

studentská odborná konference

CHEMIE JE ŽIVOT

30—11—2022

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická



HUMUSOFT®

Studentská odborná konference
Chemie je život 2022

Sborník příspěvků

Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická, 30. listopadu 2022

Sponzorem konference je společnost HUMUSOFT s.r.o.



Studentská odborná konference *Chemie je život 2022*
Sborník příspěvků

Editor: doc. Ing. Petr Dzik, Ph.D.

Obsah

Sekce studentů bakalářských a magisterských studijních programů

Príprava a charakterizácia nových typovselektívnych kompozitných membrán na báze polyméru Pebax a nanočastic MOF UiO-66-NH ₂	6
Jana Floreková, Karel Friess, Saeed Ashtiani	
Akcelerace mikrobiologických výzkumů za využití strojového učení	18
Jan Hrudka	
Elektrochemické řízení oxidačního stavu homologů transaktinoidů	20
Jakub Sochor	
Zpracování koncentráту z membránových procesů	28
Jan Vespalec, Martina Repková, Michaela Vašinová Galiová	

Sekce studentů doktorských studijních programů

Tematický okruh vědy o živé přírodě a environmentální vědy

Characterization of Biological Effects of Extracts Obtained from Yeasts.....	38
Jana Blažková, Dominika Špačková, Pavlína Sikorová, Pavlína Sniegoňová, Sztokowski Martin, Márová Ivana	
Sensor of food packaging environment quality	46
Vojtěch Dobiáš, Mária Veselá	
Metabolic characterization of carotenogenic yeasts cultivated on waste products of food industry.....	56
Sikorová Pavlína, Hladká Dagmar, Sztokowski Martin	
Effect of selenium and cobalt ions on algal and cyanobacterial biomass and metabolite production.....	64
Pavlína Sniegoňová, Dominika Špačková, Martin Sztokowski	
Commercial application of microalgae and cyanobacteria extracts	71
Paulína Strečanská, Renata Uhlířová, Ivana Márová	

Sekce středoškolských studentů

Príprava a charakterizácia nových typov selektívnych kompozitných membrán na báze polymérov a nanočastíc MOF

Bc. Floreková Jana

Saeed Jamali Ashtiani, M.Sc., prof. Ing. Karel Friess, Ph.D.

Vysoká škola chemicko-technologická v Prahe

Fakulta chemicko-inžinierska

Ústav fyzikálnej chémie

Technická 5, 166 28 Praha, Česká republika

(jflorekova3398@gmail.com)

1 Úvod

Počiatky vývoja použiteľných membránových materiálov siahajú až do 18 storočia, kedy sa využívali mechúre alebo črevá z ošípaných, hovädzieho dobytky a rýb ako priepustný materiál.¹ V súčasnosti sa najčastejšie používajú synteticky vyrobené, polymérne membrány, ktoré majú vysoký potenciál pri riešení emisií skleníkových plynov. Emisie CO₂ a aj metánu sú všeobecne považované za hlavné dôvody globálneho otepľovania a súvisiacich klimatických zmien.² Riešením môže byť efektívna membránová technológia umožňujúca ciele separáciu CO₂ a aj SO₂ zo spaľovania fosilných palív s vyšším obsahom síry od iných plynov, najmä od vodíka a metánu. Medzi hlavné výhody membránovej separácie je možné rátať nízku energetickú, priestorovú a aj nákladovú náročnosť, čo radí túto technológiu medzi priemyslové aktivity šetrné k životnému prostrediu.²

V chemickom priemysle sa polymérne membrány využívajú ako najbežnejšie komerčné membrány na separáciu plynov vďaka ich nízkej cene, vysokej spracovateľnosti, dobrej mechanickej stabilite a vynikajúcim transportným vlastnostiam. K hlavným nevýhodám polymérnych membrán však patrí slabá odolnosť voči kontaminantom,

relatívne nízka chemická a tepelná stabilita a najmä limit v kompromise medzi permeabilitou a selektivitou (tzv. trade-off).³ Kvôli trade-off efektu existuje veľký záujem o syntézu nových polymérov, ktoré vykazujú vyššiu priepustnosť pre plyn a selektivitu ako v súčasnosti dostupné polyméry.⁴ Zmes kaučukových a sklovitých polymérov sa môže použiť ako materiál kopolymérovej membrány, ktorý by spojil vysokú permeabilitu kaučukových polymérov s vysokou selektivitou sklovitých polymérov.⁵

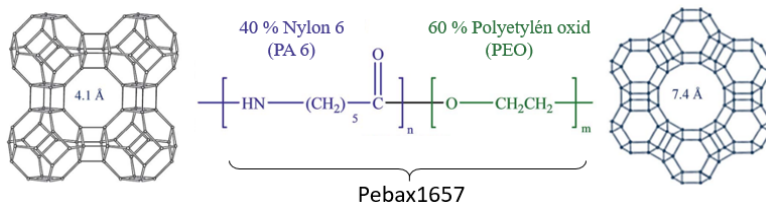
Kopolymérne membrány vykazujú veľmi sľubnú perspektívu na prípravu vysokovýkonných membrán na zachytávanie CO₂ z procesných plynných tokov obsahujúcich CH₄ a N₂. Konkrétne Pebax, termoplastický elastomér kombinujúci polyamidové (PA) a polyéterové (PEO) monoméry, vykazuje vysokú afinitu k CO₂ s požadovanou mechanickou pevnosťou pre polymérne membrány vďaka flexibilnému, kaučukovému PEO segmentu a tvrdému, sklovitému PA bloku. Na zlepšenie výkonu sa do Pebax membrán začlenia plnivá,⁶ ako napríklad zeolity, uhlíkové sorbenty alebo plnivá na základe kovovo-organickej štruktúry (MOF).⁷ Membrány so zmiešanou maticou (MMM) sa vyrábajú dispergovaním plniva do polymérnej matrice, kde výsledná membrána typicky vykazuje lepší výkon ako pôvodná. MMM membrány majú veľký potenciál na separáciu CO₂ a považujú sa za jeden z najdôležitejších smerov vývoja v oblasti budúcich separačných membrán. V tejto práci bol výskum zameraný na vplyv implementácie nanočastic UiO-66-NH₂ do kompozitného polyméru Pebax1657 s cieľom potlačiť trade-off efekt. Skúmala sa efektívnosť pripravených membrán s MOF nanočasticami a ich selektívne vlastnosti voči CO₂ od iných plynov.

2 Teoretická časť

2.1 Pebax a jeho charakteristika

Poly(éter-blok-amid) alebo Pebax je termoplastický kopolymér získaný polykondenzáciou polyamidu karboxylovej kyseliny (napr. PA6, PA11, PA12) s alkoholovým terminačným polyéterom (napr. PTMG, PEG). Semikryštalické polyamidové (PA) segmenty dodávajú kopolyméru tvrdosť a dobrú mechanickú pevnosť, zatiaľ čo kaučukové polyéterové segmenty (PEO) poskytujú kopolyméru flexibilitu a priepustnosť. Vlastnosti každého kopolyméru súvisia s pomerom zložiek PA a PEO, ako napríklad priepustnosť alebo rozpustnosť plynov, ktorá sa zvyšuje so zvyšujúcou sa frakciou PEO.⁸ Materiály z Pebaxu vykazujú vysokú priepustnosť pre uhlíkovodíky a vysokú permselektivitu oxidu uhličitého vzhľadom na nepolárne plyny (napr. CO₂/N₂, SO₂/N₂ a CO₂/H₂).⁹ Tieto vlastnosti sú obzvlášť zaujímavé pre odstraňovanie CO₂ zo spalín a syntézneho plynu, ako aj pre odstraňovanie kyslých plynov zo zemného plynu.¹⁰

Konkrétne Pebax1657 (obr.1) pozostáva z 40 % chemickej štruktúry PA 6, známou tiež ako Nylon 6 a z 60 % PEO. Nylon 6 existuje v dvoch formách pravidelných kryštalových štruktúr: vo forme γ a viac stabilnej časti α . Interakcia medzi dvoma rôznymi formami kryštalových štruktúr v nylone 6 môže mať veľký vplyv na prestup jednotlivých molekúl plynov.¹¹



Obrázok 1: Chemická štruktúra kopolyméru Pebax1657 s diametrom ich priepustného otvoru.¹¹

2.2 Nanočastice na báze kovovo-organickej štruktúry (MOF)

Nový typ hybridných MOF nanočastíc vytvárajú flexibilné štruktúry pozostávajúce z centrálnych anorganických kovových iónov spojených organickými ligandami.¹² Spoločne, tieto stavebné bloky vytvárajú trojrozmerné porézne kryštalické siete s veľmi vysokým objemom pórov a povrchom.¹³ V niektorých prípadoch sú póry stabilné počas eliminácie hostujúcich molekúl (často rozpúšťadiel) a môžu byť znovu naplnené inými zlúčeninami. Vďaka tejto vlastnosti sú MOF zaujímavé pre skladovanie plynov, ako je vodík, oxid uhličitý alebo metán.¹⁴ Ďalšie možné aplikácie MOF sú pri čistení plynu, pri separácii plynov alebo pri katalýze. V oblasti senzorov sa používajú na detekciu špecifických molekúl, kde MOF nanočastice pôsobia ako filtračné membrány, ktoré umožňujú špecifickým molekulám prístup k povrchu zabudovaných snímacích materiálov, aby generovali signály a zároveň blokovali iné rušivé substráty.¹⁵ Okrem toho možno MOF zmenšiť na veľkosť nanometrov, čo ich robí potenciálne užitočnými ako nanonosiče v medicínskych aplikáciách.¹³

V porovnaní s tradičnými poréznymi materiálmi sú MOF výhodné z hľadiska geometrie a vlastností, kde je možné otvorené kanály v MOF navrhnuť a jemne upraviť pomocou rôznych kovových zhlukov alebo organických ligandov podľa cieľných aplikácií.¹⁵ MOF nanočastice na báze zirkónu sa používajú hlavne kvôli ich dobrej stabilite. Konkrétne UiO-66-NH₂ nanočastice a ich porézna štruktúra, vhodná vnútorná veľkosť pórov, hydrofilná povaha a vysoká chemická a vodná stabilita môžu poskytnúť membránam väčšiu povrchovú hydrofilitu a preferenčné dráhy pre molekuly vody cez selektívnu vrstvu.¹²

2.3 Transport plynov cez membránu

Priepustnosť čistého plynu cez neporéznu membránu je daný vzťahom:

$$P_n = \frac{K_{pL}}{p_{ret}} \frac{dp_{mer}}{dt}, \quad (1)$$

L je hodnota hrúbky membrány, p_{ret} je parciálny tlak meranej látky v retentátovej časti cely a p_{mer} je meraný tlak. K_p sa nazýva konštanta prístroja a je charakterizovaná vzťahom:

$$K_p = \frac{V_{mer} T_{STP}}{AT p_{STP}}, \quad (2)$$

A zahŕňa plochu membrány, T je termodynamická teplota a V_{mer} je objem permeátovanej časti cely, v ktorej dochádza k nárastu tlaku a veličiny T_{STP} a p_{STP} sú štandardná teplota (273,15 K) a štandardný tlak (101 325 Pa).¹⁶

Následne sa vypočíta ideálna selektivita membrány pre daný pár čistých plynov z pomeru priepustnejšieho plynu (A) k pomalšie priepustnému plynu (B) na základe vzorca:

$$\alpha = \frac{P_A}{P_B}, \quad (3)$$

kde P_A a P_B označujú priepustnosti plynu A a plynu B.

3 Experimentálna časť

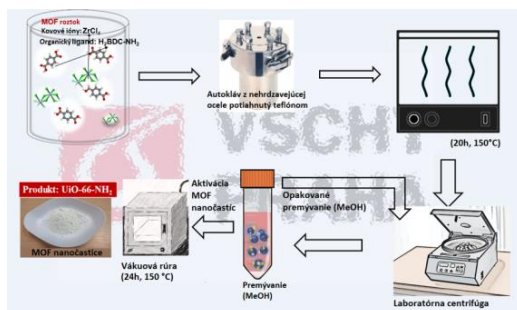
Experimentálna časť je zameraná na prípravu membrán z polyméru Pebax, konkrétne z komerčne dostupného Pebax1657 a na syntézu MOF nanočastíc UiO-66-NH₂. Následne v tejto časti bude spomenutý opis postupu prípravy membrán a výsledky permeačných a analytických experimentov.

3.1 Príprava membrán

Pebax1657 bol rozpustený v etanole s vodou v hmotnostnom pomere 7/3 pri 70 °C. Po 3 h zahrievania sa pridalo požadované množstvo nanočastíc a roztok sa nechal zahrievať ďalších 24 h. Vzniknutý tuhý roztok bol naliaty na podpornú vrstvu PSF, ktorého hrúbka predstavovala 150 μm a membrána bola vložená do vyhriatej rúry na 50 °C.

3.2 Príprava MOF nanočastíc (UiO-66-NH₂)

Na syntézu nanočastíc sa zmiešal ZrCl₄ s kyselinou 2-aminotereftalovou (H₂BDC-NH₂) a ako rozpúšťadlo bol použitý DMF. Vzniknutý roztok sa miešal 2 h pri izbovej teplote a následný postup syntézy MOF nanočastíc je načrtnutý na obr. 2. Syntéza kryštalických nanočastíc vyžaduje špecifické podmienky, preto sa vzniknutý roztok nechal 24 h v kovovom izolovanom obale zahriať na 110 °C. Následne sa roztok v centrifúge o rýchlosti 8000 RPM dvakrát premyl metanolom za účelom odstránenia rozpúšťadla. Kľúčovým aspektom pre realizáciu vysokej pórovitosti je odstránenie hosťovských molekúl zo štruktúry nanočastíc tzv. aktiváciou.¹⁷ Pre aktiváciu MOF nanočastíc sa výsledná zmes vložila do vákuovej rúry vyhriatej na 150 °C.

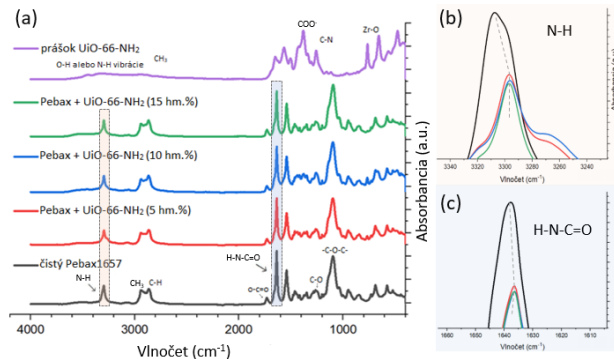


Obrázok 2: Detailný postup syntézy MOF nanočastíc (UiO-66-NH₂) od pripraveného vzorku so zlúčeninami ZrCl₄ a H₂BDC-NH₂ až po finálnu aktiváciu týchto nanočastíc.

3.3 Charakterizácia membrán

3.3.1 ATR-FTIR

V tejto práci boli vzorky merané pomocou infračerveného spektrometru s Fourierovou transformáciou a taktiež s technikou zoslabeného úplného odrazu (ATR). Obr. 3 reprezentuje FTIR spektrum získané z pripravených kompozitných membrán, čistého Pebaxu1657 a prášku nanočastíc UiO-66-NH₂.



Obrázok 3: (a) ATR-FTIR spektrum čistého Pebaxu1657, nanočastíc a UiO-66-NH₂-Pebax membrán, posuny pásov pre funkčnú skupinu N-H (b) a H-N-C=O (c).

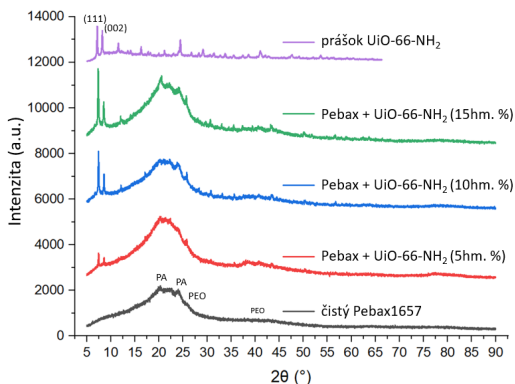
Absorpčný pás 1680 cm⁻¹ indikuje prítomnosť -NH₂ skupiny a pásy od 1503 po 1600 cm⁻¹ sa pripisujú valenčné vibrácie skupiny C-O. Pre kaučukový PEO segment je v infračervenom spektre charakteristická hodnota 1094 cm⁻¹, ktorá reprezentuje vibrácie

C-O-C skupiny. Pás korešpondujúci -N-H- väzbám je približne 3298 cm^{-1} a charakteristické pásy 1636 a 1732 cm^{-1} sa priradzujú skupine H-N-C-O a skupine O-C=O. Tieto tri pásy indikujú prítomnosť tvrdého PA segmentu.¹⁸ Pásy 1636 a 3298 cm^{-1} sa posunuli na nižšiu frekvenciu pre membrány UiO-66-NH₂-Pebax. Podobný fenomén už pozoroval J. Shen vo svojej práci a vysvetľuje to zlepšenie vodíkových väzbových štruktúr, čo dokazuje vyššia hodnota vlnočtu čistého Pebaxu.¹⁸

Pre samotný kryštalický prášok UiO-66-NH₂ nanočastíc (obr. 3a) je charakteristický pás 1570 cm^{-1} pre karboxylovú skupinu, ktorá indikuje existenciu reakcie skupiny -COOH s kationóm Zr⁴⁺.¹⁹ Pás 1506 cm^{-1} sa pripisuje skupine C=C z aromatického jadra²⁰ a asymetrické vibrácie v oblasti 3375 cm^{-1} alebo symetrické vibrácie v oblasti 3486 cm^{-1} sú typické pre amino skupinu -NH₂ z organických ligandov.¹⁹ Pásky v oblastiach 730 cm^{-1} a 680 cm^{-1} v štruktúre syntetizovaných MOF nanočastíc boli pripísane skupine ZrO.²¹

3.3.2 XRD

Vo všeobecnosti ostrý röntgenový difrakčný pás predstavuje kryštalickú oblasť polyméru, zatiaľ čo amorfný polymér vykazuje široký pás. Na obr. 4 je znázornené röntgenové spektrum Pebaxu, ktorý ako kopolymér obsahuje kryštalickú a zároveň amorfnú časť. Kryštalická časť PA bola zaznamenaná pri približnej hodnote $2\theta=21^\circ$ ¹⁸ a po zvýšení MOF nanočastíc sa tento kryštalický vrchol stal zreteľnejším. Ďalšie pásy, ktoré sú pripisované kaučukovému segmentu PEO sú $2\theta = 40^\circ$ a 26° ²². Začlenenie nanočastíc do kompozitných membrán zvýšilo kryštalickosť PA a PEO segmentov, vzhľadom na zúženie pásov v ich charakteristických oblastiach. Tvorba MOF nanočastíc bola potvrdená charakteristickými pásmi v oblasti $2\theta=7,5^\circ$ (111) a $8,8^\circ$ (002)²³. Z obr. 4 je rovnako viditeľné, že tieto pásy rástli s rastúcim množstvom MOF nanočastíc v membránach UiO-66-NH₂-Pebax.



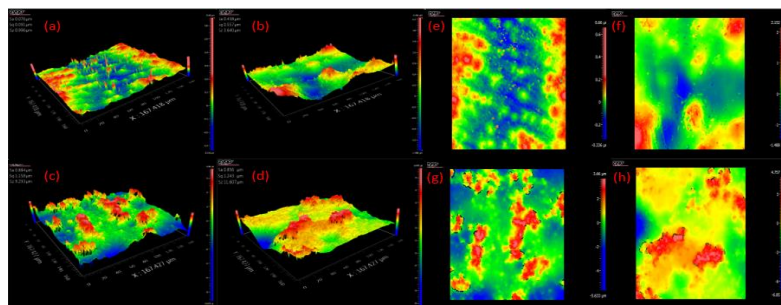
Obrázok 4: Výsledné XRD spektra jednotlivých membrán a prášku UiO-66-NH₂ s vyznačenými kryštalickými rovinami (111) a (002).

3.3.3 Výsledky z 3D optického profilometru

3D optický profilometer (Zygo New View 8200, USA) bol použitý na meranie všetkých typov pripravených membrán (obr. 5) a parametrami drsnosti S_a , S_q , S_z sa charakterizujú ich povrchové topografické vlastnosti. Parameter S_z určuje priemernú maximálnu výšku, hodnota parametru S_a udáva aritmetický priemer povrchovej drsnosti a S_q vyjadruje strednú aritmetickú hodnotu odchýlok z povrchu z (x,y) .²⁴ Výsledné hodnoty parametrov drsnosti (Tab. I) sa zvyšovali s pridávaním MOF nanočastíc do kompozitných membrán, čím sa zvyšovala aj drsnosť povrchu týchto agregovaných membrán.

Tabuľka I.: Hodnoty výsledných parametrov drsnosti z 3D optického profilometru.

	čistý Pebax1657	Pebax + 5 hm. % MOF nanočastíc	Pebax + 10 hm. % MOF nanočastíc	Pebax + 15 hm. % MOF nanočastíc
S_a (μm)	0,076	0,438	0,884	0,856
S_q (μm)	0,091	0,557	1,158	1,243
S_z (μm)	0,996	3,640	9,293	11,607

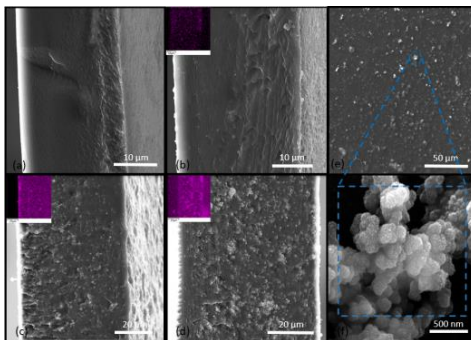


Obrázok 5: Snímky z 3D optického profilometra: (a) čistý Pebax1657 - povrch membrány (e), (b) Pebax + 5 hm. % MOF nanočastíc - povrch membrány (f), (c) Pebax + 10 hm. % MOF nanočastíc - povrch membrány (g), (d) Pebax + 15 hm. % MOF nanočastíc - povrch membrány (h).

3.3.4 SEM analýza

Prostredníctvom SEM analýzy sa sledovala distribúcia UiO-66-NH_2 v polymérnej membráne v porovnaní s čistým Pebaxom1657 (obr. 6). Snímky zo SEM analýzy pre čistý

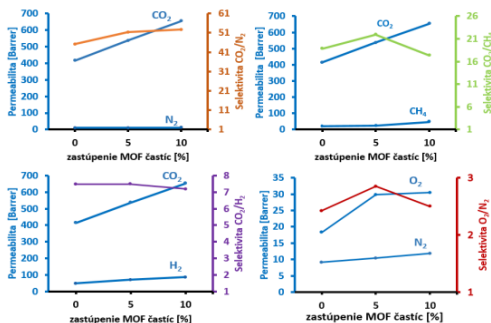
Pebax vykazovali homogénny a hladký prierez oproti membránam s prídavkom MOF nanočastíc, pričom MOF nanočastice mali tendenciu tvoriť agregáty (obr. 6 e, f).



