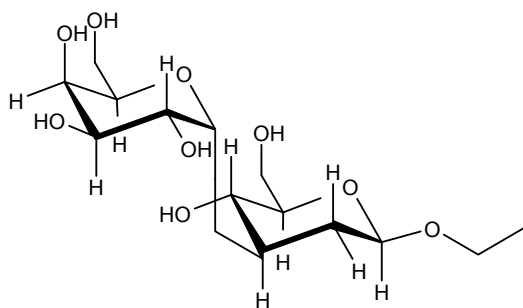
Autor: Barbora Hynková

Ročník: 5.

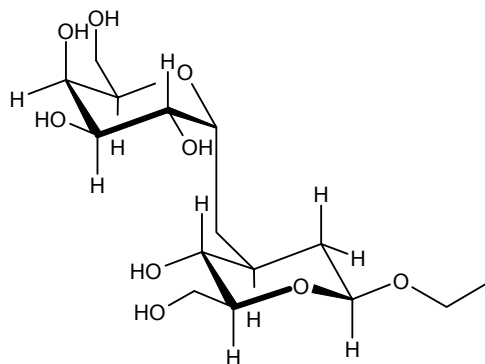
Ústav: Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Školitel: Doc. Ing. Ladislav Kniežo, CSc.

Byly testovány inhibiční vlastnosti struktur (1) a (2) vůči glykosidasám. Dosud získané výsledky ukázaly, že inhibiční vlastnosti závisí na konfiguraci sacharidového zbytku na redukcujícím konci. Struktura (1) s konfigurací D- je slabým inhibátorem α -glukosidasy ze *Saccharomyces cerevisiae*, zatímco struktura (2) s konfigurací L- je bez inhibičních účinků.



(1)



(2)

Estery jako možné látky při regulaci hmyzích škůdců

Autor: Ondřej Jurček

Ročník: 5.

Ústav: Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Školitelé: Prof. Ing. Jitka Moravcová, CSc., Doc. Ing. Zdeněk Wimmer, DrSc.

Má práce má za účel poukázat na problematiku syntézy analogů juvenilních hormonů, biologicky aktivních sloučenin, které mohou mít negativní vliv na morfologii a fyziologii vybraných druhů hmyzu. V prvé řadě jde o syntézu biologicky aktivní sloučeniny-alkoholu, tzv. juvenoidu. Pro zlepšení vlastností této molekuly (zejména jde o protrahovaný účinek a možnost aplikace do organismu společně s potravou) se v další fázi syntézy provádí esterifikace vybranými mastnými kyselinami. Vzniklé estery, tzv. juvenogeny, je možné považovat za aplikační formy analogů juvenilních hormonů, které uvolňují v průběhu odbourávání v organismu, po hydrolyze esterové vazby. Tyto hormonogenní estery mastných kyselin jsou odvozeny od 2-(4-hydroxybenzyl)-1-cyklohexanonu. Po jeho reakci s ethyl-4-brom-3-methyl-but-2-enoátem vznikla směs dvou isomerů *E* a *Z* ethyl-4-[4-(2-oxo-1-cyklohexylmethyl)]fenoxy-3-methyl-2-butenóátu. Po rozdělení těchto ketonů sloupcovou chromatografií, byla provedena chemická redukce NaBH_4 isomeru s konfigurací *E*. Výsledná směs alkoholů *cis* a *trans* byla opět rozdělena sloupcovou chromatografií a nakonec byla provedena esterifikace hexadekanoyl chloridem. V současné chvíli jsou estery testovány v laboratořích na svou biologickou účinnost. Všechny produkty i meziproducty byly identifikovány analytickými metodami $^1\text{H-NMR}$, případně IR a MS.

Inhibitory galaktosyltransferas

Autor: Lukáš Koreň

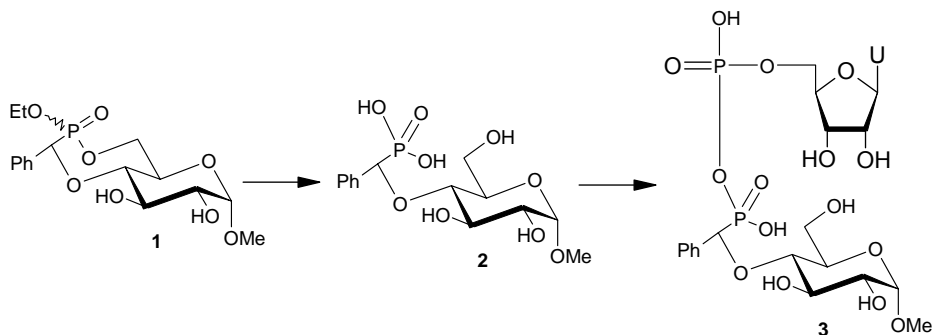
Ročník: 5.

Ústav: Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Školitel: Doc. Ing. Jitka Moravcová, CSc.