Obrázok 6: Snímky prierezu (a) membrány Pebaxu, (b) 5 hm. %, (c) 10 hm. %, (d) 15 hm. % UiO-66-NH₂ nanočastíc v kompozitných membránach. Fialovými snímkami sú znázornené zastúpenia zirkónia SEM-EDS analýzou. Snímka (e) zobrazuje povrch membrány s 5 hm. % nanočastíc a (f) nanočastice UiO-66-NH₂.

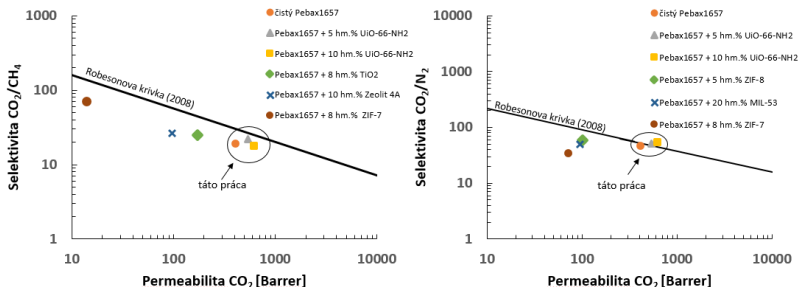
3.4 Výsledky permeačného merania

Experimentálne dáta z permeačných meraní boli spracované pomocou makra v programe MS Excel. S použitím vzorcov (1, 2) sa získali hodnoty priepustností čistých plynov a na základe týchto údajov bola vypočítaná selektivita podľa rovnice (3). Výsledné hodnoty sú zobrazené v grafoch na obr. 7. Permeabilita oxidu uhličitého vzrástla z hodnoty 415 Barrer (pre čistý Pebax) na hodnotu 625 Barrer, ktorá predstavuje priepustnosť pre membránu UiO-66-NH₂-Pebax s 10 hm. % obsahom UiO-66-NH₂.



Obrázok 7: Zobrazenie rastu permeabilit (ľavá osa) čistých plynov: CO₂, N₂, CH₄, H₂, O₂ s rastúcim zastúpením MOF nanočastíc a ich výslednou selektivitou (pravá osa).

Porovnanie získaných výsledkov s literatúrou je zobrazené na obr. 8, kde sú znázornené výsledky permeability CO_2 a selektivit CO_2/N_2 alebo CO_2/CH_4 v Robesonových diagramoch s hornou hranicou z roku 2008. V porovnaní s inými plnivami (TiO_2 , Zeolit A4, ZIF-7, ZIF-8, MIL-53) implementovaných do Pebaxu1657, nanočastice UiO-66-NH₂ vykazujú najlepšie výsledky v pomere vysoká permeabilita k vysokej selektivite, čím je potlačený trade-off efekt.



Obrázok 8: Znáznornená poloha bodov v Robesonových diagramoch rôznych aditív (UiO-66-NH₂, TiO₂²⁵, ZIF-7²⁶, ZIF-8²⁵, Zeolit 4A²⁵, MIL-53²⁷) v polymérnej matrici Pebax1657 pre plyny CO_2/CH_4 a CO_2/N_2 .

4 Záver

V tejto práci bol študovaný vplyv implementovania MOF nanočastíc do membrán z kopolyméru Pebax1657 s cieľom zlepšiť transportné vlastnosti pre separáciu plynov. Vysoká afinita Pebaxu1657 a MOF nanočastíc k CO_2 bola potvrdená permeačným meraním, kde dochádzalo k nárastu permeability s rastúcim zastúpením týchto častíc. Pridaním 5 hm. % nanočastíc do kopolymérnej membrány sa zvýšila priepustnosť všetkých testovaných plynov (CO_2 , N_2 , CH_4 , H_2 , O_2) a aj selektivity pre dvojice plynov CO_2/N_2 , CO_2/CH_4 , O_2/N_2 , zatiaľ čo pre CO_2/H_2 ostala selektivita rovnaká ako pre čistý Pebax, pretože transportné dráhy H_2 neboli ovplyvnené. Celková permeabilita oxidu uhličitého v membráne s obsahom 10 hm. % MOF nanočastíc vzrástla o necelých 34% v porovnaní s čistým Pebaxom a prekonal Robesonovu hornú hranicu z roku 2008 pre dvojicu plynov CO_2/N_2 , ktorá predstavuje maximum pre dané hodnoty permeability a selektivity.

Ďalej v tejto práci prebehli analýzy chemického zloženia syntetizovaného prášku nanočastíc, membrány z čistého Pebaxu1657 a kompozitných membrán UiO-66-NH₂-Pebax s rôznym obsahom nanočastíc UiO-66-NH₂. ATR-FTIR analýza potvrdila charakteristické pásy pre danú membránu a taktiež preukázala interakciu kopolyméru s UiO-66-NH₂ nanočasticami posunmi pásov v oblasti 1636 a 3298 cm^{-1} . V týchto oblastiach sa pásy postupne zmenšovali pre charakteristické skupiny N-H a H-N-C-O, ktoré sú súčasťou PA

segmentu v kopolyméri Pebax s vyšším zastúpením MOF nanočastíc. XRD analýza potvrdila výskyt kryštalickej fázy PA (úzke pásy) a kaučukovej fázy PEO (oblé pásy) v Pebaxe. PA a PEO segmenty vykazovali viac početných užších a vyšších pásov s rastúcim zastúpením UiO-66-NH₂ nanočastíc, z čoho vyplýva nárast kryštalických vlastností v UiO-66-NH₂-Pebax membránach. 3D optickým profilometrom bola analyzovaná topografia skúmaných membrán pomocou parametrov drsnosti *S_a*, *S_q*, *S_z*. Najvyššia hodnota parametra *S_z* (priemerná maximálna výška bodov z nameraných dát) bola najväčšia pri membráne, ktorá obsahovala 15 hm. % MOF nanočastíc, čo preukázalo najvyššiu drsnosť na povrchu membrány. Naopak, najnižšie parametre drsnosti preukazovala membrána z čistého Pebaxu1657. SEM analýza potvrdila úspešné zabudovanie MOF nanočastíc do matrice Pebaxu a zároveň SEM-EDS preukázala zastúpenie zirkónia v testovaných membránach, ktorého zdrojom boli UiO-66-NH₂ nanočastice.

V ďalšej fáze výskumu budú pripravené membrány s vyšším obsahom MOF nanočastíc (20, 25 a 30 hm. %). Spolu s tým bude testovaná implementácia dopamínu pri príprave membrán, aby sa poľahčilo prípadné tvorenie agregátov nanočastíc, ktoré by negatívne ovplyvnilo ich homogénne zabudovanie do matrice polyméru a aj separačné vlastnosti membrán.

5 Literatúra

- (1) Baker, R. W. Membrane technology and applications; John Wiley & Sons, 2012.
- (2) Younas, M.; Tahir, T.; Wu, C.; Farrukh, S.; Sohaib, Q.; Muhammad, A.; Rezakazemi, M.; Li, J. Post-combustion CO₂ capture with sweep gas in thin film composite (TFC) hollow fiber membrane (HFM) contactor. *Journal of CO₂ Utilization* 2020, 40, 101266.
- (3) Vinh-Thang, H.; Kaliaguine, S. Predictive models for mixed-matrix membrane performance: a review. *Chemical reviews* 2013, 113 (7), 4980-5028.
- (4) Alexander Stern, S. Polymers for gas separations: the next decade. *Journal of Membrane Science* 1994, 94 (1), 1-65.
- (5) Farnam, M.; bin Mukhtar, H.; bin Mohd Shariff, A. A review on glassy and rubbery polymeric membranes for natural gas purification. *ChemBioEng Reviews* 2021.
- (6) Embaye, A. S.; Martínez-Izquierdo, L.; Malankowska, M.; Téllez, C.; Coronas, J. Poly(ether-block-amide) Copolymer Membranes in CO₂ Separation Applications. *Energy & Fuels* 2021, 35 (21), 17085-17102. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.1c01638.
- (7) Palatý, Z.; Bernauer, B. Membránové procesy. *Chem. Listy* 2012, 106, 1086-1088.
- (8) Chen, H.; Xiao, Y.; Chung, T.-S. Synthesis and characterization of poly (ethylene oxide) containing copolyimides for hydrogen purification. *Polymer* 2010, 51 (18), 4077-4086.
- (9) Chen, J. C.-Y. Evaluation of Polymeric Membranes for Gas Separation Processes: Poly (ether-b-amide)(PEBAX® 2533) Block Copolymer. University of Waterloo, 2002.
- (10) Bernardo, P.; Jansen, J. C.; Bazzarelli, F.; Tasselli, F.; Fuoco, A.; Friess, K.; Izák, P.; Jarmarová, V.; Kačírková, M.; Clarizia, G. Gas transport properties of Pebax®/room

- temperature ionic liquid gel membranes. *Separation and purification technology* 2012, 97, 73-82.
- (11) Sharma, P.; Kim, Y.-J.; Kim, M.-Z.; Alam, S. F.; Cho, C. H. A stable polymeric chain configuration producing high performance PEBAX-1657 membranes for CO 2 separation. *Nanoscale Advances* 2019, 1 (7), 2633-2644.
 - (12) Zhao, D. L.; Yeung, W. S.; Zhao, Q.; Chung, T.-S. Thin-film nanocomposite membranes incorporated with UiO-66-NH₂ nanoparticles for brackish water and seawater desalination. *Journal of Membrane Science* 2020, 604, 118039.
 - (13) Wuttke, S.; Braig, S.; Preiß, T.; Zimpel, A.; Sicklinger, J.; Bellomo, C.; Rädler, J. O.; Vollmar, A. M.; Bein, T. MOF nanoparticles coated by lipid bilayers and their uptake by cancer cells. *Chemical Communications* 2015, 51 (87), 15752-15755.
 - (14) Furukawa, H.; Yaghi, O. M. Storage of Hydrogen, Methane, and Carbon Dioxide in Highly Porous Covalent Organic Frameworks for Clean Energy Applications. *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131 (25), 8875-8883. DOI: 10.1021/ja9015765.
 - (15) Chen, L.; Zhang, X.; Cheng, X.; Xie, Z.; Kuang, Q.; Zheng, L. The function of metal-organic frameworks in the application of MOF-based composites. *Nanoscale Advances* 2020, 2 (7), 2628-2647.
 - (16) Horák, Z. Milan Šípek (ed.): Membránové dělení plynů a par. *Chemické listy* 2014, 108 (6), 631-631.
 - (17) Mondloch, J.; Karagiari, O.; Farha, O.; Hupp, J. Activation of metal-organic framework materials. *CrystEngComm* 2013, 15, 9258. DOI: 10.1039/c3ce41232f.
 - (18) Shen, J.; Liu, G.; Huang, K.; Li, Q.; Guan, K.; Li, Y.; Jin, W. UiO-66-polyether block amide mixed matrix membranes for CO₂ separation. *Journal of Membrane Science* 2016, 513, 155-165.
 - (19) Saleem, H.; Rafique, U.; Davies, R. P. Investigations on post-synthetically modified UiO-66-NH₂ for the adsorptive removal of heavy metal ions from aqueous solution. *Microporous and Mesoporous Materials* 2016, 221, 238-244.
 - (20) Luu, C. L.; Van Nguyen, T. T.; Nguyen, T.; Hoang, T. C. Synthesis, characterization and adsorption ability of UiO-66-NH₂. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* 2015, 6 (2), 025004.
 - (21) Jamshidifard, S.; Koushkbaghi, S.; Hosseini, S.; Rezaei, S.; Karamipour, A.; Jafari rad, A.; Irani, M. Incorporation of UiO-66-NH₂ MOF into the PAN/chitosan nanofibers for adsorption and membrane filtration of Pb(II), Cd(II) and Cr(VI) ions from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 2019, 368, 10-20.
 - (22) Khalilinejad, I.; Kargari, A.; Sanaeepur, H. Preparation and characterization of (Pebax 1657+ silica nanoparticle)/PVC mixed matrix composite membrane for CO₂/N₂ separation. *Chemical Papers* 2017, 71 (4), 803-818.
 - (23) Li, G.; Kujawski, W.; Knoczowska, K.; Kujawa, J. Thin Film Mixed Matrix Hollow Fiber Membrane Fabricated by Incorporation of Amine Functionalized Metal-Organic Framework for CO₂/N₂ Separation. *Materials* 2021, 14 (12), 3366.
 - (24) Clausi, M.; Grasselli, S.; Malchiodi, A.; Bayer, I. S. Thermally conductive PVDF-graphene nanoplatelet (GnP) coatings. *Applied Surface Science* 2020, 529, 147070.

- (25) Azizi, N.; Isanejad, M.; Mohammadi, T.; Behbahani, R. M. Effect of TiO₂ loading on the morphology and CO₂/CH₄ separation performance of PEBAX-based membranes. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 2019, 13 (3), 517-530.
- (26) D'Alessandro, D. M.; Smit, B.; Long, J. R. Carbon dioxide capture: prospects for new materials. *Angewandte Chemie International Edition* 2010, 49 (35), 6058-6082.
- (27) Wang, X.; Zhang, Y.; Chen, X.; Wang, Y.; He, M.; Shan, Y.; Li, Y.; Zhang, F.; Chen, X.; Kita, H. Preparation of Pebax 1657/MAF-7 Mixed Matrix Membranes with Enhanced CO₂/N₂ Separation by Active Site of Triazole Ligand. *Membranes* 2022, 12 (8), 786.

Akcelerace mikrobiologických výzkumů za využití strojového učení

Jan Hrudka

VŠCHT, FChI/UFMT, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, jan.hrudka@outlook.com

Úvod

Pěstování mikrobiálních kultur na kultivačních médiích je metodou, přirozeného nárůstu populace mikroorganismů za kontrolovaných laboratorních podmínek, sloužící k jejich identifikaci, či ke zkoumání efektu vnějšího prostředí na jejich intenzitu reprodukce v čase. V současné době jsou tyto experimenty velice rozšířené, čímž dochází ke stále větší potřebě efektivních kvantitativních a kvalitativních vyhodnocovacích metod.

K vyhodnocování mikrobiálních kultur se nyní využívá softwaru, které dokáží z fotografií kultur vyhodnotit zastoupení mikromycet, k čemuž je ovšem potřeba manuální asistence pracovníka u každé z fotografií, což je značně neefektivní, nepřesné a nespolehlivé.

Mým úkolem je nalézt účinné řešení v podobě platformy Aurora, která by celý proces vyhodnocení zautomatizovala, čímž by i zpřesnil a zefektivnil, minimalizováním lidského chybového faktoru.

Metodika

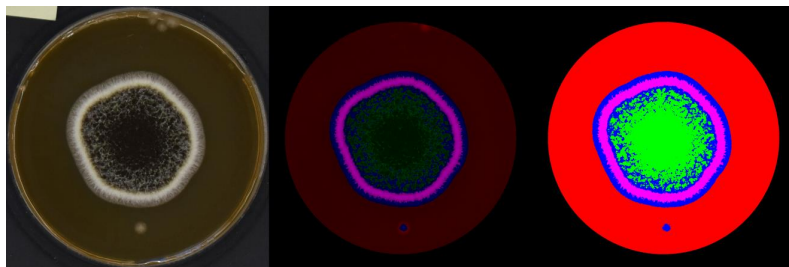
Princip této metodiky tkví ve snaze klasifikovat pixely dle spektrálních intenzit a jejich relativní pozice. Tyto data jsou transformována a vložena do umělé inteligence založené na principech strojového učení, čímž vznikne pro experiment univerzální klasifikátor, který dokáže už relativně snadno a výrazně přesně odlišit jednotlivých stadií kultur.

Následně jsou takto roz-klasifikovaná data vložena do druhé části, kde opět za pomoci strojového učení jsou jednotlivé shluky kolonií rozděleny a následně jsou samotné shluky rozdělovány na jednotlivé kolonie. Tato část už po pouhých několika měsících vývoje dosahuje 98% úspěšnosti a to bez nutnosti uživatelského vstupu, čímž je možné relativně přesně odhadnout počet jednotlivých kolonií na snímku.

To dále umožňuje úplně nových metod, neboť výstupem z této části metody není pouze počet kolonií ale i jejich odhadovaná velikost, čímž je možné získat distribuci velikosti shluků v daném čase.

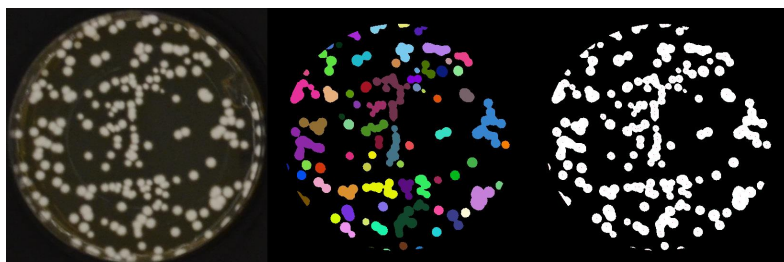
Výsledky

Na první obrázku si můžeme povšimnout postupu analýzy programu, který přetvoří vstupní snímek na zpracované zóny, kterými získáme již relativní zastoupení zón v daném momentě po pouhé sekundě vyhodnocování.



Obr. 1. Rozeznávání zón za využití strojového učení

Na druhém obrázku vidíme proces separace shluků zón a jejich následné rozdělení k získání počtu kolonií na snímku.



Obr. 2. Rozeznávání jednotlivých kolonií

Diskuze

Aurora za využití strojového učení[1] dokáže nejenom s vysokou přesností klasifikovat jednotlivé zóny a získat tak jejich relativní velikost v daném čase ale dokáže i spočítat počet kolonií a z kombinace těchto dat získat distribuci relativní velikosti jednotlivých kolonií, což je úplně novou metodou, která by mohla podkryt nových souvislostí, a to vše takřka bez nutnosti uživatelského vstupu, čímž se celý proces vyhodnocování v podstatě kompletně automatizuje, což vede k masivnímu zrychlení, díky čemuž je možné provádět rozsáhlejší experimenty s kvalitnější statistikou a tak i podstatnějsími výsledky.

Literatura

[1] F. Chollet, Deep Learning with Python, Mountain View, Spojené státy americké, Kalifornie, 2017



Elektrochemické řízení oxidačního stavu homologů transaktinoidů

Sochor Jakub¹

¹ Katedra jaderné chemie, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská ČVUT v Praze, Břehová 78/7, 115 19 Staré Město, Praha 1, jakub.sochor@jfifi.cvut.cz

Abstrakt

Výzkum transaktinoidů, tedy prvků s protonovým číslem 104–121, se v posledních letech nezaměřuje již pouze na problematiku jejich syntézy a produkce, ale stále více i na analýzu jejich chemických charakteristik; mezi hlavní patří oxidační čísla, díky jejichž znalosti je pak možné předpovídat existenci z chemického hlediska stabilních sloučenin konkrétního transaktinoidu. Zároveň je důležité zjištění vlivu relativistických efektů, které se v těchto případech již významně projevují na

jejich chování. Kromě nerozšířenější thermochemografie však lze také pro chemický výzkum těchto prvků využít metod elektrochemických. Práce, jejíž dílčí výsledky jsou publikovány v rámci tohoto příspěvku, se věnuje počátkům návrhu průtokové elektrochemické aparatury (se zapojením potenciostatu Gamry Reference 600) pro provádění cyklické voltametrie za účelem zjištění oxidačního stavu homologů transaktinoidů, konkrétně india a thallia, tedy homologů nihonia (protonové číslo $Z = 113$) v roztocích o objemu nižších desítek mililitrů a při milimolárních koncentracích.

Úvod

Studium chemických vlastností transaktinoidů je v současné době jedním z nosných témat aktuálního výzkumu v oblasti jaderné chemie. Tento výzkum má však svá specifika, ze kterých bývají vydvíhována následující dvě.

První je skutečnost, že množství analytu je o mnoho řádů menší než v případě "klasické" chemie, a aparatury tak musí fungovat v pracovním módu "*one-atom-at-a-time*"; tedy že poskytují rozeznatelný výstupní signál i tehdy, pokud se v nich nachází pouze jeden atom analyzované látky. To souvisí i s tím, že zájmové radionuklidy musí být syntetizovány v urychlovačích pomocí jaderných reakcí s malými účinnými průřezy (jednotky μb nejsou výjimkou). Druhým specifikem jsou nízké poločasy přeměny jednotlivých radionuklidů. Ze 107 dosud blíže popsáných radionuklidů transaktinoidů má pouze 39 poločas nad 1 s, osm nad 1 min a pouze tři z nich nad 1 hod (izotopy Db). Analytické metody tak musí být dostatečně rychlé, aby bylo možné analyzovat dostatečné množství vzorku před jeho přeměnou a získat tak přehled o chemických vlastnostech prvků (například oxidační čísla).

Zároveň ale nelze – z důvodů popsaných výše – použít klasické analytické metody, alespoň ne s takovou metodikou, jaká je pro tyto metody obvyklá. Elektrochemická analýza vzorku by však mohla být vhodná nejen díky své velké citlivosti, ale i díky možnosti dalšího použití vzorku pro další analýzy prakticky v nezměněné formě (nebo změněné, ale přesně definované). Pro ověření možnosti použití elektroanalytických metod však není vhodné používat přímo krátkodobé radionuklidy transaktinoidů, a to z důvodu jejich náročné přípravy. Je tak naprosto běžným postupem aparatury prověřovat na homologích prvků, které budou předmětem zájmu při pokročilejších experimentech.

Elektrochemické metody

Elektrochemie je definována jako část fyzikální chemie zabývající se studiem soustav, ve kterých probíhají chemické děje spojené s tvorbou či přeměnou elektrické energie. Zároveň studuje rovnováhy v systémech s částicemi nesoucími elektrický náboj a studuje vztahy mezi chemickými přeměnami a energií, při kterých se vyskytuje elektrická energie, případně elektrické (elektromagnetické) pole.

Spektrum elektrochemických analytických metod je široké – od konduktometrie a dielektrimetrie přes potenciometrické titrace až po galvanostatickou elektrogravimetrii a coulometrii. Mezi elektrochemické metody jsou řazeny i tzv. voltametrické metody, při nichž dochází ke sledování proudu v roztoku, a to v závislosti na napětí pracovní elektrody. Například rozpouštěcí voltametrie je považována za jednu z nejcitlivějších analytických metod, neboť mez stanovitelnosti se pohybuje na

úroveň pikomolárních koncentrací. Mezi voltametrické metody patří i lineární a cyklická voltametrie (CV), kterou některé zdroje považují za nejlépe zdokumentovanou voltametrickou techniku. Použití CV pro kvantitativní analýzy není příliš rozsáhlé; je používána spíše pro analýzy kvalitativní, přičemž v případě směsi se musí potenciály jednotlivých elektroaktivních látek lišit alespoň o 50 mV, aby mohlo dojít k jejich identifikaci. Při cyklické voltametrii je vkládán na (pracovní) elektrodu (na které probíhá studovaná reakce) proměnný potenciál s cyklickým většinou symetrickým trojúhelníkovým průběhem.

V praxi je také časté použití základního elektrolytu (pomocný, indiferentní elektrolyt), který je součástí analyzovaného vzorku, avšak v daném rozmezí potenciálů nereaguje s elektrodou (potenciálové okno), a je do roztoku přidáván za účelem zvýšení vodivosti roztoku (snižování odporu), a tedy možnosti průchodu proudu; vedlejším jevem je také potlačení vlivu migrace.

Důležitým parametrem CV je rychlost polarizace elektrody (*scan rate*, v) [mV/s], tedy vyjádření rychlosti změny potenciálu. Větší rychlosti způsobují menší difúzní vrstvu kolem elektrod, což implikuje větší proudy. Vztah *scan rate* se rychlostními parametry a vlastnostmi analytu je uveden v Randles-Ševčíkové rovnici. Ta je získána úpravou Butler-Volmerovy rovnice; v případě laboratorní teploty 25°C pro reversibilní elektrochemický děj tvar (1) a pro irreversibilní tvar (2).

$$I_p = (2,686 \cdot 10^5) \cdot A \cdot c \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot v^{\frac{1}{2}} \cdot n^{\frac{3}{2}} \quad (1)$$

$$I_p = (2,686 \cdot 10^5) \cdot A \cdot c \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot v^{\frac{1}{2}} \cdot n \cdot (n' + \alpha_{RDS})^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

V obou vztazích (1 i 2) je A plocha elektrody [cm²], c je koncentrace elektroaktivní analyzované látky v roztoku [mol · cm⁻³], D je difúzní koeficient [cm² · s⁻¹], v je rychlost polarizace elektrody (tzv. *scan rate*, také rychlost gradientu potenciálu) [V · s⁻¹], n je počet elektronů vyměněných během reakce, n' počet elektronů samovolně vyměněných a α je koeficient pro *rate determining step*.

Výsledkem CV je cyklický voltamogram (tedy závislost proudu na napětí), kde nejdůležitějšími údaji je poměr anodického a katodického peaku v maximum a dále hodnota potenciálu v jednotlivých maximech.

Elektrochemická cela je většinou skleněná vodivostní nádoba, do které jsou vkládány používané elektrody (včetně elektrolytu), případně další komponenty (teploměr, míchadlo...). Při návrhu aparatury je nutné brát v potaz vnitřní objem cely, neboť velké cely mohou v kombinaci s nízkými koncentracemi poskytovat tak velký odpor, že měření nepůjde provést. Naopak malé objemy mohou za určitých okolností způsobit rychlý úbytek analyzované látky a vznik nežádoucích produktů. Umístění elektrod v samotné cele je pak dalším důležitým parametrem ovlivňujícím kvalitu měření.

Elektroda lze rozdělit z hlediska funkce na tři typy - referenční, pracovní a pomocné. Na pracovní elektrodě (WE, typicky platina) probíhají redox reakce analytu při změně potenciálu s časem. Konstrukčně by se mělo jednat o elektrodu s co nejmenším povrchem za účelem maximalizace polarizace. Referenční elektroda (referenční, RE) by měla poskytovat v daných podmínkách reverzibilní reakce. Pomocná elektroda (CE) je pak součástí tříelektrodevého systému.

Potenciostat je definován jako zařízení schopné udržovat konstantní potenciál mezi WE a analytem na nastavené hodnotě měřené proti RE. Původně byl používán dvouelektrodeový systém, tedy systém složený pouze z RE a WE; při takovém zapojení však nebylo možné zajistit konstantní potenciál. Ve většině experimentů s potenciostatem je tak používán tříelektrodeový systém, jehož použití zabraňuje posunu potenciálu WE vzniklého koncentrační polarizací. Při takovémto zapojení prochází proud mezi WE a CE; proud tak neovlivňuje RE (přes kterou díky velkému odporu neprochází žádný proud), protože existují dva nezávislé elektrické obvody sdílející spolu pouze WE a samotný elektrolyt.

Transaktinoidy

Transaktinoidy je skupina obsahující 18 prvků s protonovým číslem 104 (rutherfordium) až 121 (unbiunium), kde na ní navazuje skupina prvků s názvem superaktinoidy. Jako supertěžké prvky (SHE) se pak označují prvky s protonovým číslem 104 a větším. V současné době je syntetizováno prvních 15 prvků ($Z = 104 - 118$). Jejich chemické vlastnosti vycházejí ze silného coulombického pole silně nabitých atomových jader, a celková elektronová konfigurace tak bude hrát podstatně větší roli než v případě lehčích prvků. Problematickými při předpovědi chemických vlastností se však staly relativistické efekty.

Jako perspektivní supertěžký prvek, jehož oxidační stavy by bylo možné řídit elektrochemickými procesy, bylo vybráno nihonium. Homology nihonia jsou B, Al, Ga, In a Tl (pseudohomologem je pak Es). Co se týče oxidačních stavů, In se vyskytuje v oxidačních číslech +I, +II a +III, přičemž sloučeniny In^{+1} jsou sice prokázány, ale nejsou považovány za stabilní – nejstabilnějším je stav In^{III} . Oxidační stav Tl^{+1} je velmi stabilní, a to z důvodu vysoké ionizační energie 6s elektronů. Sloučeniny ve stavu Tl^{III} jsou známé, ale jsou považovány za méně stabilní než Tl^{+1} . Tl je snadno rozpustné v kyselinách za vzniku Tl^{+1} , ve vodě pak Tl^{III} vytvářejí komplexy. Pomocí CV byly zkoumány i pouze přechodně existující Tl^{+II} a Tl^{+IV} .

U samotného nihonia je předpoklad stabilních oxidačních stavů +I a +III (vycházející z elektronové konfigurace), přičemž trend ve skupině pak hovoří pro větší stabilitu +I. Kvůli silné relativistické 7s stabilizaci se snižuje sp-interakce působící na chemické vazby a velmi pravděpodobně nebudou stabilní vyšší oxidační stavy tohoto prvku. Nejvyšší oxidační číslo odpovídá skupině, přičemž jsou stabilnější spíše nižší oxidační čísla, tedy +I (předpoklad sloučenin $NhOH$, NhH , NhF). Dále se předpokládá existence stavu +III (předpoklad u NhF_3 , $NhCl_3$, NhH_3 , $NhBr_3$, NhI_3) a +V (například u NhF_5).

Elektrochemické metody výzkumu transaktinoidů

Pro provedení elchem. experimentů je nutné, aby měl analyzovaný radionuklid $T_{1/2}$ delší než 10 s (ze 107 dosud známých se tak jedná pouze o 20 z nich - izotopy Rf, Db, Dg, Bh, Hs, Ds, Rg, Cn a Nh).

V roce 2007 byly provedeny elektrochemické experimenty s ^{212}Pb ($T_{1/2} = 10,6$ hodiny; homolog Fl). Samotné experimenty probíhaly v tříelektrodovém schématu s Ag/AgCl Re a Pt CE (WE s plochou 3 cm² byla během experimentu měněna; byly tedy provedeny experimenty s Pt, Ni, Au, Pd, Cu a Ag). Elektrochemická PEEK cela měla objem 1 mL a jako elektrolyt byla použita 0,1M HCl. Dále byla provedena elektrodepozice ^{212}Pb na pracovní elektrodě za různých teplot i po různou dobu. Po řadě offline experimentů byla aparatura přenastavena na online mód a použity radionuklidy ^{190}Pb , ^{189}Pb , ^{188}Pb a ^{187}Pb (vzniklých ostřelováním Gd terče Ar), které byly transportovány aerosolovým gas-jetem (He s KCl). Experimentální kampaň byla zakončena s výsledkem, že sestavená aparatura bude pravděpodobně vhodná pro elektrodepozici SHE s tím, že vhodným kandidátem pro další experimenty by byl radionuklid ^{270}Hs ($T_{1/2} = 22$ s), u něhož se předpokládají podobné chemické chování jako u Os.

Nagame, Kratz a Schädel ve své práci ([2]) z roku 2015 uvádí, že studium redoxních vlastností SHE je podstatně už jen kvůli silnému vlivu relativistických efektů; na druhou stranu však dodávají, že známé a zaběhnuté elchem. metody (jako např. CV) nebudou moci možná být pro tyto studie použity kvůli relativně malé citlivosti. Zároveň ale uvádí, že je ve výrobě elchem. aparatura, která by byla kompatibilní se systémem SISAk, kde by docházelo k redukci Sg^{+VI} na Sg^{+V} , příp. Sg^{+IV} . Aparatura již byla vyzkoušena na homologích (No, Mo a W) s použitím 0,03M HCl, a to celé za zvýšené teploty mezi 60°C a 90°C (za laboratorní teploty redukce neprobíhala). WE je GCE, která je umístěna do skleněné elchem. cely o objemu 0,54 mL. CE je elektroda Pt a RE 1,0M LiCl-Ag/AgCl.

Metodika realizovaných experimentů

Jako základ aparatury, zdroj proudu a zároveň analyzátor byl využit v rámci popisovaných experimentů potenciostat Gamry Reference 600 (r. v. 2009, Gamry Instruments Inc.), který byl řízen pomocí softwaru Gamry Framework (verze 7.9.0). Kalibrace byla zajištěna použitím UDC4 (Gamry Instruments Inc.). Řídicím zdrojem rotační elektrody byl pak přístroj RDE 710 (Gamry Instruments Inc.).

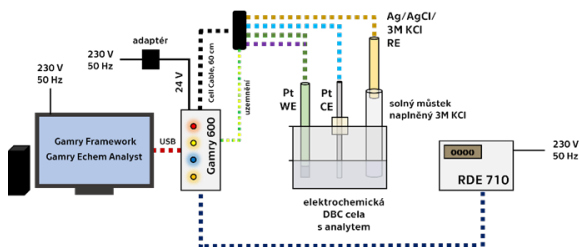
Jako referenční elektroda byla použita argentochloridová Ag/AgCl/3M KCl elektroda (6.0733.100, Metrohm). Pro experimenty s TI pak bylo použito propojení skrz solný můstek naplněný 3M KCl, aby bylo zabráněno kontaminaci frity elektrody. Pt elektroda byla používána jako WE i jako CE, přičemž byly použity celkem tři různé kusy: 1. Pt - pro rotační elektrodu (#932-00024, Gamry Instruments Inc.), destička o průměru 3 mm v PEEK těle; 2. Pt - drátek (#935-00056, Gamry Instruments Inc.) o průměru 0,4 mm, obsah elektrody v roztoku 0,33 cm²; 3. Pt - plíšek (3.109.0790, Metrohm) o rozměrech 0,8 x 0,8 cm, obsah elektrody 1,28 cm². V případě experimentů s indiem byla použita jako pracovní i GCE (Gamry Instruments Inc., #932-00022, destička o průměru 3 mm v PEEK těle).

Pro první fázi experimentů (tzv. zkušební, viz níže) byla používána elektrochemická cela (Metrohm, označení CORR.CELL.S, viz obrázek č. 1) o pracovním objemu cca 500 mL. Kvůli několika technickým problémům souvisejícím se stavem této cely (a zároveň potřebnému velkému objemu analytu) došlo k výměně za DBC celu (Dr. Bob's Glass Cell Jacketed, #930-00037, Gamry Instruments Inc., viz obrázek č. 2, pracovní objem 2-50 mL; v praxi využíván objem 20 mL), ve které byly provedeny experimenty s In a TI. Z konstrukčních důvodů nebylo možné použít rotační platinovou elektrodu jako WE, a proto došlo k jejímu nahrazení Pt plíškem. Jako pomocná elektroda sloužil Pt drátek, který byl uchycen do PP držáku vlastní výroby tak, aby byl zajištěna stále stejná kontaktní plocha s roztokem. RE zůstala elektroda Ag/AgCl spojená s analytem solným můstkem (3M KCl). Veškeré experimenty byly prováděny za přístupu vzduchu.



Obrázek 1 (vlevo a uprostřed): DBC elektrochemická cela (Gamry Instruments Inc.)

Obrázek 2 (vpravo): Elektrochemická cela o objemu 500 mL v experimentálním zapojení (Metrohm)



Obrázek 3: Schéma experimentální aparatury použité pro realizaci experimentů s indiem a thalliem

Vzhledem k dlouhodobému nepoužívání celé experimentální aparatury bylo nutné po jejím sestavení provést řadu experimentů (tzv. zkušební) potvrzujících funkčnost. Byly tedy realizovány experimenty s roztoky NaCl, NaNO₃, (COOH)₂, H₂SO₄ a CH₃OH, kyseliny gallové, kyseliny askorbové a K₄[Fe(CN)₆] v NaNO₃. Na základě výsledků zhruba 300 měření trvajících cca šest měsíců (a provedení řady oprav a úprav aparatury v rámci technologických pauz) byla aparatura shledána funkční.

V období 03-06/2022 pak byly provedeny tři řady experimentů - s indiem, TI₂SO₄ a TlCl. Ve všech třech případech byla RE elektroda argentochloridová (spojená přes solný můstek s 3M KCl), WE (č. 2) a CE (č. 3) platinová. Před každou sérií experimentů došlo ke kalibraci přístroje a omytí a vyleštění elektrod pomocí Al₂O₃ (velikost zrn 0,3 μm, Metrohm, 6.2802.000).

Indium bylo zvoleno k experimentům jako lehčí homolog Nh, avšak kvůli absenci skladových zásob indiových solí bylo nutné přistoupit k jejich produkci. $\text{In}(\text{NO}_3)_3$ (za vzniku 10mM roztoku In v HNO_3 o pH 0,7) byl vytvořen rozpuštěním indiové pájky (99,9% čistota) v koncentrované HNO_3 (68 %, VWR).

Druhá série experimentů byla provedena s těžším homologem india, tedy thalliem ve formě 1mM roztoku Tl_2SO_4 (p. a., Lachema, n. p.) s pozařadovým elektrolytem 0,5M Na_2SO_4 (p. a., Dorapis). Největší množství experimentů bylo provedeno s TlCl (čistý, Lachema, n. p.), respektive s 1mM roztokem TlCl ve směsi s KCl (p. a., Penta) jako pozařadovým elektrolytem (v koncentracích 3, 51, 102, 152 a 200 mM KCl). Výchozí 3mM koncentrace Cl^- byla vybrána především kvůli podobnosti s roztokem používaným v metodě PILS (*Particle Into Liquid Sampler*, dále *PILS roztok*). Pro stěžejní část experimentů byl zvolen právě TlCl, neboť v předpokládaném praktickém využití této aparatury budou v roztoku přítomny transaktinoidy právě spolu s chloridy jako zbytky po aerosolovém transportu.

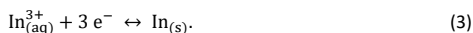
Výsledky

Získaná data (výška a umístění peaků) byla analyzována softwarem Gamry Echem Analyst (Gamry Instruments, Inc., verze 7.9.0). Pro každý druh experimentu bylo provedeno i měření samotného pozařadového elektrolytu - ve všech případech ale byl v místě analyzovaného peaku přítomen pouze zanedbatelný signál, a odečet pozadí tedy nebyl realizován. Vyhodnocování dat bylo realizováno v programu MatLab R2021b (The MathWorks, Inc.)

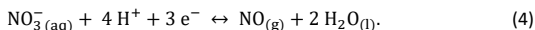
Stěžejní část vyhodnocování zaujmají grafy závislosti výšky peaku na odmocnině scan rate (vycházející ze vztahu 1, resp. 2) a proložení vynesných bodů lineární závislosti. Na základě informací uvedených v odborné literatuře byl použit tvar lineární závislosti $y = a \cdot x + b$, tedy přímkové závislosti s nenulovým absolutním členem. Vzhledem ke skutečnosti, že pro všechny experimenty byla použita Ag/AgCl RE, jsou všechny uvedené potenciály vztaženy pro tuto RE, tedy -0,210 V oproti SHE.

Indium

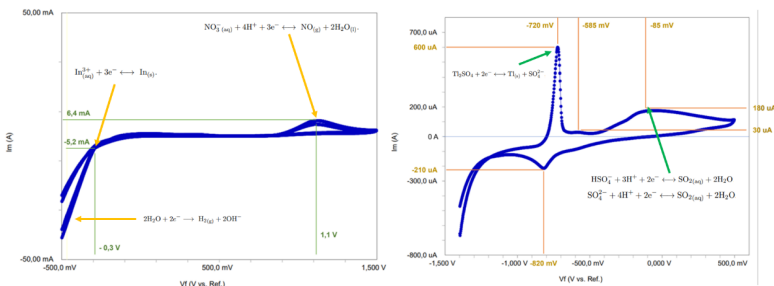
Bylo provedeno celkem 59 měření. V získaných voltamogramech (příklad viz obrázek č. 4) ale nebyl (ani při proměření spektra při různých scan rate v rozsahu 5 až 300 mV/s) viditelný redukční peak při potenciálu -0,5 V, který by odpovídal předpokládané reakci:



Při vyšších hodnotách scan rate (100 mV / s) byl viditelný redukční peak při potenciálu okolo +1,1 V, což odpovídá rozkladu kyseliny dusičné:



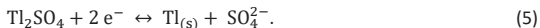
Oxidací peaky nebyly zaznamenány. Při dalších experimentech je tedy nutný výběr jiného pozařadového elektrolytu, který by umožňoval viditelnost těchto peaků, a to po důkladné rešerši chování india v různých vhodných systémech se zaměřením na chloridy.



Obrázek 4 (vlevo): Cyklický voltamogram roztoku india v roztoku HNO_3 (výřez), scan rate 100 mV/s, Ag/AgCl RE, Pt WE, Pt CE
 Obrázek 5 (vpravo): Cyklický voltamogram roztoku 1mM Tl_2SO_4 v 0,5M Na_2SO_4 , scan rate 30 mV/s, Ag/AgCl RE, Pt WE, Pt CE

Síran thallný

Bylo provedeno celkem 28 měření. Zájmovým peakem byla oblast okolo potenciálu -0,7 V, která odpovídá reakci:

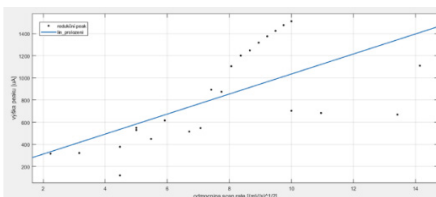


Velikost oxidačních a redukčních peaků však nebyla srovnatelná (poměr 4:1 až 9:1), a jedná se tak bezpochyby o kvazireversibilní proces. Dále je znatelná velmi roztáhlá oblast nárůstu proudu od -0,4 V do zhruba 0 V. Zdrojem tohoto signálu mohou být reakce vycházející z přítomnosti síranů a jejich derivátů v roztoku, tedy jejich rozklad za přítomnosti SO_2 a H_2O .

Vyhodnocování získaných dat proběhlo vynesemím hodnot výšky zájmových peaků (jak oxidačního, tak redukčního) v závislosti na odmocnině ze scan rate (lineární závislost vycházející z rovnice č. 1, resp. č. 2). Grafy s proložením a statistickým vyhodnocením jsou uvedeny na obrázku 6. Pro redukční peak byl koeficient determinace R^2 lineární křivky 0,3949, pro peak oxidační 0,7438; v obou případech tedy nelze hovořit o vhodnosti tohoto proložení. U redukčního peaku byla také zaznamenána řada bodů zcela mimo předpokládanou závislost. Na současně úrovni znalostí o aparatuře nebylo možné tyto hodnoty přiřadit konkrétnímu procesu – ať už se jednalo o parazitní jev nebo o interferenci, systém bude v navazujících experimentech detailně proměřen, aby bylo možné vyloučit nežádoucí jevy a získat koeficienty předpokládané lineární funkce s menšími nejistotami.

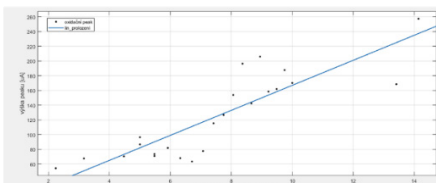
Redukční peak – Ti_2SO_4

Linear model:
 $f(x) = p1 \cdot x + p2$
 Coefficients (with 95% confidence bounds):
 $p1 = 90.36 (42.18, 138.5)$
 $p2 = 131.3 (-266.9, 529.6)$
Goodness of fit:
 SSE: $2.416e+06$
 R-square: 0.4075
 Adjusted R-square: 0.3806
 RMSE: 331.4

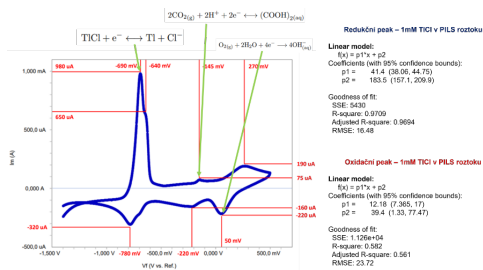


Oxidační peak – Ti_2SO_4

Linear model:
 $f(x) = p1 \cdot x + p2$
 Coefficients (with 95% confidence bounds):
 $p1 = 16.98 (12.46, 21.5)$
 $p2 = -2.76 (-38.88, 33.36)$
Goodness of fit:
 SSE: $1.814e+04$
 R-square: 0.7441
 Adjusted R-square: 0.7319
 RMSE: 29.39

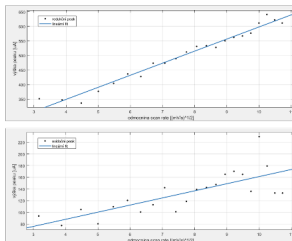


Obrázek 6: Proložení získaných dat přímkovou závislostí pro oxidační a redukční peak roztoku síranu thallného (roztok 1mM síranu thallného v 0,5M síranu sodném jako pozadový elektrolyt, Ag/AgCl RE, Pt WE, Pt CE)



Redukční peak – 1mM TlCl v PILS roztoku
Linear model:
 $f(x) = p1 \cdot x + p2$
 Coefficients (with 95% confidence bounds):
 $p1 = 41.4 (38.06, 44.73)$
 $p2 = 183.5 (157.1, 209.9)$
Goodness of fit:
 SSE: 6430
 R-square: 0.9709
 Adjusted R-square: 0.9694
 RMSE: 16.48

Oxidační peak – 1mM TlCl v PILS roztoku
Linear model:
 $f(x) = p1 \cdot x + p2$
 Coefficients (with 95% confidence bounds):
 $p1 = 12.18 (7.265, 17)$
 $p2 = 26.4 (1.33, 77.47)$
Goodness of fit:
 SSE: $1.126e+04$
 R-square: 0.562
 Adjusted R-square: 0.561
 RMSE: 23.72



Obrázek 7 (vlevo): Cyklický voltamogram 1mM chloridu thallného v 0,1M KCl, scan rate 55 mV/s, Ag/AgCl RE, Pt WE, Pt CE
 Obrázek 8 (vpravo): Proložení získaných dat přímkovou závislostí pro peaky 1mM TlCl v PILS, Ag/AgCl RE, Pt WE, Pt CE

Chlorid thallný

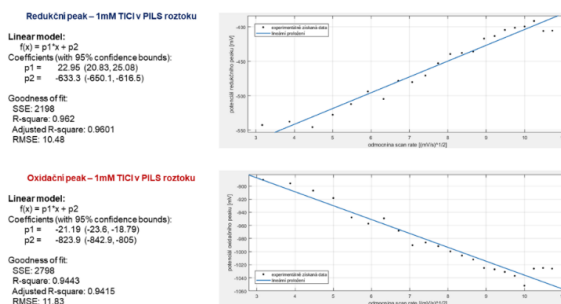
Při experimentech s TlCl bylo provedeno celkem 140 měření. Zájmový peak je totožný s peakem při experimentech se Tl_2SO_4 , tedy potenciál -0,7 V, resp. -0,8 V, avšak tentokrát odpovídající reakci:



Peak na potenciálu -0,7 V je však tzv. dubletem, kterážto skutečnost je tím viditelnější, čím víc se zvyšuje koncentrace KCl (u PLS roztoku není náznak přítomnosti dubletu); je tedy předpokladem, že druhý z peaků je způsoben přítomností K^+ a/nebo Cl^- . Konkrétní reakce nebyla zjištěna.