Již dříve bylo zjištěno, že reakcí methyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-O-isopropyliden- α -D-glukopyranosidu s triethylfosfitem za katalýsy trimethylsilyl-trifluormethansulfonátem (Michalisova-Arbuzova reakce) vzniká směs cyklických fosfonátů. Tyto látky by mohly být prekurzory perspektivních inhibitorů galaktosyltransferas. Cílem této práce bylo optimalizovat jejich syntézu, izolovat čisté isomery a připravit volné kyseliny pro následující kapling s uridin-monofosfátem.

Byl optimalizován výběr chránících skupin ve výchozí látce a bylo zjištěno, že reakce probíhá snadno i s volnými hydroxylovými skupinami v poloze 2 a 3 a krystalický fosfonát **1** byl získán ve vysokém výtěžku. Následnou alkalickou hydrolyzou byla připravena volná kyselina **2**, která bude podrobena reakci s uridinmonofosfátem za vzniku cílového inhibitoru **3**.



Studium přípravy a vlastností amidických derivátů steroidů

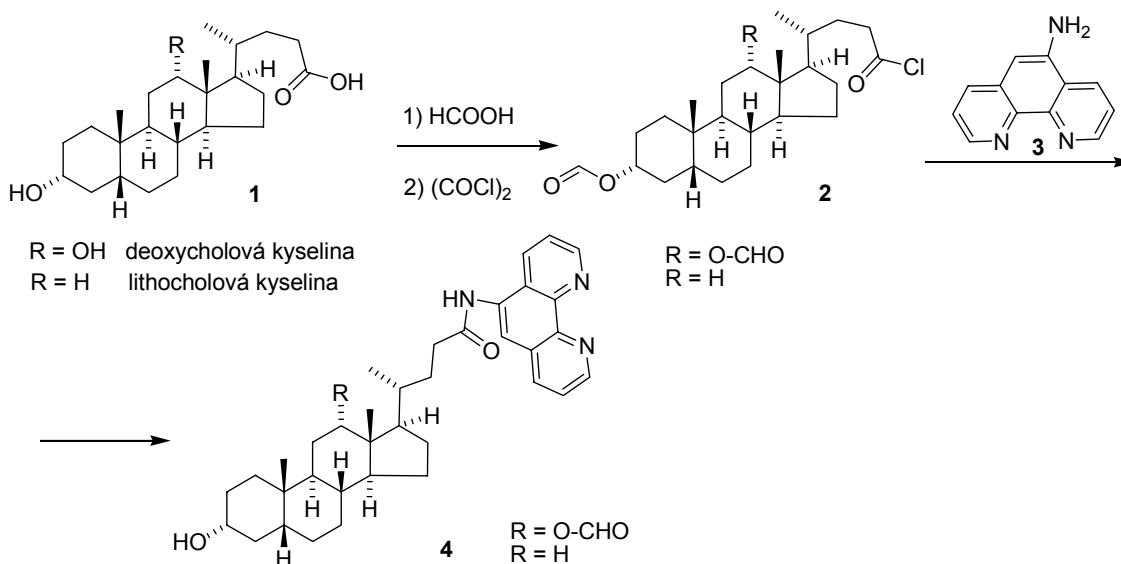
Autor: Zdena Nováková

Ročník: 5.

Ústav: Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Školitel: Prof. RNDr. Pavel Drašar, DrSc.

Žlučové kyseliny jsou konečným produktem metabolismu cholesterolu v játrech. Steroidní jádro projde několika hydroxylacemi, následovanými ztrátou isopropylu z bočního řetězce a takto vzniká primární žlučová kyselina. Byla zveřejněna schopnost některých žlučových kyselin, substituovaných aromatickými donory na pozici C-3, vytvářet gel z určitých organických rozpouštědel. Cílem práce je získat amidické deriváty žlučových kyselin s aminofenanthrolinem, na kterých bychom mohli zkoumat jejich gelotvorné účinky a srovnat je s popsanou sloučeninou, odvozenou od lithocholové kyseliny. Reakcí kyseliny lithocholové **1** (R=H, 3 α -hydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina) a deoxycholové **1** (R=OH, 3 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholan-24-ová kyselina) s HCOOH a později s (COCl)₂ vznikne mezuprodukt **2**. Jeho reakcí s aminofenanthrolinem vzniká amidický derivát **4**.



Pro přípravu 5-amino-1,10-fenanthrolinu **3** byla zdokonalena metoda redukce nitroderivátů vyvinutá před časem na Ústavu analytické chemie této školy.

Příprava nového typu cyklických esterů kyseliny fosforové

Autor: Lenka Šimková

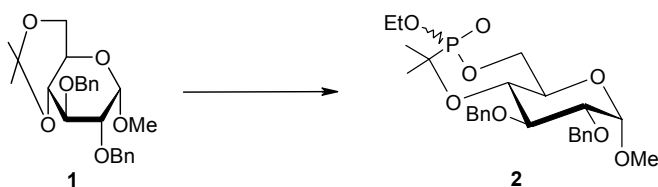
Ročník: 5.

Ústav: Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Školitel: Prof. Ing. Jitka Moravcová, CSc.