Další signál v redukční oblasti je peak odpovídající potenciálu zhruba -0,15 V; v oblasti oxidační pak -0,2 V. Tyto signály by teoreticky mohly odpovídat reakci vzniku, resp. rozkladu kyseliny šťavelové na CO_2 (potenciál -0,22 V).

Vyhodnocení výšky redukčního a oxidačního peaku thallia pro 1mM TlCl v PLS roztoku je uvedeno na obrázku číslo 8. Oba dva soubory dat byly proloženy přímkou; u redukčního peaku bylo dosaženo R^2 0,9709, u oxidačního nižšího – 0,582. Opět bude nutné identifikovat procesy a parazitní jevy.



Obrázek 9: Graf závislosti potenciálu red. a ox. peaku v závislosti na odmocnině scan rate (1mM chlorid thallný v 3mM roztoku chloridu draselného, Ag/AgCl RE, Pt WE, Pt CE)

Diskuse

Stěžejním problémem celé práce bylo velké množství technických problémů, které byly způsobeny dlouhodobým nevhodným skladováním aparatury a absencí většího množství součástek a návodů. Během prvních šesti měsíců ale došlo ke zprovoznění celé aparatury a nákupu chybějících či poškozených součástí, tudíž pro experimenty s Tl byla aparatura již v plném rozsahu použitelná.

Pro jednotlivé experimentální kampaně se stejným vzorkem nebyl připravován nový roztok pro každé měření, ale byl použit totožný roztok opakovaně, neboť byl předpoklad zanedbatelné změny koncentrace v průběhu opakovaných měření. Například v případě experimentu s 1mM TlCl (scan rate 35 mV/s) prošel roztokem elektrický náboj o velikosti 1,3 mC, tedy přeměna $1,36 \cdot 10^{-8}$ molu Tl^{I} na Tl^0 . Pro experimenty s DBC celou bylo použito 20 mL 1mM roztoku. Jedním měřením tedy dojde ke ztrátě 0,06 % původního Tl^{I} . K poklesu původní koncentrace o 1 % tedy dojde až po 16 měřeních. Takového počtu měření s jedním vzorkem nebylo dosaženo.

Jak již bylo uvedeno výše, peaky, které by odpovídaly elchem reakci In, nebyly zaznamenány. Naopak peaky rozkladu H_2O a HNO_3 byly viditelné i při měření čistého pozaodňového elektrolytu. Použití jiné WE (GCE místo Pt) také nemělo vliv na získaný signál. Důvodem této absence signálu velmi pravděpodobně také není nízká koncentrace analytu, jež je desetkrát vyšší než koncentrace, které byly v některých případech používány při zkušebních experimentech. Vliv na probíhající děje má jistě také případná hydrolyza či komplexace; tyto jevy ale byly dostatečně potlačeny použitím nízkého pH roztoku. Je však nutné říci, že chování india ve vodných roztocích je ve vědě stále neuzavřená téma.

Také bylo zjištěno, že se zvyšující se hodnotou scan rate dochází k posunu red. peaku směrem k vyšším potenciálům, u ox. je tomu naopak (viz obrázek č. 9); toto zjištění je v souladu s literaturou.

Během samotné realizace experimentů byl několikrát zpochybněn dobrý technický stav Ag/AgCl RE. Před zahájením dalších experimentů je tedy naplánována výměna této součásti aparatury. Také je možnost použití dalších elektrod (GCE, Sb, Hg...) a jejich kombinací za účelem zjištění optimální konstrukce aparatury, případně možnost použití mikroelektrod, které by měly poskytovat výsledky s menším šumem.

Sestrojená aparatura je určena pro řízení oxidačního stavu (homologů) transaktinoidů v průtokových extrakčních systémech. Při udržování konstantního potenciálu na elektrodách je řízení reálné - při provedených experimentech bylo přeměněno zhruba 10^{-8} molu Tl^{+I} při maximálním proudu 1,5 mA. Při maximálním možném výstupním proudu potenciostatu 600 mA a nastavení správného potenciálu je možné okamžitě přeměnit cca $4 \cdot 10^{-6}$ molu Tl^{+I} , což je srovnatelné s množstvím, které bude získáváno v extrakčních systémech, a lze tedy uvést, že tato elektrochemická aparatura bude použitelná i v oblasti řízení oxidačního stavu (homologů) transaktinoidů.

Závěr

Na základě zhruba 530 měření bylo shledáno, že elektrochemická aparatura (jejímž základem je potenciostat Gamry Reference 600) je schopna analyzovat oxidační stav milimolárních množství thallia jakožto homologu nihonia v roztocích o objemu 20 mL.

Je předpoklad, že při dalších experimentálních kampaních dojde k použití radionuklidů homologů Nh, tedy primárně ^{201}Tl ($T_{1/2} = 3,04$ d). Po ověření funkčnosti aparatury i pro tento radionuklid bude následně realizována kampaň na cyklotronu, kdy budou analyzovány krátkodobé homology vzniklé ostřelováním zlatého terče heliony. Z dostupných výsledků z minulých experimentálních kampaní [3] je předpoklad vzniku ^{193}Tl ($T_{1/2} = 21,6$ min), ^{194}Tl (33 min), ^{195}Tl (1,16 h), ^{196}Tl (1,84 hod), ^{197}Tl (2,84 hod) a ^{199}Tl (7,42 hod). V této kampani bude elektrochemická aparatura zařazena za PILS aparaturu a před mikrofluidní extrakční aparaturu.

Literatura

- [1] SOCHOR, Jakub. *Elektrochemické řízení oxidačního stavu homologů transaktinoidů*. Praha, 2022. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská. Vedoucí práce Mojmir NĚMEC.
- [2] NAGAME, Yuichiro; KRATZ, Jens Volker; SCHÄDEL, Matthias. Chemical studies of elements with Z104 in liquid phase. *Nuclear Physics A*. 2015, roč. 944, s. 614–639. issn 0375-9474. Dostupné z doi: <https://doi.org/10.1016/j.nuclphysa.2015.07.013>. Special Issue on Superheavy Elements.
- [3] SOCHOR, Jakub. Studium přípravy a vlastností homologů supertěžkých prvků. Blovice, 2019, 132 s. Maturitní práce. Gymnázium Blovice. Vedoucí práce Mojmir NĚMEC.

Poděkování

Poděkování patří doc. Mojmiru Němcovi, prof. Janu Johnovi, doktoru Pavlu Bartlovi a doktorce Miroslavě Semelové za pomoc při provádění tohoto výzkumu. Práce byla ve své první půli realizována v rámci projektu "Development of a method for radiochemical separation and identification of neutron-rich isotopes of heavy elements produced in heavy ion nuclear reactions at single atoms level", na kterém spolupracovala KICH FJFI ČVUT a Flerov Laboratory of Nuclear Reactions / Joint Institute for Nuclear Research.

Zpracování koncentráту z membránových procesů

Jan Vespalec

Martina Repková, Michaela Vašínová Galiová

Vysoké Učení Technické v Brně,

Fakulta chemická,

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká republika

Jan.Vespalec@vutbr.cz

1 Úvod

Jedna z hlavních denních potřeb lidstva je voda, a to voda o určité jakosti. Celosvětově je problém s kvalitou zdrojů vody. Alternativou k hledání zdrojů vody je použití vyčištěné odpadní vody jak pro účely pitné vody nebo pro účely užitkové vody. Vyčištěná odpadní voda je již dostatečně čistá a vhodná jako zdroj vody po řádném dočištění. K dočištění se ve většině případů používají membránové procesy. Produktem membránových procesů je kromě permeátu (voda o vhodné kvalitě) také koncentrát, který obsahuje zakonzentrované polutanty ze surové vody [1–4].

V této práci byla použita poloprovodní recyklační jednotka tvořena dvěma membránovými procesy (ultrafiltrace a reverzní osmóza), doplněnými o granulované aktivní uhlí (GAU) a UV lampu. Získaný koncentrát z reverzní osmózy byl následně zpracován na vakuové odparce.

S koncentrátem z reverzní osmózy je třeba nakládat s rozvahou z jaké surové vody byl koncentrát vyprodukován. Koncentrát může obsahovat vysoké hodnoty vybraných ukazatelů a může být klasifikován jako nebezpečný odpad. V případě že se jedná o nebezpečný odpad je potřeba s daným odpadem nakládat podle platné legislativy.

2 Materiál a metody

2.1 Odběrná místa

Vzorky byly odebírány ze dvou míst:

- Čistírna odpadních vod (ČOV)

Jednalo se o městskou ČOV o 640 000 ekvivalentních obyvatel. Zde byla recyklační jednotka testována pro budoucí případně rozšíření na produkci pitné, průmyslové či užitkové vody.

- Průmyslová prádelna
Průmyslová prádelna obsahovala dvě prací linky a dále šest velkoobjemových praček. Recyklační jednotka zde byla umístěna pro opětovné využití prací vody. Permeát je velmi měkká voda, tudíž vhodná pro praní.

2.2 Technologický proces

Na obou odběrných místech byla umístěna stejná membránová technologie, která má následující parametry:

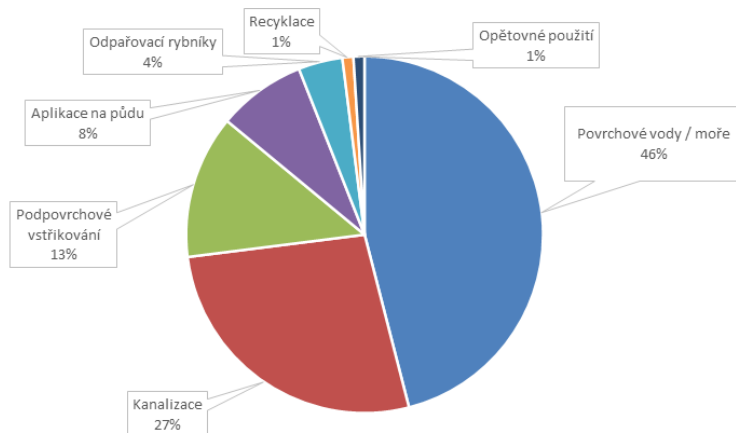
- Modul ultrafiltrace – INGE XL-1,5 MB-40 s membránou MULTIBORE® 1.5. V provozu dead-end s nastaveným transmembránovým tlakem 0,7/0,5 bar.
- Membrána reverzní osmózy – CSM® 4040-BLF, LENNTECH s nastaveným transmembránovým tlakem 5,5/4,5 bar.

Použitá recyklační jednotka umístěná na čistírně odpadních vod měla nátok z výstupu odtékající přečištěné vody z ČOV a byla vybavena ultrafiltrací, granulovaným aktivním uhlím, UV lampou a reverzní osmózou. Vzorky byly odebírány za reverzní osmózou z koncentráту. Bylo odebráno celkem 13 vzorků.

Recyklační jednotka umístěna v průmyslové prádelně byla napojena na odpadní vodu z prádelny, a byla rozšířena o flotační před jednotku. Následovala ultrafiltrace, granulované aktivní uhlí, UV lampa a reverzní osmóza. Vzorky byly odebírány za reverzní osmózou z koncentráту. Byly odebrány celkem 4 vzorky.

2.3 Zpracování koncentráту

Při zpracování koncentráту je třeba hledět na původ surové vody. V některých případech není příliš složité řešení vypouštění koncentráту. Například při produkování pitné vody prostřednictvím odsolování mořské vody dochází k produkci koncentráту, který má mírně vyšší salinitu než mořská voda. Tento koncentrát je možné vypouštět zpátky do moře za splnění určitých bezpečnostních opatření. Při používání reverzní osmózy v průmyslu dochází k produkci koncentráту s možným zvýšeným výskytem těžkých kovů. Studie Khan a kol. [2]. byla zaměřena na zmapování vypouštění koncentráту, procentuální rozložení je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1.: Možnosti likvidace koncentrátu [5]

- Vypouštění do povrchových vod / moře**
 Jedná se o vypouštění koncentrátů produkovaných zejména při odsolování mořské vody za účelem produkce pitné a užitkové vody [2, 5].
- Kanalizace**
 Koncentrát se nejčastěji vypouští do kanalizační sítě v případě průmyslových objektů ve vnitrozemí, které nemají možnost vypouštět do moře nebo dostatečné finanční prostředky pro vlastní čistírnu odpadních vod [2, 5]. Vypouštění koncentrátu bude však ve většině případů narážet na komplikace ve formě limitů pro vypouštění do kanalizační sítě. Je nutné tedy vypouštění konzultovat se subjektem spravující místní kanalizační síť. Ve většině případů je možné vyhovět požadavkům vypouštění i vyšších koncentrací za jisté finanční kompenzace nákladů za dočištění.
- Podpovrchové vstřikování**
 V tomto případě likvidace se jedná o přímou injektáž koncentrátu pod povrch ať už se jedná o puklinu nebo do ropného dolu. S touto metodou likvidace jsou spojena určitá rizika je nutné brát ohled na vlastnosti koncentrátu [2, 5].
- Aplikace na půdu**
 Od tohoto řešení se postupně odpouští z důvodu devalvace půdy. Rovněž dochází ke kontaminaci podzemních vod a krajina se stává neúrodnou [2, 5].
- Odpařovací rybníky**
 Koncentrát lze zpracovat i procesem „zero liquid discharge“ tedy že veškerý odpad zůstává ve formě vysušené solanky. K tomu lze použít tzv odpařovací rybníky, což jsou nádrže o velkém povrchu uzpůsobené k rychlému odparu. Alternativou k volnému odparu je nucený odpar, kdy používáme odparku nebo vakuovou odparku pro urychlení procesu. Takto zpracovanou solanku je možné recyklovat nebo ji umístit na skládku [2, 5].

V této práci bylo zkoumána možnost využití alternativy k odpařovacímu rybníku, a to vakuové odparky. Po vakuové odparce může následovat likvidace solanky na skládku, recyklace nebo opětovného využití.

- **Recyklace**

Ze solanky je možné extrahovat kovy a další minerály, které je možné použít jako vstupní surovinu v jiném sektoru průmyslu. Tato likvidace je málo používána z důvodu nutné specifické technologie pro recyklaci, a tedy nutnosti přepravovat solanku na velké vzdálenosti ke zpracování [1, 2, 5, 6].

- **Opětovné použití**

Solanku lze opětovně využívat pro vnitrozemské solné akvakultury. V Austrálii probíhal výzkum využití solanky pro rozvoj farem s mořskými rybami. Rovněž zde je problém kvality koncentráту z hlediska nebezpečných látek [2, 5].

2.4 Analytické metody

Celkem bylo analyzováno 14 ukazatelů (pH, rozpuštěné látky a 12 prvků). pH bylo měřeno pomocí Multimetry HI 5522 od společnosti Hanna Instruments Czech s.r.o.. Analýza rozpuštěných látek (RL) byla provedena podle ČSN 75 7346 (Jakost vod – Stanovení rozpuštěných látek). Prvky byly měřeny pomocí hmotnostní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu (ICP-MS Agilent 7500ce) od společnosti Agilent Technologies, Inc. Pro měření na ICP-MS byly vytvořeny kalibrační řady ze směšného standardu (ASTASOL® AN9090MN, od společnosti ANALYTIKA®, spol. s r.o.) a ze samostatného standardu s fosforem (ASTASOL® CZ9040(15), od společnosti ANALYTIKA®, spol. s r.o.)

2.5 Klasifikace koncentráту a solanky jako nebezpečného odpadu

Koncentrát z membránových procesů potažmo solanka po odpařování vody z koncentráту může dosahovat vysokých koncentrací a může být klasifikován jako nebezpečný odpad. Klasifikací nebezpečného odpadu se zabývá zákon č. 541/2020 Sb. (Zákon o odpadech) kde je definován vyhláškou č. 8/2021 Vyhláška o Katalogu odpadů a posuzování vlastností odpadů (Katalog odpadů), která v Příloze č. 2 obsahuje tabulku č. 2 s limitními hodnotami výluhu pro hodnocení nebezpečných vlastností odpadu H15. V této tabulce je uvedeno 17 ukazatelů (pH, rozpuštěné látky, fluoridy, jednosytné fenoly a 13 prvků viz Tab. 1.). Z ukazatelů byly sledovány následující: pH, RL, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Zn, Mo a B. K těmto ukazatelům byl přidán fosfor kvůli předpokladu vyšších koncentrací. Zvýšená koncentrace je očekávána z důvodu práce s odpadními vodami z průmyslové rafinérie.

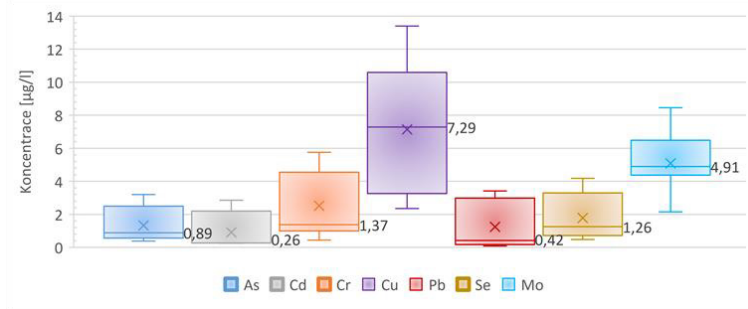
3 Výsledky a diskuse

Před rozhodnutím, jakými způsoby lze zpracovat koncentrát musí předcházet analýza. Je nutné zjistit, zda se jedná o běžný odpad nebo zda spadá do kategorie nebezpečný odpad. U každého odběrového místa jsou i odlišné metody likvidace koncentráту.

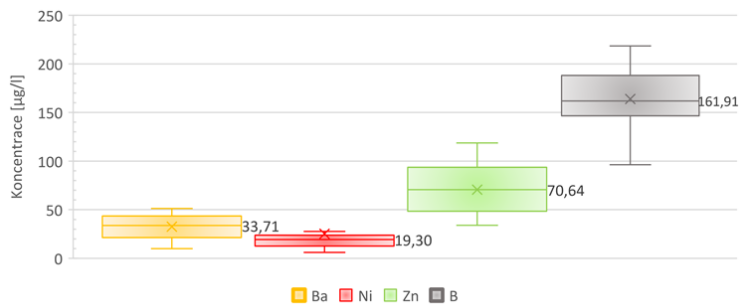
3.1 Čistírna odpadních vod

Při analýze koncentrátů z reverzní osmózy vyšla průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou: pH $7,85 \pm 0,16$; RL $2\,064 \pm 305$ mg/l a u prvků (As, Ba, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Zn, Mo, B) je graficky znázorněno (maximum, 3. kvartil, medián – včetně čísla, křížek je střední hodnota, 1. kvantil a minimum) na Obr. 2. a 3.

Data získaná ze vzorku koncentrátů nepřevyšují limity pro klasifikaci jako nebezpečný odpad. Avšak ze všech sledovaných ukazatelů byly rozpuštěné látky nejbližší k limitu. Rozpuštěné látky dosahovaly koncentrace $2,1 \pm 0,3$ g/l z limitu 8,0 g/l.



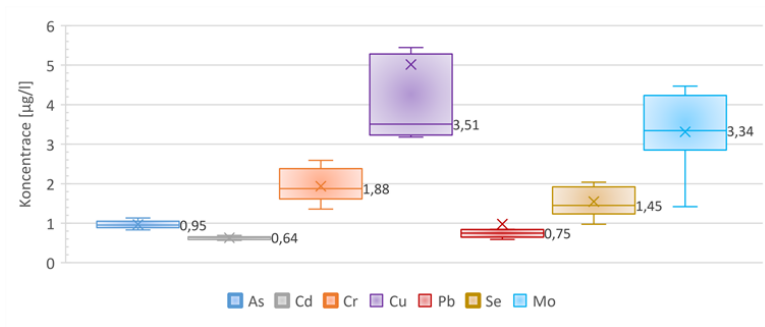
Obr. 2. Koncentrát z reverzní osmózy – ČOV



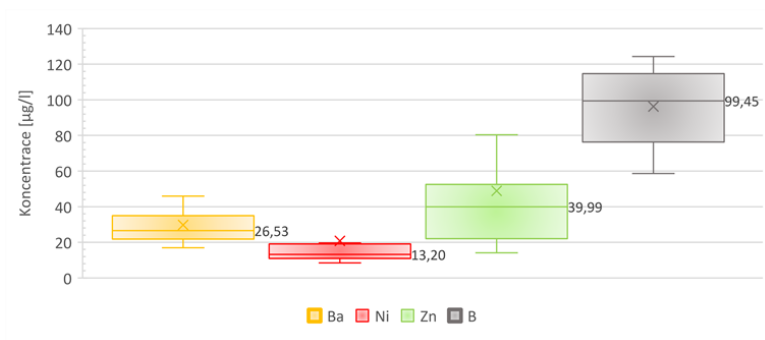
Obr. 3. Koncentrát z reverzní osmózy – ČOV

Při analýze solanky z koncentrátů byla zkoumána koncentrace u prvků (As, Ba, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Zn, Mo, B). Výsledné koncentrace jsou znázorněny graficky (maximum, 3. kvartil, medián – včetně čísla, křížek je střední hodnota, 1. kvantil a minimum) na Obr. 4. a 5.

Data získaná ze vzorku solanky nepřevyšují limity pro klasifikaci jako nebezpečný odpad. A je tedy možné tento odpad likvidovat na skládku standardním postupem. To zda by se ekonomicky vyplatila recyklace je otázkou dalších studií.



Obr. 4. Solanka z koncentrátu – ČOV

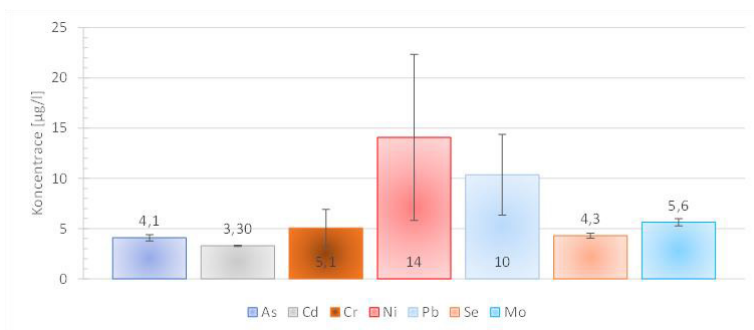


Obr. 5. Solanka z koncentrátu – ČOV

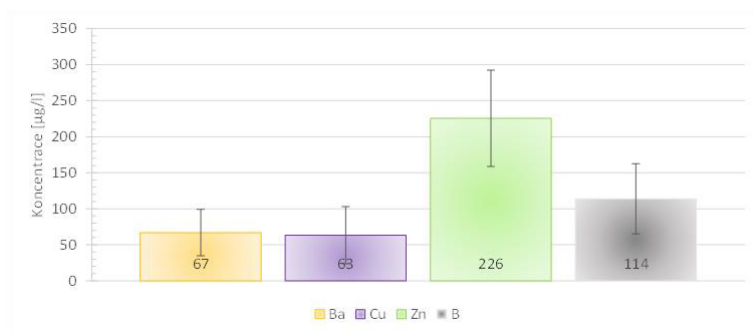
3.2 Průmyslová prádelna

Při analýze koncentrátu z reverzní osmózy vyšla průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou: pH $7,8 \pm 0,3$; RL $2\ 664 \pm 839$ mg/l; fosfor 53 ± 17 mg/l a u prvků (As, Ba, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Zn, Mo, B) je graficky rovněž znázorněna průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou na Obr. 6. a 7.

Data získaná ze vzorku koncentrátu nepřevyšují limity pro klasifikaci jako nebezpečný odpad. Avšak ze všech sledovaných ukazatelů byly rozpuštěné látky nejbliže k limitu. Rozpuštěné látky dosahovaly koncentrace $2,6 \pm 0,8$ g/l z limitu 8,0 g/l. Jednou z možností likvidace koncentrátu je vypouštění jej do kanalizační sítě. Ve vzorcích z průmyslové prádelny byl sledován rovněž fosfor, pro předpoklad vyšší koncentrace z pracích prášků. Naměřené množství fosforu může být komplikací při likvidaci odpadu do kanalizační sítě.



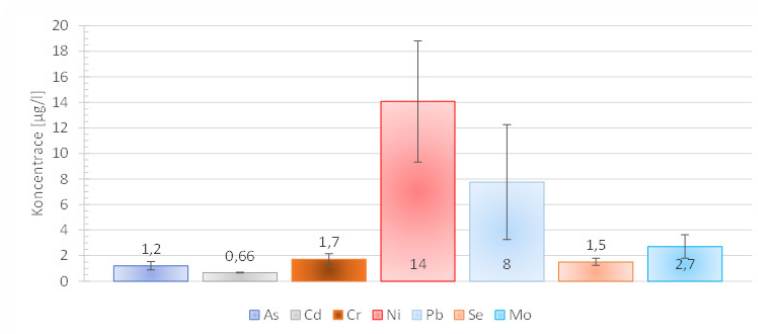
Obr. 6. Koncentrát z reverzní osmózy – Průmyslová prádelna



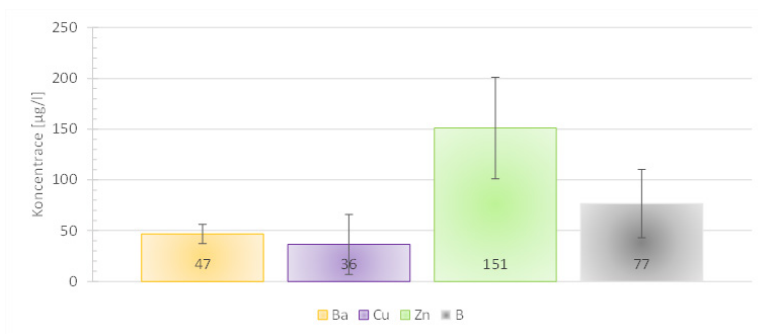
Obr. 7. Koncentrát z reverzní osmózy – Průmyslová prádelna

Při analýze solanky z byla zkoumána koncentrace u prvků (As, Ba, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Zn, Mo, B). Výsledné koncentrace jsou znázorněny graficky jako průměrná hodnota se směrodatnou odchylkou na Obr. 8. a 9.

Data získaná ze vzorku solanky nepřevyšují limity pro klasifikaci jako nebezpečný odpad. A je tedy možné tento odpad likvidovat na skládku standartním postupem. To zda by se ekonomicky vyplatila recyklace je otázkou dalších studií.



Obr. 8. Solanka z koncentrátu – Průmyslová prádelna



Obr. 9. Solanka z koncentrátu – Průmyslová prádelna

4 Závěr

Všechny sledované ukazatele byly pod limitem klasifikace jako nebezpečný odpad, což je pro jakýkoliv podnik nakládající s odpadem dobrá ekonomická zpráva. S odpadem ve formě koncentrátu lze nakládat vypouštěním do kanalizační sítě nebo v rámci ČOV zařazením odpadu na počátek toku na čistírnu. V případě vypouštění koncentrátu z průmyslové prádelny by bylo zapotřebí požádat o povolení vypouštět nadlimitní hodnoty koncentrace fosforu. Odpad ve formě solanky lze likvidovat na skládku nebo se pokusit o recyklaci těžkých kovů. I nadále bude probíhat vzorkování průmyslové prádelny, a to až do konce roku 2022. Dále bude věnována pozornost možnosti recyklace těžkých kovů ze solanky.

5 Literatura

- [1] SHANMUGANATHAN, S., M.A.H. JOHIR, A. LISTOWSKI, S. VIGNESWARAN a J. KANDASAMY. Sustainable Processes for Treatment of Waste Water Reverse Osmosis Concentrate to Achieve Zero Waste Discharge: A Detailed Study in Water Reclamation Plant. *Procedia Environmental Sciences* [online]. 2016, 35, 930–937 [vid. 2022-11-15]. ISSN 1878-0296. Dostupné z: doi:10.1016/J.PROENV.2016.07.076
- [2] KHAN, Stuart J., David MURCHLAND, Michelle RHODES a T. David WAITE. Management of Concentrated Waste Streams from High-Pressure Membrane Water Treatment Systems. <http://dx.doi.org/10.1080/10643380701635904> [online]. 2009, 39(5), 367–415 [vid. 2022-11-15]. ISSN 15476537. Dostupné z: doi:10.1080/10643380701635904
- [3] PANDIT, Aniruddha B. a Jyoti Kishen KUMAR. Clean Water for Developing Countries. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* [online]. 2015, 6, 217–246 [vid. 2022-11-15]. ISSN 19475438. Dostupné z: doi:10.1146/ANNUREV-CHEMBIOENG-061114-123432
- [4] KWIECIŃSKA-MYDLAK, Anna, Włodzimierz SIERADZKI, Barbara JAGUSTYN a Karolina WODZIŚLAWSKA. The use of membrane filtration for removal of aluminum from drinking water sources. *DESALINATION AND WATER TREATMENT* [online]. 2021, 243, 75–82 [vid. 2022-11-15]. Dostupné z: doi:10.5004/DWT.2021.27868
- [5] MICKLEY, Mike. Review of Concentrate Management Options. nedatováno.
- [6] DE ALMEIDA, Ronei, Raphael Ferreira PORTO, Bianca Ramalho QUINTAES, Daniele Maia BILA, Maria Cristina LAVAGNOLO a Juacyara Carbonelli CAMPOS. A review on membrane concentrate management from landfill leachate treatment plants: The relevance of resource recovery to close the leachate treatment loop. *Waste Management and Research* [online]. 2022 [vid. 2022-11-15]. ISSN 10963669. Dostupné z: doi:10.1177/0734242X221116212/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0734242X221116212-FIG5.JPEG

Poděkování

Rád bych zde poděkoval firmě ASIO, spol. s r.o. za technickou podporu a spolupráci.

*Sekce studentů doktorských
studijních programů*

Tématický okruh vědy o živé přírodě a environmentální vědy

CHARACTERIZATION OF BIOLOGICAL EFFECTS OF EXTRACTS OBTAINED FROM YEASTS

Blažková. J.¹, Špačková D.¹, Sikorová P.¹, Sniegoňová P.¹, Szotkowski M.¹, Márová I.¹

*¹Brno University of Technology,
Faculty of Chemistry,
Institute of food science and biotechnology
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic
225799@vutbr.cz*

1 Introduction

Carotenogenic yeasts belong to the class Basidiomycota, which includes the following yeast genera: *Cystofilobasidium*, *Rhodotorula* and *Sporobolomyces*. All these genera are characterized by overproduction of carotenoids. If these genera have ideal conditions, they also produce high amounts of lipids. In addition, these lipids consist of fatty acids characterized by a high content of polyunsaturated and monounsaturated fatty acids, which find a wide range of uses in the food, pharmaceutical and agricultural industries. Therefore, carotenogenic yeasts are increasingly being investigated in the biotechnological industry ^{1,2,3}.

Among other things, immunologically active β -glucans, which are part of their cell walls, can be isolated from yeast. These polysaccharides have significant effects in modulating the immune response, among other things, they also act against the deposition of cholesterol in blood vessels or help to lower blood sugar levels ^{4,5}.

Toxic metals are becoming more and more common in nature. Microorganisms can accumulate these metals from the environment in their cells and develop systems that help them detoxify these metals and gain tolerance to them. These systems may include substances with a bioactive or antioxidant effect on human health. For this reason, it is desirable to find out if there is a way to use heavy metals to increase the production of pharmacologically usable substances or to supplement essential elements, which are often lacking in the diet ⁶.

2 Experimental

2.1 Study objectives

Cultivation methods of selected names needed to be optimized for high production of lipophilic metabolites.

It was also necessary to introduce extraction and analysis procedures for the determination of lipophilic substances and pigments.

The main objectives of the study were focused on obtaining data from continuous cultivation associated with the application of suitable stress factors.

Stress factors:

- Selenium
- Cobalt
- Oxidative stress

2.1 Materials and methods

Carotenogenic yeast inoculation cultures (*Rhodotorula mucilaginosa* - Rm, *Rhodosporidium toruloides* - Rt, *Cystofilobasidium macerans* - Cm, *Rhodotorula kratochvilovae* - Rk, *Sporidiobolus metaroseus* - Sm, *Sporidiobolus pararoseus* - Sp,) were cultured on YPD medium with double submersion inoculation. Then the production medium was inoculated in a ratio of 1:5 from Inoculum II (10 ml of culture and 50 ml of production medium). Cultivation was carried out for 96 hours and selected stress factors were added to the production media after inoculation.

Metal stress: selenate and cobalt cations were added as stress factors in the form of a 0.183 M solution. The volumes of the stock solution used were in the range from 0.00 μl to 137.00 μl , the effect of individual concentrations was related to the control sample, to which no stress factors were applied. The first phase of the experiment was to apply all 5 concentrations of both ions to each carotenogenic yeast strain. After that, the concentration of both cations was selected for each strain, which most favorably influenced the production of biomass and the determined substances.

The second phase of the experiment was that selected concentrations were applied as terminal stress factors after 48 and after 72 hours of cultivation. Subsequently, it was investigated what effect stress factors had on the production of biomass and monitored metabolites, compared to the control medium, where no stress factors were added. From the media to which selected concentrations of metals were added after 48 hours, 10 ml was taken the next day, which was processed in the same way as the rest of the biomass after the end of cultivation.

Concentration of metal cations used:

Designation		Volume of stock solution [μl]
Se-control	Co-control	0,00
Se_1	Co_1	27,25
Se_2	Co_2	54,75
Se_3	Co_3	82,25
Se_4	Co_4	109,50
Se_5	Co_5	137,00

Selected concentrations of stress factors for individual strains:

Strain	Selected cobalt concentration	Selected concentration of selenium
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	Co_1	Se_1
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	Co_1	Se_1
<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	Co_1	Se_5
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	Co_1	Se_2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (24)	Co_3	Se_3
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (28)	Co_1	Se_1
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Co_1	Se_3

Another stress factor whose influence was tested was oxidative stress induced by hydrogen peroxide solution of different concentrations, which was added in the exponential phase of culture growth, i.e., after 72 hours of cultivation. The solutions were diluted in 10 ml of distilled water so that 88.21 μ l of solution, but of different concentrations, was pipetted into each culture.

Concentration of hydrogen peroxide used to prepare solutions:

Concentration [mM]	Volume 30% H ₂ O ₂ [μ l]	Dilution	Pipette volume of stock solution to 10 ml H ₂ O [μ l]
0,1	0,35	250x	40
0,25	0,88	100x	100
0,5	1,76	50x	200
2,5	8,82	10x	1000

The biomass was centrifuged, lyophilized, and analyzed gravimetrically. In order to obtain information about the produced carotenoids, ubiquinone, sterols non-polar extracts were subjected to HPLC analysis. Analysis was performed on a Thermo Fischer Scientific HPLC on a Kinetex EVO C18 column (particle size 2.6 μ m, length 150 mm, Phenomenex).

A kit from the Megazyme company was used to determine the number of β -glucans from yeast, which is based on the enzymatic breakdown of polysaccharides into D-glucose monomers. The representation of β -glucans was then calculated using the Excel program.

3 Results and Discussion

3.1 Effect of cobalt and selenium on metabolite production by *Sporidiobolus pararoseus*

Selenium concentration had a positive effect on the increase in biomass, an increasing trend was observed up to the Se_3 concentration, where the increase in biomass reached a maximum, i.e., 1.5 g/l, after which it decreased again slightly, however, for all concentrations, biomass production was higher than in the control the media. A similar trend can be observed for cobalt, where only low concentrations of cobalt showed a higher

biomass production than the control with a maximum at the Co_2 concentration, after which the production decreased slightly.

All concentrations of selenium induced the production of a significant amount of torularhodin, the production of which was not observed at all in the control medium. The production of metabolites was very positively influenced by the concentration of Se_2, which showed the greatest production not only of torularhodin, but also of beta-carotene, ubiquinone and total carotenoids. At this concentration, the maximum content of ergosterol is also noticeable, which was 11.95 mg/g of biomass, whereas in the control medium it was only 8.33 mg/g of biomass. The concentration of these metabolites decreased with increasing selenium concentration; therefore, the concentration of Se_2 appears to be optimal.

Although the production of both ergosterol and ubiquinone mainly decreased with increasing cobalt concentration, lower concentrations supported the production of total carotenoids, beta-carotene, torulene and torularhodin. The concentrations of Co_1, Co_2 and Co_4 even resulted in significant production of lycopene, which was not represented at all in the control medium.

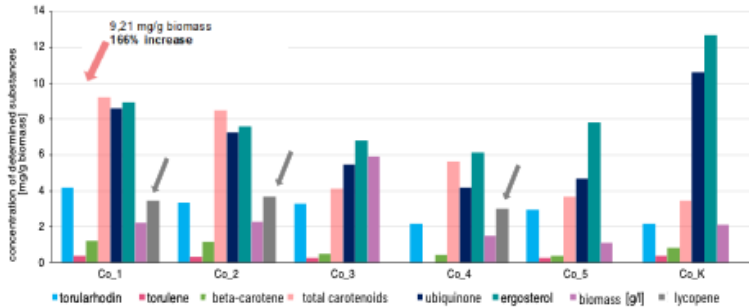


Figure 1: Graphical representation of production of selected metabolites as a function of cobalt concentration

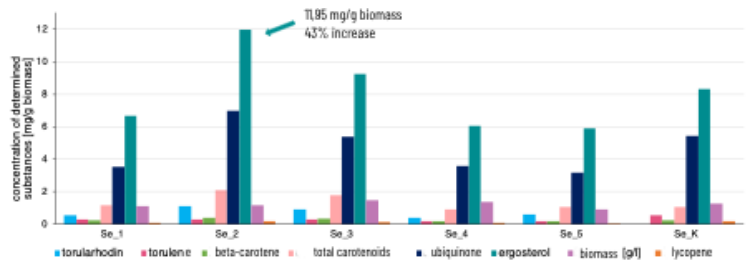


Figure 2: Graphic representation of production of selected metabolites as a function of selenium concentration

3.2 Effect of stress factors in the exponential phase of growth on metabolite production and lipid accumulation in cells of the strain *Sporidiobolus parvoseus*

The addition of stress factors did not have a significant effect on biomass growth. While it had a different effect on the production of selenium and cobalt metabolites. While the shorter cultivation period in its presence showed the best results for cobalt, the culture cultivated longer with selenate ions showed significantly higher concentrations of metabolites compared to the control. The maximum production of metabolites was thus observed in the culture marked as Se_I, in which the amount of ergosterol and ubiquinone was significantly increased. The highest amount of ergosterol was produced here, the concentration of which was 22.27 mg/g biomass in the Se_I culture cells, while it was only 9.77 mg/g biomass in the control.

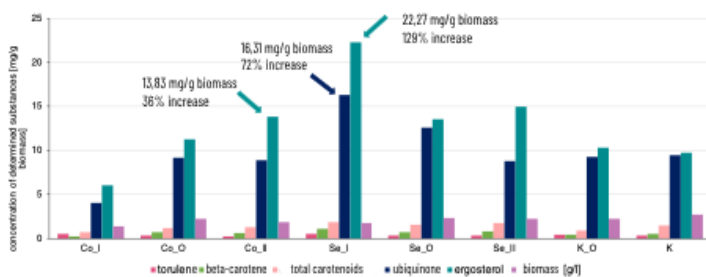


Figure 3: Graphical representation of the production of selected metabolites as a function of the duration of cultivation with added stress factors

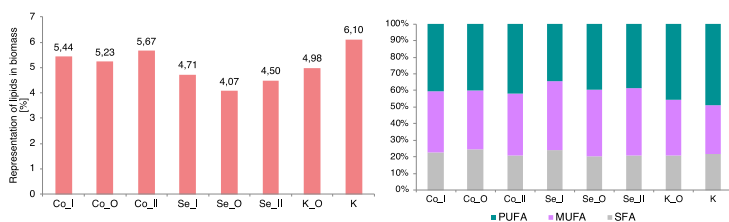


Figure 4: Percentage representation of lipids (left) and Figure 5: Representation of fatty acids in lipids (right)

3.3 The effect of terminal stress factors on the production of β -glucans by *Rhodotorula mucilaginosa* (24)

The content of β -glucans in the cells of *Rhodotorula mucilaginosa* was significantly supported by the addition of cobalt in the last phase of cultivation. In the culture

designated as Co_II, their content was 17.28%, which is more than an 8% increase compared to the control. This culture contains a noticeably smaller representation of α -glucans compared to the other cultures. In the case of culture Se_I, the influence of this method of cultivation was again negatively reflected also on the representation of β -glucans.

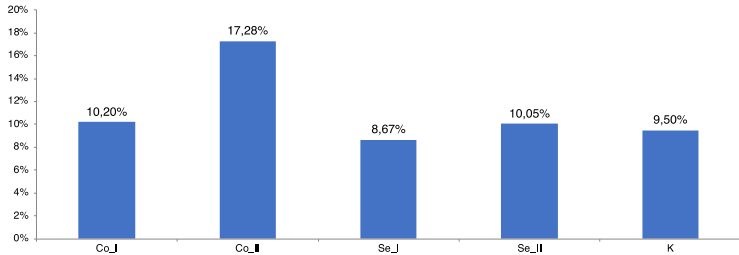


Figure 6: Percentage content of β -glucans

3.4 Conclusion

As part of the experiments, microelements cobalt and selenium were added to the culture media with the aim of modulating the production of selected lipid metabolites, among which were lipids, carotenoids, chlorophylls, sterols and ubiquinone.

The effect of selenate ions added during the inoculation of the production media was manifested on the increase in biomass best in the strain *Rhodotorula kratochvilovae*, whose highest added concentration also showed the highest increase in biomass, i.e., 19 g/l. Of all the strains cultivated with the addition of selenium, this strain also contained the second highest amount of ubiquinone, i.e., 6.36 mg/g biomass, but the lowest concentration of selenium had the best effect on its production. The highest number of carotenoids, 4.21 mg/g biomass, was recorded when the lowest concentration of selenium was added to the medium of *Rhodotorula mucilaginosa* strain (28). The highest concentration of ubiquinone was contained in the cells of *Sporidiobolus pararseus*, which amounted to 6.95 mg/g of biomass, and this was when the concentration of Se_2 was added, in which the overall highest amount of ergosterol was also measured (11.95 mg/g of biomass). An almost double concentration of ergosterol, i.e., 22.27 mg/g biomass, was achieved in this strain by the addition of Se_2 selenium concentration in the exponential growth phase of the culture, while longer cultivation in the presence of selenium had a better effect, as it also manifested itself in the highest increase of ubiquinone, i.e., 16.32 mg/g of biomass. The addition of a selected concentration of selenium in the exponential phase of growth had the best effect on the strain *Rhodotorula mucilaginosa* (24), which showed not only the largest increases in biomass (18.2 g/l), but also the highest production of total carotenoids, which amounted to 12.84 mg/g biomass. However, the best effect of selenium addition on this strain was cultured in its presence for the shortest time. Selenium had a positive effect on the accumulation of lipids in cells at the shortest exposure of its effect on the *Rhodospiridium toruloides* strain with a value of 25.86%.

When studying the effect of cobalt ions on yeast, the greatest production of isoprenoid metabolites was achieved by adding a concentration of Co_1 to the medium of the *Sporidiobolus pararseus* strain. At this concentration of cobalt ions, the highest

production was achieved for carotenoids (9.23 mg/g biomass), ergosterol (8.92 mg/g biomass) and ubiquinone (8.58 mg/g biomass). However, the biomass yields of this strain were small, the *Rhodospiridium toruloides* strain showed the greatest increase in biomass with 11.7 g/l. In general, the effect of cobalt ions in the initial phase of cultivation on the growth of biomass was negative, however, this strain achieved the highest lipid content in cells with the addition of Co_3 with a value of 32.65%, which is almost twice the value compared to the medium without added cobalt ions. The lipids of the cultivated culture also contained the most saturated fatty acids, 79.12%. The highest increase in biomass with the addition of cobalt in the last 24 hours of cultivation was again achieved with the strain *Rhodotorula mucilaginosa* (24) with a value of 19.4 g/l. At the same time, the most carotenoids were represented in the culture cultivated in this way, i.e., 8.16 mg/g of biomass. In addition, this culture also showed a greater than 8% increase in the representation of β -glucans in its cell walls compared to the control. The maximum production of ergosterol, which amounted to 16.87 mg/g biomass, was then achieved in the strain *Rhodotorula mucilaginosa* (28), as well as ubiquinone with a concentration of 11.04 mg/g biomass.

In conclusion, it can be summarized that the choice of suitable stress factors at an optimal level led to the induction of the production of the tested metabolites in the tested strains. It can be stated that at higher levels, the presence of cobalt metals in the medium has rather an inhibitory effect. Only carotenogenic yeast showed a slightly higher resistance to this element, which was reflected in the increased accumulation of lipids due to its influence. Conversely, even in higher concentrations, selenium showed itself as a suitable stress factor, especially in autotrophs. However, the most significant effect on the production of metabolites was oxidative stress, the effect of which was observed only when the optimal level of its concentration was reached, and lipids were not affected at all by its influence.