Reakcí methyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-O-isopropyliden- α -D-glukopyranosidu **1** s triethylfosfitem za katalýsy trimethylsilyl-trifluormethansulfonátem (Michalisova-Arbuzova reakce) vzniká směs diastereoisomerních cyklických fosfonátů **2**. Tyto látky by mohly být prekurzory perspektivních inhibitorů galaktosyltransferas. Cílem této práce bylo izolovat čisté isomery a připravit volné kyseliny pro následující kapling s uridin-monofosfátem.

Podmínky Michaelisovy-Arbuzovy reakce byly optimalizovány tak, že reakce je nyní proveditelná v gramovém množství. Klíčovým momentem je čistota výchozí látky, která nesmí obsahovat žádný benzylochlord z předchozího stupně. Alkalickou hydrolyzou esterové skupiny vznikly nové fosfonové kyseliny, které byly identifikovány pomocí NMR, IČ a MS.



Studium přípravy a vlastností konjugátů žlučových kyselin s aminy

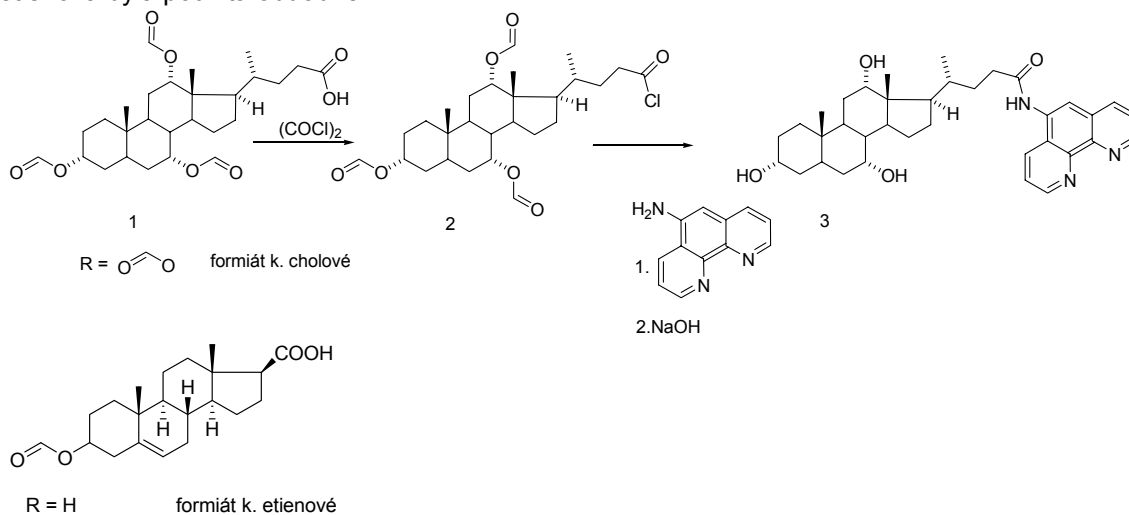
Autor: Lucie Štěrbová

Ročník: 5.

Ústav: Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Školitel: Prof. RNDr. Pavel Drašar, DrSc.

U některých derivátů žlučových kyselin, např. konjugátů s aminy, byla pozorována schopnost tvořit gely v různých organických rozpouštědlech. Tyto gely jsou tvořeny především prostřednictvím vodíkových můstků na amidové vazbě, π - π interakcí aromatického systému a dalších nekovalentních interakcí. Cílem práce je syntetizovat amidy vybraných steroidních kyselin, jako například kyseliny cholové a etienové s 5-amino-1,10-fenanthrolinem a dále studovat gelační vlastnosti těchto látek v organických rozpouštědlech. Dvoukroková syntéza vychází z formiátu příslušné kyseliny (1), reakcí s oxalylchloridem je tvořen chlorid kyseliny (2) a ten pak reaguje s 5-amino-1,10-fenanthrolinem za vzniku amidu (3). Nakonec jsou působením NaOH odstraněny formylové chránící skupiny. Kyselina etienová byla použita obdobně.



Příprava prekursoru nového typu inhibitoru glykosyltransferas

Autor: Alice Vosečková

Ročník: 5.

Ústav: Ústav chemie přírodních látek, VŠCHT Praha

Školitel: Doc. Ing. Jitka Moravcová, CSc.

Glykosyltransferasy se účastní biosynthesy cukerných epitopů glykokonjugátů, které mají významnou úlohu v procesech buněčného rozpoznávání. Inhibitory těchto enzymů mohou být proto perspektivními terapeutiky. Cílem této práce je příprava prekursoru **3** jako nového strukturního motivu potenciálních inhibitorů.

Výchozí látkou syntesy byla D-glukosa, která byla převedena v jednom kroku na keton **1** a následnou bromací na derivát **2**. Posledním krokem syntesy byla Michaelisova-Arbuzova reakce bromidu **2** s triethylfosfitem. Jednotlivé kroky syntesy byly optimalizovány a produkty reakcí identifikovány pomocí NMR, IČ a MS.