4 Acknowledgements

The study was supported by the Internal grant competition, which is implemented as part of the OP VVV project entitled Quality internal grants BUT (KInG BUT); reg. number: CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016948 specifically by KInG No. 7746

5 References

1. WALKER, Graeme M. Yeast physiology and biotechnology. Chichester: Wiley, 1998. ISBN 04-719-6446-8.
2. SATYANARAYANA, T. a G. KUNZE. Yeast biotechnology: diversity and applications. New York: Springer, 2009. ISBN 978-1-4020-8292-4.
3. Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism. New York: Springer, 2014. ISBN 978-3-642-55012-6.
4. Živa: Betaglukany – nadějně přírodní imunomodulační látky. Divize Nakladatelství
5. Academia, 02/2012n. 1. ISSN 0044-4812.
6. VĚTVIČKA, Václav. Beta Glukan: tajemství přírody. Brno: Gynpharma, 2011. ISBN 978-80-254-9143-0

7. 6.WYSOCKI, Robert a Markus J. TAMÁS. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2010, 34(6), 925-951 [cit. 2022-11-15]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00217.x

Sensor of food packaging environment quality

Vojtěch Dobiáš¹

Mária Veselá²

¹Institute of Physical and Applied Chemistry, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, vojtech.dobias@out.cz

²Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno

1 Introduction

Earliest food packaging materials were the ones that occurred naturally. These include gourds, shells or leaves. Later people used woven baskets, wood barrels or pottery containers [1]. Since then, the area of food packaging has become integral part of the food industry and new technologies and principles are being introduced to further improve food packaging itself. Nowadays vacuum and modified atmosphere packaging play an important role as they are used as conserving methods for wide range of foods. Vacuum packaging and modified atmosphere packaging are ways to increase food shelf life by altering the atmosphere inside the food packaging. In case of vacuum packaging, the air pressure inside the packaging is reduced while modified atmosphere packaging use a mixture of gases to surround the food inside the packaging. The most used gases in modified atmosphere packaging are oxygen, nitrogen and carbon dioxide. Depending on the type of packaged food, the use and the concentration of the gases may vary [2]. While meats are packaged with mixture of gases of high oxygen concentration, baked goods are packaged with mixture of nitrogen and carbon dioxide [2, 3].

One of the basic functions of food packaging is providing information [4]. With intelligent packaging, this function could be greatly improved. The concept of intelligent food packaging is a modern approach on how to communicate information to the customer through packaging material. One way to realize an intelligent package is by implementing sensors or indicators [5]. Temperature indicators utilize one of the most important factors concerning food safety – temperature. For example, these indicators are used to indicate if a drink is chilled at the right temperature or if a microwavable meal reached desirable temperature. This type of indicators is commonly based on thermochromic ink. With time-temperature indicators, one can tell whether the packaged food was exposed to environment with unacceptable temperature [4]. Freshness indicators use metabolites of microorganisms to detect the food spoilage process [3]. These metabolites include amines, hydrogen sulfide, carbon dioxide, ethanol or diacetyl [5]. The purpose of integrity indicators is to detect rupture of or damage to the food packaging,

indicating that the modified atmosphere could be altered, therefore the food quality might be compromised. Gas indicators serve this purpose well [4]. There has been ongoing research on photocatalytic oxygen indicators that could be used in intelligent food packaging [6–9]. Photocatalysis is a process that involves excitation of electron of semiconductor's valence band to conducting band after absorbing energy from irradiation. The energy of the irradiation must be higher than the energy of the semiconductor's band gap [10]. In this process, illustrated by Equation (1), an electron-hole pair is created [10]. In photocatalytic oxygen indicators, photogenerated holes oxidize sacrificial electron donor, while photogenerated electron reduce the dye [11]. The reducing reaction of the dye is shown in Equation (2). While some dyes are colorless in their reduced form (e.g. methylene blue), thus called a leuco dye [12], other are reduced to different color than in their oxidized state (e.g. Remazol brilliant blue R [6]).



Exposing the reduced dye to oxygen results in oxidation reaction and the dye is oxidized (Equation (3)) [12].



Study of an oxygen indicator that is activated by photocatalytic reduction and could be used as an integrity indicator is covered in this work.

2 Experimental

2.1 Chemicals used

Following chemicals were used in this work: Titanium dioxide 35% (w/w) (Centrum organické chemie s.r.o), Glycerol absolute p.a. (PENTA s.r.o), Methylene blue (Lachema n.p. Brno), Thionine (SIGMA-ALDRICH s.r.o.), Hydroxyethylcellulose Natrosol 250 MR (Aqualon), isopropylalcohol (PENTA s.r.o.), Neodisher® LM 3 (Dr. Weigert GmbH & Co. KG)

2.2 Preparation of oxygen indicator inks

Polymer solutions were prepared by dissolving a polymer in agitated deionized water. Solutions of dyes were prepared by dissolving a dye in deionized water.

Originally oxygen indicator inks were prepared by mixing 3.0 g of 35% (w/w) dispersion of titanium dioxide, 0.2 g of solution of methylene blue, 0.5 g of glycerol, 20 g of polymer solution. However, future results indicated that the optimal amount of glycerol concentration is 1.0 %, which corresponds to 0.25 g of added glycerol. Therefore, subsequent indicator inks with methylene blue, thionine were prepared with the addition of 0.25 g of glycerol. Finally, 2.3 ml of isopropanol were added to the ink and mixed.

Glycerol acts as a sacrificial electron donor and can also act as a plasticizer, thus increasing gas diffusion through the polymer layer [13]. Indicator inks for the study of effect of glycerol content were prepared by mixing 3.0 g of 35% (w/w) dispersion of titanium dioxide, 0.2 g of solution of methylene blue, 20 g of polymer solution and

glycerol so that the final concentration of glycerol would be 0.0 %, 1.0 %, 2.0 %, 2.9 %, 3.8 % and 4.8 % (w/w). Finally, 2.3 ml of isopropanol were added to the inks and mixed.

Prepared indicator inks were then sonicated for 5 minutes in ultrasonic bath PS 02000A 1.25 l (Powersonic) and then agitated on magnetic stirrer (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG).

2.3 Oxygen indicator printing

Oxygen indicators were prepared by using film applicator Baker 3520 (Elcometer), TQC automatic coater (Gamin s.r.o) and printing the oxygen indicator ink onto PET foil Tenolan 150 μm (Fatra a.s.) with thickness of wet layer 90 μm . Before printing, the PET foil was treated with solution of Neodisher or isopropanol. Printed oxygen indicators were then dried with hot air followed by drying in laboratory hot air dryer Venticell at 100 °C (Brněnská medicínská technika a.s.).

2.4 Indicator preparation and UVA exposure

Dried oxygen indicators were cut out of the PET foil and using a marker, spots for measuring reflectance spectra were defined. Printed oxygen indicators were vacuum sealed using VM Maxo Profi vacuum sealer. Activation of the vacuum sealed oxygen indicators was performed by UVA using Mercury-vapor lamp. The irradiance intensity was measured with irradiance meter x9-7 (Gigahertz-Optik GmbH).

2.4 Reflectance spectra measurement

Reflectance spectra of printed oxygen indicators were measured with reflectance spectrophotometer X-Rite i1 Eye-One Pro against white ceramic plate (D50 standard illuminant and 2° observer) before UVA irradiation, after UVA irradiation and during oxidation reaction when the reduced dye reacts with oxygen present in the ambient air. Spectrophotometer was calibrated against white standard base provided by the manufacturer. Colorimetric coordinates $L^*a^*b^*$ were calculated by the software of the spectrophotometer. ΔE_{ab}^* characterizes the difference between two colors [14] and was calculated using Equation (4):

$$\Delta E_{\text{ab}}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

Reflectance spectra were converted to optical density spectra using Equation (5)

$$D = -\log R \quad (5)$$

where D is optical density and R is reflectance.

Optical densities were further converted to relative spectral optical density at λ_{max} using Equation (6).

$$D_{\text{rel}} = \frac{D_{1(2)}}{D_0} \quad (6)$$

where D_{rel} is relative spectral optical density at λ_{max} , D_0 is spectral optical density before UVA exposure at λ_{max} , $D_{1(2)}$ is spectral optical density after UVA exposure at λ_{max} (spectral optical density during oxidation reaction with ambient oxygen at λ_{max})

Rate of photocatalytic reduction and oxidation reaction by ambient oxygen was evaluated as a change of relative spectral optical density with respect to time. Plotted data

were fitted with one-phase exponential decay function with derived parameter k as a reaction rate constant.

3 Results and Discussion

3.1 Methylene blue oxygen indicator – influence of glycerol content

With increasing glycerol content, the stickiness of oxygen indicator increased and therefore more time was needed to dry the indicator completely. The oxygen indicator containing highest amount of glycerol had to be dried for more than 20 minutes. Unexpectedly the oxygen indicator with zero glycerol content underwent photocatalytic reduction even though it did not contain any glycerol. It may be possible that the functional groups in the polymer could substitute glycerol as a sacrificial electron donor. It is desirable that the photocatalytic reduction is fast as possible. As illustrated by the plot of the data in Figure 1, with the addition of just 0.25 g of glycerol (1 % (w/w)) the reaction rate constant rised dramatically.

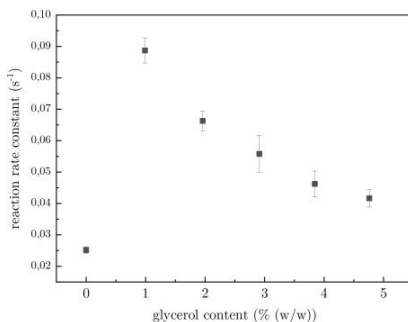


Figure 1: A plot of reaction rate constants, as a function of glycerol content (error bars represent standard error)

However, with further additions of glycerol the reaction rate constant decreased. This could be caused by the influence of oxidation products that are produced during photocatalytic reduction of glycerol [13]. As illustrated by the plot of the data in Figure 1, the highest reaction rate constant was observed in oxygen indicator with content of glycerol of 1 % (w/w).

Figure 2 shows the optical density spectra during photocatalytic reduction. Optimal glycerol content with respect to the rate of the photocatalytic reduction and oxidation by O_2 was determined to be 1 % (w/w).

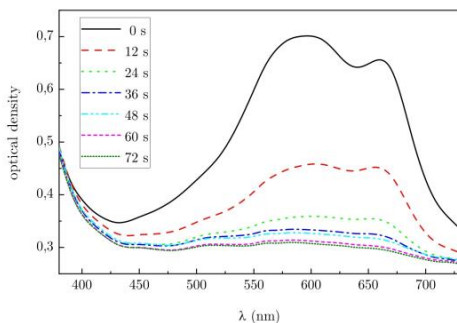


Figure 2: Optical density spectra during photocatalytic reduction of methylene blue oxygen indicator

Figure 3 shows the change of relative spectral optical density with respect to the time of exposure to UVA irradiation. Methylene blue in the oxygen indicator with glycerol content of 1 % (w/w) was completely reduced in 48 s after UVA irradiation of intensity $0.1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$. Calculated reaction rate constant of this reaction is $k = (0.089 \pm 0.004) \text{ s}^{-1}$.

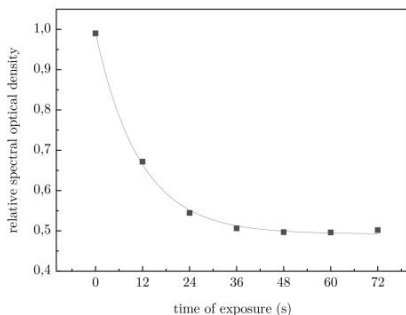


Figure 3: The change of relative spectral optical density at λ_{max} during photocatalytic reduction of methylene blue oxygen indicator

Figure 4 shows the change of relative spectral optical density with respect to time of exposure to ambient oxygen. The oxidation reaction when the reduced dye reacts with O_2 is quick and the calculated reaction rate constant is $k = (0.9 \pm 0.1) \text{ h}^{-1}$.

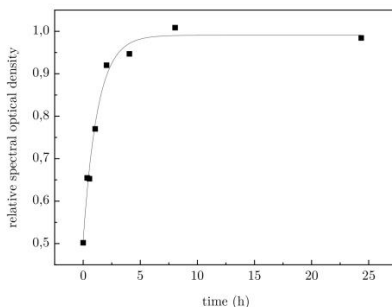


Figure 4: The change of relative spectral optical density at λ_{\max} during oxidation reaction of methylene blue oxygen indicator

After 20 minutes it is possible to detect color change by naked eye, which is characterized by value of $\Delta E_{\text{ab}}^* = 9$. ΔE_{ab}^* expresses the color difference between the color of the oxygen indicator after photocatalytic reduction (time 0) and the color of the oxygen indicator during oxidation reaction. Table 1 lists colorimetric coordinates and ΔE_{ab}^* with respect to time of oxidation reaction.

Table 1: Colorimetric coordinates with ΔE_{ab}^* characterizing color during oxidation reaction for oxygen indicator with methylene blue

Time (h)	L^*	a^*	b^*	ΔE_{ab}^*
0	75	0	-1	0
0.35	70	-6	-7	9
0.55	70	-6	-7	9
1.05	67	-7	-11	14
2.05	63	-7	-17	20
4.05	61	-6	-18	23
8.05	60	-5	-20	24
24.35	60	-4	-19	23

3.1 Thionine oxygen indicator

To completely reduce the dye in thionine oxygen indicator, 180 s of UVA irradiation with $0.1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ intensity was needed. The optical density spectra during photocatalytic reduction are illustrated in Figure 5.

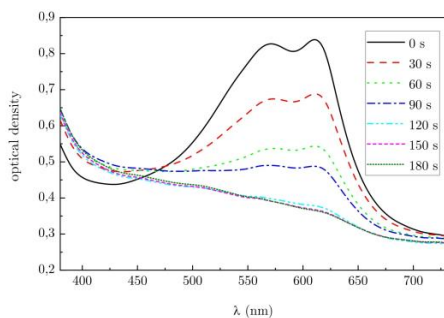


Figure 5: Optical density spectra during photocatalytic reduction of thionine oxygen indicator

Figure 6 shows the change of relative spectral optical density with respect to the time of exposure to UVA irradiation. Rate of reaction constant was calculated as $k = (0.016 \pm 0.001) \text{ s}^{-1}$. This is a significant difference compared to rate of reaction constant in methylene blue oxygen indicator which is more than 5 times larger than in this thionine-based oxygen indicator. Figure 7 shows the change of relative spectral optical density with respect to time of exposure to ambient oxygen.

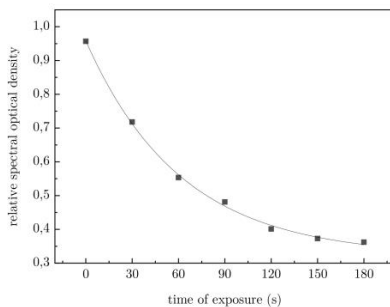


Figure 6: The change of relative spectral optical density at λ_{max} during photocatalytic reduction of thionine oxygen indicator

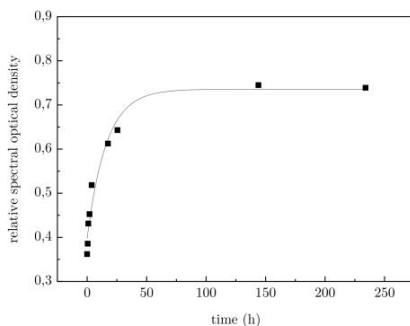


Figure 7: The change of relative spectral optical density at λ_{max} during oxidation reaction of thionine oxygen indicator

The oxidation reaction was much slower in comparison with oxygen indicator based on methylene blue. Rate of reaction constant was calculated as $k = (0.06 \pm 0.01) \text{ h}^{-1}$ which is just a fraction of reaction rate of the oxidation reaction constant of methylene blue based oxygen indicator. Similar color change as in methylene blue oxygen indicator was detected in thionine-based oxygen indicator after 4 hours of oxidation, in comparison to 20 minutes in case of methylene blue oxygen indicator. The difference in the rate of reactions may be explained by different oxidation-reduction potentials of the dyes [15].

4 Conclusions

In this study, a photocatalytic oxygen indicator that could be used as an integrity indicator in intelligent food packaging was prepared. Optimal sacrificial electron donor content was found to be 1.0 % (w/w). The prepared oxygen indicator based on methylene blue is readily activated by UVA irradiation in 48 s with irradiance intensity of $0.1 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$. It quickly reacts with ambient oxygen and the color change response can be detected by naked eye in 20 minutes. Results suggest that the oxygen indicator presented in this work could be upscaled and tested under operating conditions. Further research in the field of intelligent food packaging may be focused on more comprehensive study of photocatalytic oxygen sensors, study of fluorescence-based oxygen sensors or freshness indicators.

5 References

- [1] RISC, Sara J. Food Packaging History and Innovations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, 57(18), 8089–8092. [cit. 2022-11-24] ISSN 0021-8561. Available at: doi:10.1021/jf900040r

- [2] VÁPENKA, Lukáš, Lenka VOTAVOVÁ a Jaroslav DOBIÁŠ. *Balení potravin*. 1. vyd. Praha: VŠCHT. 2019. ISBN 978-80-7592-052-2
- [3] HAN, Jung H. *Innovations in Food Packaging (2nd Edition)* [online]. B.m.: Elsevier. 2014. [cit. 2022-11-24] ISBN 978-0-12-394601-0. Available at: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpIFPE0013/innovations-in-food-packaging/innovations-in-food-packaging>
- [4] VANDERROOST, Mike, Peter RAGAERT, Frank DEVLIEGHERE a Bruno DE MEULENAER. Intelligent food packaging: The next generation. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2014, **39**(1), 47–62. [cit. 2022-11-24] ISSN 0924-2244. Available at: doi:10.1016/j.tifs.2014.06.009
- [5] GHAAANI, Masoud, Carlo A. COZZOLINO, Giulia CASTELLI a Stefano FARRIS. An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2016, **51**, 1–11. [cit. 2022-11-24] ISSN 0924-2244. Available at: doi:10.1016/j.tifs.2016.02.008
- [6] KHANKAEW, Surachai, Andrew MILLS, Dilidaer YUSUFU, Nathan WELLS, Stephanie HODGEN, Waraporn BOONSUPTHIP a Panuwat SUPPAKUL. Multifunctional anthraquinone-based sensors: UV, O₂ and time. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2017, **238**, 76–82. [cit. 2022-11-24] ISSN 0925-4005. Available at: doi:10.1016/j.snb.2016.07.037
- [7] VU, Chau Hai Thai a Keehoon WON. Leaching-Resistant Carrageenan-Based Colorimetric Oxygen Indicator Films for Intelligent Food Packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2014, **62**(29), 7263–7267. [cit. 2022-11-24] ISSN 0021-8561. Available at: doi:10.1021/jf5014764
- [8] VU, Chau Hai Thai a Keehoon WON. Novel water-resistant UV-activated oxygen indicator for intelligent food packaging. *Food Chemistry* [online]. 2013, **140**(1), 52–56. [cit. 2022-11-24] ISSN 0308-8146. Available at: doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.056
- [9] LAWRIE, Katherine, Andrew MILLS a David HAZAFY. Simple inkjet-printed, UV-activated oxygen indicator. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2013, **176**, 1154–1159. [cit. 2022-11-24] ISSN 0925-4005. Available at: doi:10.1016/j.snb.2012.10.125
- [10] SCHNEIDER, Jenny, Detlef BAHNEMANN, Jinhua YE, Gianluca Li PUMA a Dionysios D. DIONYSIOU. *Photocatalysis - Fundamentals and Perspectives* [online]. B.m.: Royal Society of Chemistry (RSC). 2016. [cit. 2022-11-24] ISBN 978-1-78262-041-9. Available at: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpPPF0001J/photocatalysis-fundamentals/photocatalysis-fundamentals>

- [11] MILLS, Andrew a David HAZAFY. A solvent-based intelligence ink for oxygen. *Analyst* [online]. 2008, **133**(2), 213–218. [cit. 2022-11-24] ISSN 00032654. Available at: doi:10.1039/b713450a
- [12] LEE, Soo-Keun, Martin SHERIDAN a Andrew MILLS. Novel UV-Activated Colorimetric Oxygen Indicator. *Chemistry of Materials* [online]. 2005, **17**(10), 2744–2751. [cit. 2022-11-24] ISSN 0897-4756. Available at: doi:10.1021/cm0403863
- [13] MILLS, Andrew, David HAZAFY a Katherine LAWRIE. Novel photocatalyst-based colourimetric indicator for oxygen. *Catalysis Today* [online]. 2011, **161**(1), 59–63. [cit. 2022-11-24] ISSN 0920-5861. Available at: doi:10.1016/j.cattod.2010.10.073
- [14] *What is Delta E? And Why Is It Important for Color Accuracy?* [online]. 2021 [cit. 2022-11-24]. Available at: https://www.viewsonic.com/library/creative-work/what-is-delta-e-and-why-is-it-important-for-color-accuracy/#\%7DWhat\%7B_\%7Dis\%7B_\%7DDelta\%7B_\%7DE
- [15] ROBERTS, Luke, Robert LINES, Sub REDDY a John HAY. Investigation of polyviologens as oxygen indicators in food packaging. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2011, **152**(1), 63–67. [cit. 2022-11-24] ISSN 0925-4005. Available at: doi:10.1016/j.snb.2010.09.047

Acknowledgement

This research was supported by the project OP PIK–Aplikace CZ.01.1.02/0.0/0.0/20_321/0024435 funded by the Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic.

Metabolic characterisation of carotenogenic yeasts cultivated on waste oils of food industry

*Sikorová Pavlína
Hladká Dagmar, Szotkowski Martin, Márová Ivana*

*Brno University of Technology,
Faculty of Chemistry,
Institute of Physical chemistry
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic
xcsikorovap@vutbr.cz*

1 Introduction

Yeasts are the first biotechnologically used microorganisms. They are used for many years as sources of fermented products (beer, wine, acetic acid, etc.).¹ They are also producers of enzymes, polysaccharides, and lipidic substances. Carotenogenic yeasts are specific microorganisms due to their enzymatic apparatus's ability to synthesize carotenogenic substances. These yeasts are also able to gain nutrients from various types of substrates, including waste products of the food industry. Carotenogenic yeasts are significant producers of biomass and metabolites ^{2,3}.

Carotenoids, ergosterol, coenzyme Q, and fatty acids are important metabolites produced by microorganisms, mainly by yeasts. Carotenoids are popular in the pharmacy or food industry, in form of drugs, vitamins, or food supplements. In organisms, they serve as prevention of cardiovascular diseases. Fatty acids can also be used in the pharmacy and food industries. Yeasts are the main producers of unsaturated fatty acids, which are important for decreasing LDL in the blood. Coenzyme Q is extensively used in cosmetics ^{2,3}.

As the demand for these metabolites is increasing, new ways of more effective, and cheaper methods of production are being researched. The best way to make cultivation cheaper is by utilizing waste products from different industries⁴⁵. Waste substrates contain mainly saccharides, which are important growth sources for yeasts. Suitable waste products for biotechnologies are whey, feathers, spent coffee grounds, or animal fat. These substrates are not only a rich source of carbon but also of nitrogen ^{4,5,6,7,8,9}.

2 Experimental

2.1 Study objectives

Main study objectives were focused on screening cultivations of carotenogenic yeast strains. The study was aimed at cultivation in media with addition of food waste substrates as carbon sources in the media.

Food waste substrates:

- Waste frying oil (F.O.)
- Waste coffee oil (C.O.)
- Spent coffee ground (S.C.G.)
- Waste media with added content of phosphorus
- Waste media with added content of magnesium

2.2 Materials and methods

Waste coffee oil was obtained by extraction of spent coffee grounds (acquired from a local coffee house) with non-polar solvents in a Soxhlet extractor. The solvent was then evaporated on a vacuum evaporator and the oil was cleared of solvent and after that, ready to use for cultivation purposes. Waste frying oil (acquired from a local catering facility) stripped of solid particles by filtering was used for cultivation purposes without any chemical pre-treatment.

Chosen strains of carotenogenic yeasts (*Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus metaroseus*, *Cystofilobasidium macerans*, *Rhodotorula kratochvilovae*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Rhodospiridium toruloides*) were inoculated on YPD media with double submersion inoculation.

After 48 hours the yeasts were cultivated in their specific production media, which contained waste oils as carbon sources also KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, and urea as sources of inorganic salts. The amount of added coffee oil and coffee grounds were calculated from the content of saccharides in spent coffee grounds (S.C.G.). This final cultivation lasted for 96 hours.

The biomass was centrifuged, lyophilized, and analyzed gravimetrically. To obtain information about the produced carotenoids, ubiquinone and ergosterol non-polar extracts were subjected to HPLC analysis. For lipidic extraction Folsh extraction was used.

Analysis was performed on a Thermo Fischer Scientific HPLC on a Kinetex EVO C18 column (particle size 2.6 μm, length 150 mm, Phenomenex).

3 Results and Discussion

3.1 *Sporidiobolus pararoseus* cultivated on S.C.G. and waste coffee oil

Table 1: Production of biomass of *S. pararoseus* in media with S.C.G. and waste coffee oil

Production of biomass [g/l]					
Cont rol media	10% hydrolysate	20% hydrolysate	30% hydrolysate	40% hydrolysate	50% hydrolysate
9.10	31.10	5.40	22.35	25.09	9.85

This cultivation (Table 1) shows the best production of biomass (31.10 mg/g biomass) while cultivated in media with added 10% coffee hydrolysate.

The main metabolite products (Figure 1) were ubiquinone and ergosterol. The biggest content of ubiquinone (5.74 mg/g biomass) and ergosterol (2.37 mg/g biomass) was detected in media with 40% added coffee hydrolysate and the second biggest production of these metabolites (ubiquinone 3.72 mg/g biomass and total sterol 1.63 mg/g biomass) was found in media with 50% added coffee hydrolysate. These two media also show better metabolite production than the control media.

In comparison with control media, all experiments (except yeasts in media with 20% added coffee hydrolysate) show strongly better production of biomass.

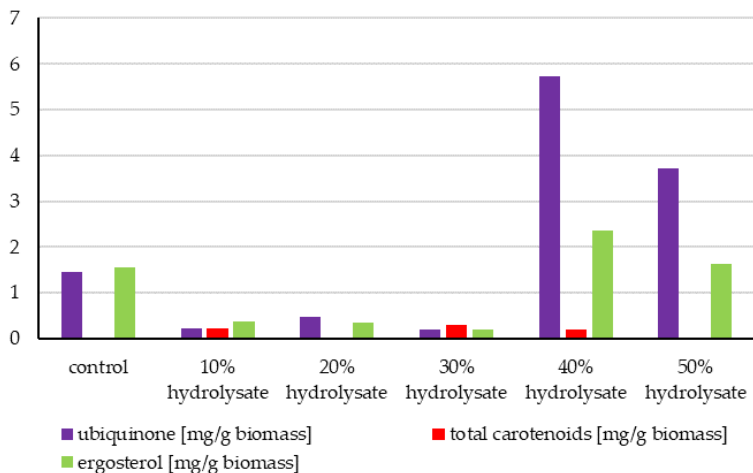


Figure 1: Graph of biomass growth of and metabolites production *Sporidiobolus pararoseus* while cultivated in media with S.C.G. and waste coffee oil

3.2 *Sporidiobolus pararoseus* cultivated in media with S.C.G. and waste frying oil

Table 2: Production of biomass of *S. pararoseus* in media with S.C.G. and waste frying oil

Production of biomass [g/l]					
Cont rol media	10% hydrolysate	20% hydrolysate	30% hydrolysate	40% hydrolysate	50% hydrolysate
18.58	24.41	23.97	28.85	20.53	18.12

Compared to the previous experiment, this cultivation shows a greater production of metabolites. Biomass production is also not negligible (Table 2, Figure 2).

As regards the production of metabolites, the largest producers of ergosterol turned out to be yeast cultivated in media with 40% added hydrolysate (8.28 mg/g biomass), followed by yeast cultivated in media with 100% added hydrolysate (4.25 mg/g biomass).

In total ubiquinone production yeast in media with 40% added hydrolysate showed the best production (8.28 mg/g biomass), followed by yeast in media with 20% added hydrolysate (7.29 mg/g biomass). The highest production of total carotenoids was detected in media with 20% added hydrolysate (1.90 mg/g biomass).

All other media had a comparable carotenoid production, the exception was media with 30% added hydrolysate, which production was smaller (0.68 mg/g biomass).

It is necessary to say that all the media with added hydrolysate had a greater production of both biomass and metabolite products than yeast in a control media.

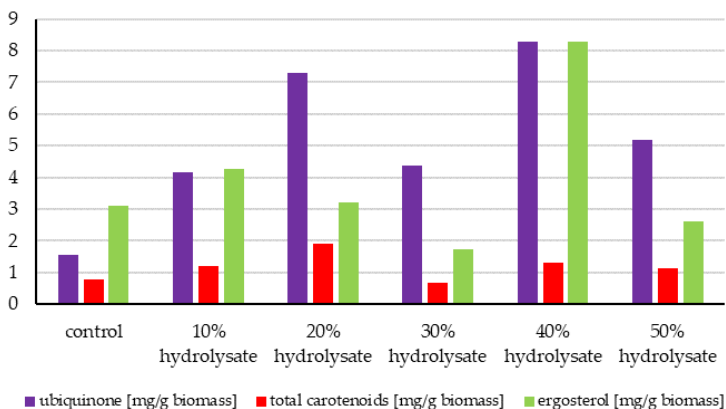


Figure 2: Graph of biomass growth of and metabolites production *Sporidiobolus pararoseus* while cultivated in media with S.C.G. and waste frying oil

3.3 *Sporidiobolus pararoseus* in media with S.C.G. and waste coffee oil with different content of added phosphorus

Table 3: Production of biomass of *S. pararoseus* with added content of phosphorus

Production of biomass [g/l]				
75% P	100% P	125% P	150% P	200% P
18.78	21.58	20.43	20.00	16.91

The highest ubiquinone production (Figure 3) was in the media with 150% phosphorus content (13.53 mg/g biomass), then in media with 200% (8.40 mg/g biomass) and 100% (7.17 mg/g biomass) phosphorus content. The least amount was detected in media with 75% phosphorus content (3.61 mg/g biomass). The biggest quantity of ergosterol was in the media with 75% phosphorus content (3.31 mg/g biomass). Sterol production of other types of media was comparable.

Total carotenoids were most represented in a media with phosphorus content 200% (0.39 mg/g biomass), in media with 75%, 100%, and 125% phosphorus content were the quantity of produced carotenoids comparable. The least quantity of total carotenoids was detected in media with a phosphorus content 150% (0.18 mg/g biomass).

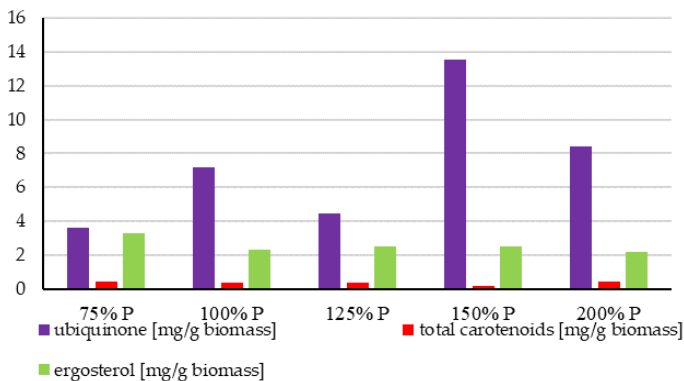


Figure 3 Graph of biomass growth of and metabolites production *Sporidiobolus pararoseus* while cultivated in media with S.C.G. and waste coffee oil with different content of added phosphorus

3.4 *Sporidiobolus pararoseus* cultivated in media with S.C.G. and waste coffee oil with different content of added magnesium

Table 4: Production of biomass of *S. pararoseus* in media with S.C.G. and waste frying oil

Production of biomass [g/l]				
75% Mg	100% Mg	125% Mg	150% Mg	200% Mg
13.03	6.85	23.27	9.97	21.32

In the case of the experiments with different amounts of added magnesium (Table 4), biomass production shows the same trend as the previous cultivation (Table 4). That means the greatest production of biomass was detected in the media with the increased magnesium content of 125% (23.27 g/l), followed by the media with 200% content of magnesium (21.32 g/l). The smallest productions were found in media with 150% (9.97 g/l) and 100% (6.85 g/l) content of magnesium.

In this cultivation, the trend in metabolite production was different than in the previous experiment (Figure 4). The greatest production of ubiquinone was discovered in media with 200% magnesium content (9.18 mg/g biomass), followed by 125% (5.84 mg/g biomass) and 100% magnesium content (5.31 mg/g biomass). The smallest amount of ubiquinone was in media with 75% magnesium content (3.79 mg/g biomass). The biggest production of total carotenoids turned out to be the yeasts in media with magnesium content 75% (0.43 mg/g biomass) and 200% (0.39 mg/g biomass). Other media showed a comparable quantity of produced carotenoids. The highest quantity of ergosterol was detected also in media with 75% magnesium content (3.31 mg/g biomass), measured values of ergosterol in the rest of the media were also comparable.

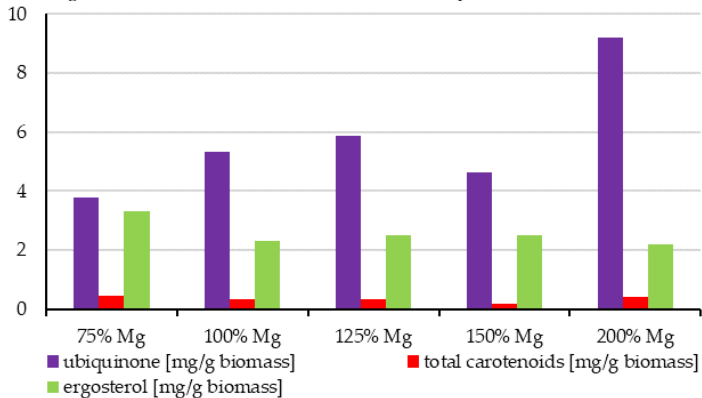


Figure 4: Graph of biomass growth of and metabolites production *Sporidiobolus pararoseus* while cultivated in media with S.C.G. and waste coffee oil with different content of added magnesium

4 Conclusion

Experimental results show that the cultivation of carotenogenic yeasts with media with waste products of the food industry is possible and, in this set of experiments, has a beneficial effect on the biomass (compared to the cultivation of yeast culture on the control media) and in the production of metabolites.

A significant increase in biomass was observed in cultivation with coffee oil and coffee hydrolysate in media with 10% hydrolysate (31.10 g/l of biomass).

In this set of experiments, the amount of biomass was produced in a much bigger quantity than metabolites. In the case of cultivations in media with coffee hydrolysate and waste frying oil, all media have bigger production of biomass and metabolites compared to control media. Experiments with coffee oil, coffee hydrolysate, and added content of phosphorus show the biggest production of biomass in media with 125% (23.27 g/l of biomass) and 200% (21.32 g/l of biomass) phosphorus content. Metabolic production is also not negligible.

The last set of experiments cultivated on coffee hydrolysate, coffee oil, and added content of magnesium shows the biggest biomass production in media with 125% (23.27 g/l of biomass) and 200% (21.32 g/l of biomass). In general, the most produced metabolite in all sets of experiments was ubiquinone followed by ergosterol.

According to the pilot results presented in this research, further optimization of media composition and cultivation conditions will be performed.

5 Acknowledgements

The study was supported by the Internal grant competition, which is implemented as part of the OP VVV project entitled Quality internal grants BUT (KInG BUT); reg. number: CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016948 specifically by KInG No. 7746

6 References

1. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. Bratislava: Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.
2. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
3. VOET, Donald a Judith G. VOET. Biochemie. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
4. Szołkowski M., Byrtusova D., Haronikova A., Vysoka M., Rapta M., Shapaval V., Marova I.: Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate. *Microorganisms*. 7 (2019).
5. AL-HAMAMRE, Zayed, Sascha FOERSTER, Franziska HARTMANN, Michael KRÖGER a Martin KALTSCHMITT. Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*. 2012, 96(2), 70-76. ISSN 00162361.
6. MUSSATTO, Solange I., Livia M. CARNEIRO, João P.A. SILVA, Inês C. ROBERTO a José A. TEIXEIRA. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*. 2011, 83(2), 368-374. ISSN 01448617.
7. OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Dan KUCERA, Sinisa PETRIK a Ivana MAROVA. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology*. 2015, 32(6), 569-574. ISSN 18716784.

8. O'BRIEN, Richard D. Fats and Oils. 3. CRC Press, 2008. ISBN 9781420061666.
9. VELÍŠEK, Jan. The Chemistry of food. 2. opr. vyd. Chichester: Wiley, 2014. ISBN 978-1-118-38384-1.

Effect of selenium and cobalt ions on algal and cyanobacterial biomass and metabolite production

Sniegoňová Pavlína
Špačková Dominika, Szotkowski Martin, Márová Ivana

*Brno University of Technology,
Faculty of Chemistry,
Institute of Physical chemistry
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic
xcsniegonovap@vutbr.cz*

1 Introduction

Microalgae are photosynthetic organisms that fix CO₂ during photosynthesis and produce large quantities of O₂. As these microorganisms produce different pigments, they are commonly divided into groups, among which are green, red, and brown microalgae. They are used in several biotechnological processes. Currently, very famous use of microalgae is, for example, *Spirulina* and *Chlorella*, in food supplements. They are mainly important for the production of many biologically active substances like fatty acids or pigments. They are mainly used in the food industry or pharmaceutical industry^{1,2,3}.

Cyanobacteria are prokaryotic microorganisms that also can photosynthesize and are significant producers of O₂. Similarly, to algae, they occur throughout a large range of environments which led to their diversity^{4,5,6}.

A common way to produce algal biomass is to cultivate these microorganisms under stressful conditions. This type of cultivation is mainly used due to the increased production of both biomass as well as their metabolites. These factors provide stressful conditions that disturb ideal conditions for cell growth. As a defense mechanism, the microorganisms may increase the production of certain metabolites as a way to adapt to unideal conditions and to ensure their survival^{7,8}.

2 Experimental

2.1 Study objectives

The main study objectives were focused on exploring the effects of metal ions on selected cyanobacterial and microalgal strains. The cyanobacteria *Arthrospira maxima* was cultivated in *Spirulina* medium and algae *Chlorella minutissima* and *Chlorella*

sorokiniana were cultivated in BBM medium with the addition of Se⁶⁺ and Co²⁺. The acquired data were used to determine the effects of metal ions on production biomass and produced metabolites⁹.

2.2 Materials and methods

The chemicals sodium selenate and cobalt chloride with a final concentration of 0.183 M each were used to prepare stock solutions of selenium and cobalt ions. The concentration range of these solutions was selected for the experiment, see Table 1.

Cultivations were carried out in Erlenmeyer flasks on orbital shakers under constant illumination. The media used for the cultivation depended on the type of microorganism. BBM was used for algal strains *Chlorella minutissima* and *Chlorella sorokiniana* and Spirulina medium was used for cyanobacteria *Arthrospira maxima*.

During the entire time of cultivation, samples were taken at regular intervals to measure absorbance, from which a growth curve was created. This was done to determine the phase of culture growth and biomass increase for each sample.

Cultivations were terminated after 21 days and the produced biomass was subsequently centrifuged and lyophilized. The produced biomass was weight and processed for extraction. Produced pigments and sterols were analyzed by HPLC and lipids were analyzed by GC.

Table 1: Volume concentration of stock solution for each sample

Sample	Stock solution volume [μ l]
Control	0,00
Se_1/Co_1	27,25
Se_2/Co_2	54,75
Se_3/Co_3	82,25
Se_4/Co_4	109,50
Se_5/Co_5	137,00

3 Results and Discussion

3.1 *Chlorella minutissima*

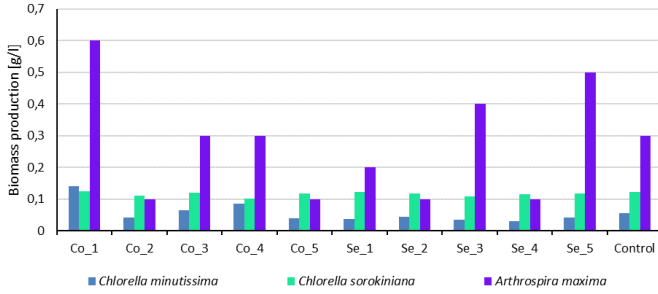


Figure 1: Graph of biomass production of *Chlorella minutissima*, *Chlorella sorokiniana*, and *Arthrospira maxima*

From Figure 1, higher production of biomass in sample Co_1 at 1.01414 g/l is evident. This is a 153.86 % increase compared to the control. We also noticed increased production in sample Co_4. For the other samples, the biomass production does not differ significantly from the control.

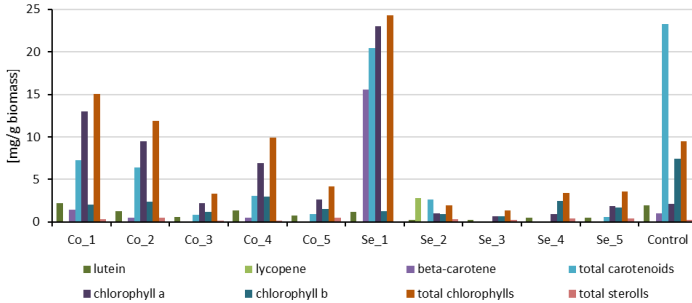


Figure 2: Graph of metabolite production of algae *Chlorella minutissima* cultivated in media containing Se6+ and Co2+

When looking at the production of selected metabolites, we see a positive effect of cobalt at lower concentrations, however, the production of metabolites decreases with increasing concentration. We can see a significantly higher production of chlorophyll a for all the samples cultivated in medium with added cobalt. The highest value is reached by sample Co_1 at 13.019 g/l. We also observe a slightly increased production of beta-

carotene and lutein. Cobalt, therefore, has a positive effect on the production of selected metabolites, especially in smaller concentrations.

However, in samples cultured on selenium, we can see this positive effect only at the lowest concentration i.e. sample Se_1. For all higher concentrations, there was a significant reduction in the production of metabolites compared to the control, and we, therefore, observe a negative impact. Sample Se_1 achieved many times higher beta-carotene and chlorophyll a production, but the production of chlorophyll b was reduced compared to the control.

3.2 *Chlorella sorokiniana*

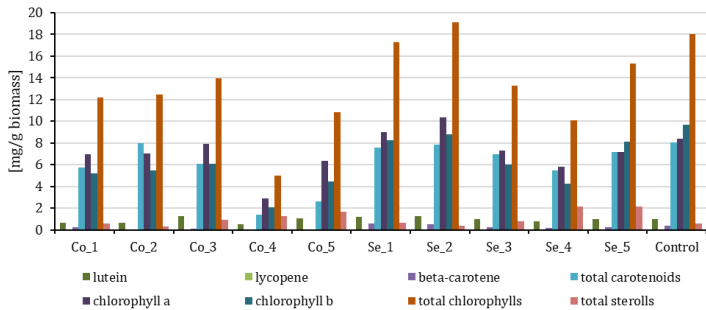


Figure 3 Graph of metabolite production of algae *Chlorella sorokiniana* cultivated in media containing Se⁶⁺ and Co²⁺

In the case of algae *Chlorella sorokiniana*, the effect of ions in the medium is no longer as noticeable as in the case of algae *Chlorella minutissima*, both from the point of view of biomass production, as shown in *Figure 1*, and from the point of view of the production of selected metabolites.

In the presence of cobalt in the medium, we can observe an increase in the production of total sterols with increasing concentration in the medium. The highest production is observed in the sample Co_1 at 0.69 g/l which is approximately three times higher compared to the control. The lowest production of metabolites is observed in sample Co_4. The presence of selenium in the medium had different effects for different concentrations. Sample Se_2 achieved a higher production of chlorophyll a and beta-carotene, but this increase was not significant. On the contrary, the negative effect of selenium is observed in sample Se_4. However, we can observe a significantly increased production of sterols in samples with a higher concentration of selenium, i.e. samples Se_4 and Se_5. Unlike the previous case, it can be concluded that lower concentrations of selenium have a more positive effect on the production of metabolites in the algae *Chlorella sorokiniana*.

3.3 *Arthrospira maxima*

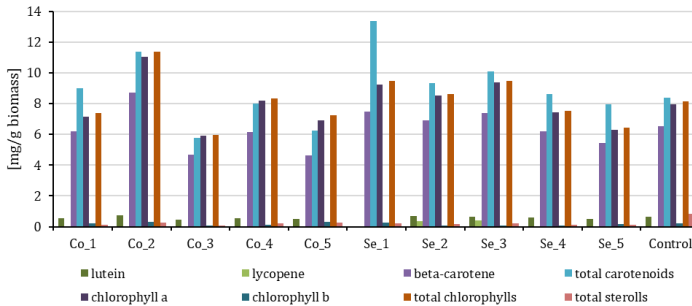


Figure 4: Graph of metabolite production of algae *Arthrospira maxima* cultivated in media containing Se6+ and Co2+

In the case of cyanobacteria *Arthrospira maxima*, we can observe (Figure 1) significant differences in biomass production among every sample. Higher biomass production is observed in samples Co_1, Se_3, and Se_5 with the highest value reached by sample Co_1 at 0.6 g/l, which is twice more than the control. In other samples, different concentrations of selenium and cobalt either did not affect biomass production, or the production was reduced. Regarding the production of individual metabolites, the differences in production compared to the control were not very significant. Samples cultivated in the presence of cobalt showed reduced production, except sample Co_2, where we observe a higher production of both total chlorophylls and total carotenoids. As for the samples cultivated with selenium, the production was approximately the same as the control, but at higher concentrations, there was a decrease in production, especially in the sample Se_5. In this case, it can be said that cobalt and higher concentrations of selenium had a slightly negative effect on the production of metabolites.

4 Conclusion

In these experiments, the influence of different concentrations of selenium and cobalt in the medium on the growth of microalgae and cyanobacteria was monitored. In general, it can be said that cobalt had more of a negative effect on the production of selected metabolites. Selenium, on the other hand, did not have such a noticeable negative effect and in some cases had a slightly positive effect.

However, in the case of the algae *Chlorella minutissima*, these assumptions do not apply. Lower concentrations of cobalt increased the production of selected metabolites, and this positive effect decreased with increasing concentrations. The lowest concentration of cobalt had the most significant effect, as the produced biomass reached a value of 0.1414 g/l, and the production of beta-carotene and total chlorophylls also reached higher values than the control. A significant increase in metabolite production

compared to the control is also observed in the sample with the lowest concentration of selenium. At higher concentrations, however, the production decreased significantly compared to the control.

In the case of the algae *Chlorella sorokiniana*, we observe a slight increase in total chlorophylls at 19.085 g/l compared to the control.

In the case of cyanobacteria *Arthrospira maxima*, the effect of different ion concentrations on biomass production was different and did not show any trend. A positive effect on the production of metabolites is observed in the Co_2 sample, except for total sterols.

As a result, it cannot be said unequivocally that higher or lower concentrations of selenium would always have a positive effect on the production of biomass or metabolites, or that cobalt will always have more negative effects. Therefore it is necessary to extend the research to a larger number of microorganisms.

5 Acknowledgements

The study was supported by the Internal grant competition, which is implemented as part of the OP VVV project entitled Quality internal grants BUT (KInG BUT); reg. number: CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016948 specifically by KInG No. 7746

6 References

1. Azarpour, A., Zendejboudi S., Mohammadzadeh O., Rajabzadeh A. R., Chatzis I.: A review on microalgal biomass and biodiesel production through Co-cultivation strategy. *Energy Conversion and Management*. 267 (2022).
2. DOUGLAS, Susan, A. LARKUM a John RAVEN. *Photosynthesis in algae*. Boston: Kluwer Academic, 2003. ISBN 0792363337.
3. Wrede D., Taha M., Miranda A., Kadali K., Stevenson T., Ball A., Mouradov A., Wilson R.: Co-Cultivation of Fungal and Microalgal Cells as an Efficient System for Harvesting Microalgal Cells, Lipid Production and Wastewater Treatment. *PLoS ONE*. 9 (2014). KHATTAR, J., D. SINGH a Gurpreet KAUR. *Algal biology and biotechnology*. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2009. ISBN 9789380026190.
4. PARMAR, Asha, Niraj SINGH, Ashok PANDEY, Edgard GNANSOUNOU a Datta MADAMWAR. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology* [online]. 2011, 102(22), 10163-10172 [cit. 2021-06-02]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2011.08.030
5. CARR, N. a Brian WHITTON. *The Biology of cyanobacteria*. Berkeley: University of California Press, 1982. ISBN 0520047176.
6. WHITTON, Brian a Malcolm POTTS. *Introduction to the Cyanobacteria*. WHITTON, Brian A., ed., Brian WHITTON. *Ecology of Cyanobacteria II* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, s. 1-13 [cit. 2021-06-02]. ISBN 978-94-007-3854-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-3855-3_1

7. FOGG, G. E. Algal Adaptation to Stress — Some General Remarks. RAI, Lal Chand a Jai Prakash GAUR, ed., Lal RAI, Jai GAUR. Algal Adaptation to Environmental Stresses [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, s. 1-19 [cit. 2022-05-10]. ISBN 978-3-642-63996-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-59491-5_1
8. CIRULIS, Judith, J. SCOTT a Gregory ROSS. Management of oxidative stress by microalgae. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology [online]. 2013, 91(1), 15-21 [cit. 2021-06-02]. ISSN 0008-4212. Dostupné z: doi:10.1139/cjpp-2012-0249
9. ŠPAČKOVÁ, D. Charakterizace biologických účinků extraktů získaných z kvasinek a autotrofních mikroorganismů [online]. Brno: Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. 2022.

Commercial application of microalgae and cyanobacteria extracts

P. Strečanská
R. Uhlířová, I. Márová

Brno University of Technology,
Faculty of Chemistry,
Institute of Food Chemistry and Biotechnology
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic
xcstrecanska@vutbr.cz

1 Introduction

The genera *Chlorella* and *Spirulina* (also called *Arthrospira*) are currently one of the best-known representatives of two important groups of microalgae and cyanobacteria. These are autotrophic microorganisms that produce a significant number of proteins, vitamins, and pigments such as carotenoids and chlorophylls, fatty acids, sterols, and other substances. The production of these active compounds made them interesting from a nutritional, cosmetic, and visual point of view and predestined for application in the food and cosmetics industry^{1,2}. According to the EU Novel food catalogue, the European legislation does not consider *Chlorella* or *Spirulina* to be novel food, as they were demonstrably consumed before May 15, 1997³. They have been on the market for quite some time, especially as nutritional supplements, in the form of dried biomass. In addition to their significant protein content, they are consumed and applied to the skin mainly due to the antioxidant activity of the substances they contain that can help the body protect cells from oxidative stress^{1,2}.

This work aimed to extract the active substances of our interest from cultivated and commercial biomass samples of microalgae and cyanobacteria. Then characterize the extracts in terms of pigment content, total phenols and antioxidant activity and monitor the effect of the presence of the extracts in question on the viability of skin HaCaT and intestinal human CaCo-2 cell lines.

2 Experimental

2.1 Cultivation of microalgae and cyanobacteria

Representatives of microalgae and cyanobacteria were cultured, namely, *Chlorella sorokiniana* (BBM medium) and *Arthrospira maxima* (Spirulina medium), which come from the collection of autotrophic organisms of the Botanical Institute of the Academy of Sciences of the Czech Republic in Třeboň (CCALA).

The inoculum sample was taken sterilely, then the absorbance was measured and the culture of the microorganism was inoculated into the production medium so that the

absorbance of the resulting solution approached the value $A = 0.1$. Both algae and cyanobacteria were cultivated for 21 days in a liquid medium in photobioreactors in parallel bottles with a volume of 2000 ml. Cultivation of microorganisms took place under continuous lighting and aeration at laboratory temperature.

Commercial samples of *Chlorella* and *Spirulina* were also purchased.

2.2 Total phenolics

Determination of the total phenolics content present in the water and ethanolic extract samples was performed using the modified Folin-Ciocalteu method⁴. Folin-Ciocalteu reagent was diluted 1:9 with deionized water. Then, 9 ml of diluted reagent was added to 1 mL of distilled water and 50 μ l of the sample. This solution was mixed by vortex, and after 5 min 1 ml of a saturated sodium carbonate solution was added and mixed repeatedly. Absorption was measured after 15 min at 750 nm. The solution of gallic acid was used as standard.

2.3 Total carotenoids and chlorophylls

The concentration of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* was calculated from equations taken from Lichtenthaler et al.⁵. The method also enables the determination of total carotenoids. Absorbance values at 470, 649, and 664 nm were used for the calculation, and dilution had to be considered. The calculated concentrations were subsequently converted to concentrations of extracted substances in mg/g weight of algal biomass.

2.4 Antioxidant activity

For evaluation of antioxidant activity Trolox equivalent assay with ABTS radical was performed⁶. ABTS radical was prepared by mixing 7 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfuric acid) diammonium salt), potassium persulfate, with 2.45 mM potassium persulfate in deionized water and let in dark for 12 h. Before using ABTS+ was diluted with UV-vis ethanol for absorption $A = 0.70$ at 734 nm with ethanol as blank.

For measurement of antioxidant activity, 1 ml of ABTS+ and 10 μ L of the sample were added into an Eppendorf test tube and the decrease of absorption was measured after 10 min. A calibration curve was made by Trolox in the range of concentration 50–400 μ g/ml.

2.5 Soluble proteins determination by Hartree-Lowry method

To determine the total proteins, present in the aqueous extracts the Hartree-Lowry method⁷ using albumin standard solution was applied.

2.6 MTT-based cytotoxicity test

The procedure for determining metabolic activity using the MTT test was adopted and adapted from Xueshu Li's article⁸. Cells were first inoculated into 96-well plates with a flat bottom. The cell density was $2-5 \cdot 10^5$ cells per ml. 100 μ l of the diluted culture was pipetted into each well and left for 24 hours in a CO₂ culture box. Subsequently, the medium was pipetted off the next day and replaced with sterile samples diluted in the

medium. In addition to the samples, there was also a positive and negative control on each plate. Pure medium, also known as "cell control - CC", was used as a negative control, i.e. a case where the culture's growth and metabolism were not affected. On the contrary, 60% ethanol was used as a positive control, when the growth and metabolism of the culture were affected and cell death occurred. The cytotoxic effect on the cell line was evaluated after 24 hours of cultivation.

As a second step, a sterile solution of MTT in phosphate buffered saline (PBS) with a concentration of 2.5 mg/ml was added after 24 hours of cultivation. The reaction then took place in a CO₂ cultivation box for 3 hours. Subsequently, 100 µl of 10% SDS in PBS was added to each well to dissolve the formed formazan crystals. The plates prepared in this way were left in the dark at laboratory temperature until the second day when the absorbance was measured at a wavelength of 543 nm. For evaluation, the measured absorbance values were compared with the negative control, which contained only cells and a clean medium, and were evaluated as viability percentages compared to this control. Another evaluation option is the calculation of LC50, i.e. the concentration of the sample at which the cells and their metabolism are affected by 50% compared to the negative control, as well as LC10 and LC90.

Two cell lines were chosen for cytotoxicity tests: human colon adenocarcinoma cells CaCo-2 and immortalized keratinocytes HaCaT. Selected samples of extracts in the concentration range of 0.39–25% and 4–28% were tested.

3 Results and discussion

After the cultivation of microalgae and cyanobacteria, liquid-solid extraction was carried out with various solvents in a liquid:solid ratio of 10:1. It turned out that the highest extraction efficiency (Table 1) was shown by aqueous extracts, both in cultivated and purchased commercial samples of microalgae and cyanobacteria. This may be caused by the extraction of proteins into the water phase, in the case of the cyanobacteria of the genus *Spirulina*, it may be primarily water-soluble deep-coloured light-capturing phycobiliproteins. Also, for all samples in Table 1, a higher extraction efficiency can be observed when using 96% ethanol compared to 60% ethanol, which also corresponds to the measured higher content of lipophilic pigments in 96% ethanol.

The antioxidant activity was spectrophotometrically determined by the TEAC method, the measured values of which are presented in Table 1. The highest antioxidant activity of all samples was shown by the aqueous extract of the cyanobacterium *Arthrospira maxima*, up to 68.1 ± 1.1 mgTE/g. It is possible to notice a difference between the ratio of antioxidant activity and extraction yield in the aqueous extract of a commercial biomass sample of *Spirulina alga* and cultivated cyanobacteria *Arthrospira maxima*.

With the cyanobacteria *Arthrospira maxima*, we managed to extract approximately 64% of the substances from the microbial biomass and these substances retained their antioxidant activity, while with a commercial sample of cyanobacteria we achieved a similar extraction efficiency, but with the extracted substances due to the lower antioxidant activity, oxidation reactions could have occurred either in the product processing procedure or in improper storage.

Table 1: Characterisation of microalgae and cyanobacteria extracts

Sample	Extract	Extraction efficiency (%)	TEAC (mgTE/g)	Total phenolic substances (mg/g)
<i>Chlorella vulgaris</i>	water	22.0 ± 1.2	9.18 ± 0.45	11.55 ± 0.08
	60% ethanol	3.7 ± 0.7	0.76 ± 0.07	ND
	96% ethanol	7.6 ± 0.4	1.03 ± 0.03	ND
<i>Chlorella sorokiniana</i>	water	16 ± 0.9	2.57 ± 0.25	0.02 ± 0.01
	60% ethanol	1.3 ± 0.5	0.23 ± 0.02	ND
	96% ethanol	6.8 ± 0.4	1.06 ± 0.03	ND
<i>Spirulina alga</i>	water	51.7 ± 3.2	0.16 ± 0.02	0.04 ± 0.1
	60% etOH	20.3 ± 2.6	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
	96% etOH	28.3 ± 1.2	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0
<i>Arthrospira maxima</i>	water	64.0 ± 4.8	61.80 ± 1.10	17.6 ± 0.3
	60% ethanol	2.7 ± 0.6	0.30 ± 0.10	ND
	96% ethanol	10.2 ± 0.3	1.81 ± 0.11	ND

On the other hand, a different trend was observed in samples of microalgae of the genus *Chlorella*. A commercial sample of *Chlorella vulgaris* biomass recorded an antioxidant activity value of 9.18 mgTE/g with an extraction efficiency of approximately 22%, and an aqueous extract of the cultured microalgae *Chlorella sorokiniana* had an antioxidant activity of 2.57 with an extraction efficiency of 16%. The manufacturer of a commercial sample of *Chlorella vulgaris* biomass states in the product description that it is a freshwater microalga with a disrupted cell wall to increase biological efficiency and digestibility. Disruption of the cell wall as part of biomass processing could have resulted in the extraction of a larger amount of substances with antioxidant activity compared to the biomass extract of the cultured alga *Chlorella sorokiniana*, in which there was no targeted disruption of the cell wall.

The content of carotenoids and chlorophylls was determined spectrophotometrically and by calculation, the results of the respective measurements can be seen in Table 2. The highest content of coloured active substances, especially chlorophyll *a* was extracted into 96% ethanol in commercial samples of the microalgae *Chlorella vulgaris* and the cyanobacteria *Spirulina alga*. It was mainly Chlorophyll *a* in amounts of 4.9 and 4.3 mg/g of extracted biomass.

Table 2: Characterisation of microalgae and cyanobacteria extracts regarding the content of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids.

Sample	Extract	Chlorophyll (mg/g)	Chlorophyll (mg/g)	Carotenoids (mg/g)
<i>Chlorella vulgaris</i>	water	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.02 ± 0.00
	60% ethanol	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.0	ND
	96% ethanol	4.9 ± 0.1	1.6 ± 0.2	0.02 ± 0.00
<i>Chlorella sorokiniana</i>	water	0.6 ± 0.0	1.4 ± 0.0	ND
	60% ethanol	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	ND
	96% ethanol	1.9 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.18 ± 0.01
<i>Spirulina alga</i>	water	0.6 ± 0.0	1.9 ± 0.1	ND
	60% etOH	1.3 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.10 ± 0.30
	96% etOH	4.3 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.00 ± 0.10
<i>Arthrospira maxima</i>	water	2.0 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.40 ± 0.01
	60% ethanol	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.04 ± 0.02
	96% ethanol	1.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.13 ± 0.01

It follows from the measured data of total soluble proteins (Table 3) that all water extracts from microalgae and cyanobacteria contained a high percentage of soluble proteins in the range of 33–57 wt. %, which corresponds to the literature, which states that microalgae of the genus *Chlorella* normally contain 51–58% proteins⁹, while cyanobacteria of the genus *Spirulina* up to 60–70 wt%¹⁰. Only 33.7–45.4 % protein was determined in our aqueous extracts. However, according to the colour of the extract, these could largely belong to water-soluble phycobiliproteins, such as c-phycoyanin, which usually account for 47% of the total protein content in biomass.

Table 3: Soluble proteins content determination in water extracts of microalgae and cyanobacteria

Water extract	Sample	Soluble proteins (mg/g)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	574.38 ± 3.08
<i>Chlorella sorokiniana</i>	479.91 ± 8.48	
<i>Spirulina alga</i>	453.86 ± 14.04	
<i>Arthrospira maxima</i>	337.13 ± 4.31	

As can be seen in Tables 1 and 2, in general, compared to ethanol extracts, aqueous extracts showed higher extraction efficiency, higher antioxidant activity, and, compared to 60% ethanol, a higher content of color pigments. For this reason, aqueous extracts of cultured microalgae and cyanobacteria were selected for testing on cell lines.

Selected extracts from cultured microalgae and cyanobacteria were monitored for biological activity and influence on the metabolism of immortalized human keratinocytes HaCaT and CaCO-2 colorectal adenocarcinoma cells. Figure 1 shows the dependence of cell viability on the content of the water extract of microalgae and cyanobacteria.

After the addition of the selected extracts in a certain amount, the cells showed even higher viability and a higher rate of metabolism. For example, in case of 12 vol.% extract from *Arthrospira maxima* the increase of metabolism rate was detected in human keratinocytes, cell viability increased to $133.68\% \pm 3.73$.

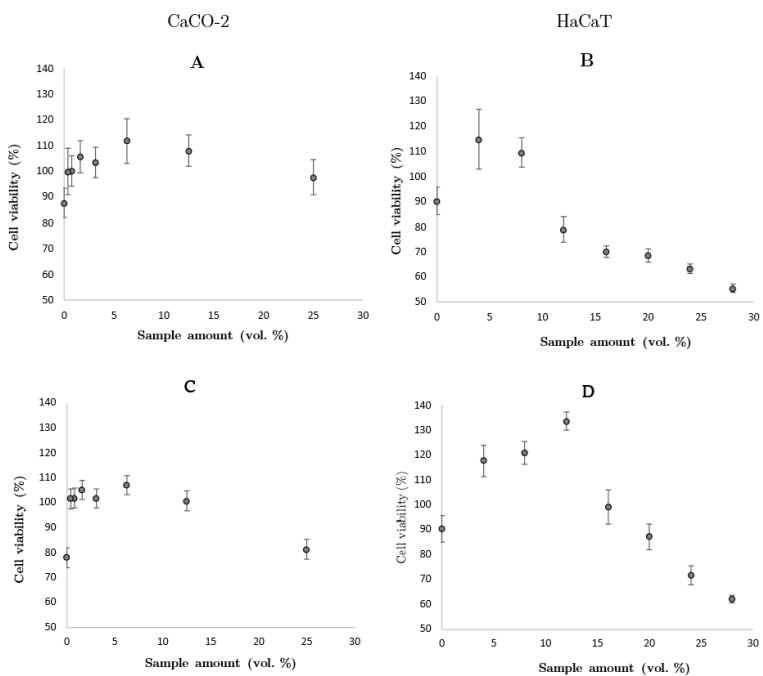


Figure 1: Determination of the dependence of cell viability on the content of the water extract of microalgae and cyanobacteria. A: Water extract of *Chlorella sorokiniana* on cell lines CaCo- 2; B: Water extract of *Chlorella sorokiniana* on cell lines HaCaT; C: Water extract of *Arthrospira maxima* on cell lines CaCo- 2; D: Water extract of *Arthrospira maxima* on cell lines HaCaT

Table 4 shows the calculated lethal concentrations for the tested samples in free form. The value of LC10, when 90% of the examined cells do not decrease in viability, is 10.5 vol.% in HaCaT for extracts from *Chlorella vulgaris* and 18.9 vol.% for extracts from *Spirulina*. For CaCo-2 cell lines it is 35.42 and 19.15 vol.%. In the cosmetics industry, additions of active substances range from 0.1 - 25%. LC50 values of both samples in human keratinocytes were above 30 vol. %, therefore it is possible to consider the selected samples as suitable for use in cosmetics.

In intestinal cells, the value for LC50 was estimated even up to 47.7 vol. % for the extract from the biomass of the genus *Arthrospira* and 87.8 vol. % for the genus *Chlorella*.

Table 4: Lethal doses of *Chlorella* and *Arthrospira* water extracts on cell lines CaCO-2 and HaCaT

Lethal dose	<i>Chlorella sorokiniana</i> extract (vol.%)		<i>Arthrospira maxima</i> extract (vol %)	
	HaCaT	CaCo-2	HaCaT	CaCo-2
LD10	10.5	35.4	18.9	19.2
LD50	33.0	87.8	31.4	47.7
LD100	62.7	140.1	44.0	76.3

4 Conclusion

After the cultivation of microalgae and cyanobacteria, extracts were successfully prepared by "solid-liquid" extraction, with an extraction yield ranging from 1 to 64%. It turned out that aqueous extracts show the highest extraction efficiency. Color-active substances such as carotenoids and chlorophylls were determined in all extracts. These substances were best extracted into 96% ethanol. The antioxidant activity was determined, which, on the other hand, was higher in the aqueous extracts of all four samples. The highest antioxidant activity was measured in the water extract of cyanobacteria *Arthrospira maxima*, up to 68.1 ± 1.1 mgTE/g.

As another parameter content of soluble proteins was determined in water extracts of all prepared samples. It turned out that all samples contain many soluble proteins, especially phycobiliproteins in cyanobacteria, due to which they have great potential for use in the food industry. For example, as natural dyes with antioxidant properties or food supplements.

Based on their high extraction efficiency and antioxidant activity, the aqueous solutions were selected for further testing of biological activity and the effect on the metabolism of the HaCaT and CaCo-2 cell lines to evaluate possible applications in the cosmetic and food industries.

Cell viability was only minimally affected by the aqueous extracts of *Chlorella* and *Arthrospira*. The results of MTT cytotoxicity assay on immortalized skin and intestinal cells show that the mentioned aqueous extracts are suitable for application in the food and cosmetic industry.

5 Acknowledgements

The study was supported by the Internal grant competition, which is implemented as part of the OP VVV project entitled Quality internal grants BUT (KInG BUT); reg. number: CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016948 specifically by KInG No. 7746.

6 References

1. ZHOU, Jianjun, Min WANG, Christine BÄUERL, Erika CORTÉS-MACÍAS, Joaquim CALVO-LERMA, a Francisco J. BARBA. Food Chemistry [online]. 2023, 401 [cit. 2022-11-18]. ISSN 03088146. Available from: doi:10.1016/j.foodchem.2022.
2. KOYANDE, Apurav Krishna, Kit Wayne CHEW, Krishnamoorthy RAMBABU, Yang TAO, Dinh-Toi CHU a Pau-Loke SHOW. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. Food Science and Human Wellness [online]. 2019, 8(1), 16-24 [cit. 2022-11-18]. ISSN 22134530. Available from: doi:10.1016/j.fshw.2019.03.
3. EU Novel food catalogue. An official website of the European Union [online]. [cit. 2022-11-18]. Available from: https://webgate.ec.europa.eu/fip/novel_food_catalogue/
4. RAMÓN-GONÇALVES, Marina, Esther GÓMEZ-MEJÍA, Noelia ROSALES-CONRADO, María Eugenia LEÓN-GONZÁLEZ a Yolanda MADRID. Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. Waste Management [online]. 2019, 96, 15-24 [cit. 2022-11-15]. ISSN 0956053X. Available from: doi:10.1016/j.wasman.2019.07.009
5. LICHTENTHALER, Hartmut K. a Claus BUSCHMANN. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry [online]. 2001, 1(1), F4.3.1-F4.3.8 [cit. 2022-11-15]. ISSN 25725599. Available from: doi:10.1002/0471142913.faf0403s01
6. RE, Roberta, Nicoletta PELLEGRINI, Anna PROTEGGENTE, Ananth PANNALA, Min YANG a Catherine RICE-EVANS. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine [online]. 1999, 26(9-10), 1231-1237 [cit. 2022-11-15]. ISSN 08915849. Available from: doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3
7. HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry [online]. 1972, 48(2), 422-427 [cit. 2022-11-15]. ISSN 00032697. Available from: doi:10.1016/0003-2697(72)90094-2
8. LI, Xueshu, Jaroslav TURÁNEK, Pavlína KNÖTIGOVÁ et al. Hydrophobic tail length, degree of fluorination and headgroup stereochemistry are determinants of the biocompatibility of (fluorinated) carbohydrate surfactants. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]. 2009, 73(1), 65-74 [cit. 2019-11-28]. ISSN 09277765. Available from: doi:10.1016/j.colsurfb.2009.04.023

9. 194 SPOLAORE, Pauline, Claire JOANNIS-CASSAN, Elie DURAN a Arsène ISAMBERT. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2006, 101(2), 87-96 [cit. 2022-11-02]. ISSN 13891723. Available from: doi:10.1263/jbb.101.87
10. 195 THEVARAJAH, Bavatharny, Gannoru Kankanamalage Sanuji Hasara NISHSHANKA, Malith PREMARATNE, P.H.V. NIMARSHANA, Dillirani NAGARAJAN, Jo-Shu CHANG a Thilini U. ARİYADASA. Large-scale production of Spirulina-based proteins and c-phycoerythrin: A biorefinery approach. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2022, 185 [cit. 2022-11-02]. ISSN 1369703X. Available from: doi:10.1016/j.bej.2022.108541

