



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STUDIUM MOŽNÝCH APLIKACÍ POLYMERU KYSELINY GLUTAMOVÉ

STUDY ON POTENTIAL APPLICATIONS OF GLUTAMIC ACID POLYMER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Katarína Čangelová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1265/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Katarína Čangelová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Studium možných aplikací polymeru kyseliny glutamové

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Základní charakterizace polymeru glutamové kyseliny
3. Experimentální studium možných aplikací PGA

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Katarína Čangelová
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Predmetom diplomovej práce je štúdium možných aplikácií γ izoformy polyméru kyseliny glutámovej (γ -PGA). Teoretická časť je zameraná na vlastnosti tohto biopolyméru a potenciálne aplikácie v rôznych oblastiach. Sú spomenutí aj jeho producenti a mechanizmus biosyntézy. V experimentálnej časti bol najskôr polymér charakterizovaný prostredníctvom nasledujúcich metód: FT-IR spektroskopia, TGA, DSC a SEC-MALS. Bol tiež zistený jeho izoelektrický bod, antimikrobiálna aktivita a rozpustnosť v rôznych rozpúšťadlách. Biopolymér bol tiež zrážaný divalentnými kationmi a študovaná bola jeho interakcia s opačne nabitým surfaktantom CTAB. Hlavnou experimentálnou štúdiou bolo sledovanie vplyvu γ -PGA na viabilitu *Saccharomyces cerevisiae* a *Lactobacillus rhamnosus* pri stresových podmienkach pomocou prietokovej cytometrie. Vykonané stresy zahŕňali pôsobenie etanolu, teplotný stres s vysokou teplotou a mrazením, pri ktorom boli jeho účinky porovnané s konvenčnými kryoprotektantami. Bunky zmiených mikroorganizmov boli stresované taktiež osmoticky a boli vystavené modelovým gastrointestinálnym šťavam – žalúdočnej, pankreatickej a žlčovej. Ochranné účinky γ -PGA na bunky boli zaznamenané pri etanолоvom strese na *Lactobacillus rhamnosus*. Potvrdené boli jeho vynikajúce kryoprotekčné vlastnosti a ochranný efekt mal aj na bunky *Saccharomyces cerevisiae* pri pôsobení žalúdočnej šťavy. Na záver experimentálnej časti boli pripravované častice γ -PGA/alginát vhodné pre enkapsuláciu probiotických baktérií a nanočastice γ -PGA/chitosan pre enkapsuláciu biologicky aktívnych látok.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

polymér kyseliny glutámovej, γ -PGA, charakterizácia, aplikácie, prietoková cytometria, stres, protekčné účinky, *Lactobacillus rhamnosus*, *Saccharomyces cerevisiae*, kryoprotektant, simulované gastrointestinálne šťavy, γ -PGA/alginát perly, γ -PGA/chitosan nanočastice

ABSTRACT

The subject of the thesis is study of possible applications of γ isoform of glutamic acid polymer (γ -PGA). The theoretical part is focused on the properties of this biopolymer and potential applications in various areas. Producers and mechanisms of biosynthesis are also mentioned. In the experimental part, the polymer was firstly characterised by following methods: FT-IR spectroscopy, TGA, DSC and SEC-MALS. Its isoelectric point, antimicrobial activity and solubility in various solvents were also determined. The biopolymer was also precipitated by divalent cations and its interaction with oppositely charged CTAB surfactant was studied. The main experimental study was researching the effect of γ -PGA on viability of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* under stress conditions by flow cytometry. The performed stresses included ethanol exposure, high temperature and freezing stress, in which its effects were compared to conventional cryoprotectants. The cells of the mentioned microorganisms were also stressed osmotically and exposed to model gastrointestinal juices - gastric, pancreatic and bile. The protective effects of γ -PGA on the cells were recorded in ethanol stress on *Lactobacillus rhamnosus*. Its excellent cryoprotection properties were confirmed and its protective effect of gastric juice exposure on *Saccharomyces cerevisiae* cells was also observed. At the end of the experimental part, γ -PGA/alginate beads suitable for encapsulation of probiotic bacteria and γ -PGA/chitosan nanoparticles for encapsulation of biologically active substances.

KEYWORDS

glutamic acid polymer, γ -PGA, characterisation, applications, flow cytometry, stress, protective effects, *Lactobacillus rhamnosus*, *Saccharomyces cerevisiae*, cryoprotectant, simulated gastrointestinal juices, γ -PGA/alginate beads, γ -PGA/chitosan nanoparticles

ČANGELOVÁ, K. *Studium možných aplikací polymeru kyseliny glutamové*. Brno, 2019. 64 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE

Rada by som sa poďakovala vedúcemu mojej diplomovej práce doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D., za odborné vedenie a ochotu pomôcť, kedykoľvek bolo potrebné. Za pomoc by som chcela tiež poďakovať mojej konzultantke Ing. Eve Fryšovej. Aj vďaka jej kamarátskemu prístupu a pozitívnej nálade v laboratóriu bolo meranie experimentálnej časti príjemne stráveným časom. Ing. Eve Slaninovej patrí taktiež moje ďakujem za ochotu zodpovedať každú moju otázku a pomoc pri meraniach. Za pomoc pri charakterizácii polyméru ďakujem Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. a Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D.. V neposlednom rade chcem poďakovať mojej rodine a priateľovi za pomoc a dôveru vo mňa.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická časť.....	9
2.1	Polymér kyseliny glutámovej	9
2.2	Organizmy produkujúce γ -PGA	9
2.3	Biosyntéza γ -PGA.....	10
2.4	Funkcia γ -PGA v organizmoch.....	12
2.5	Vlastnosti γ -PGA	13
2.5.1	Štruktúrna charakteristika, fyzikálne a chemické vlastnosti.....	13
2.5.2	Konformačné a molekulárne interakcie γ -PGA.....	14
2.5.3	Rozdiely γ -PGA oproti proteínom.....	15
2.6	Aplikácie γ -PGA	15
2.6.1	Farmaceutické a lekárske aplikácie	16
2.6.2	Kozmetické aplikácie.....	17
2.6.3	Potravinársky priemysel	18
2.6.4	Životné prostredie	20
2.6.5	Ostatné aplikácie γ -PGA.....	22
3	Experimentálna časť	24
3.1	Použité chemikálie	24
3.1.1	Polymér kyseliny glutámovej	24
3.1.2	Ostatné chemikálie.....	24
3.2	Použité prístroje	25
3.3	Použité mikroorganizmy	25
3.3.1	Kultivácia mikroorganizmov	25
3.4	Charakterizácia γ -PGA	26
3.4.1	FT-IR spektroskopia	26
3.4.2	Termická analýza.....	27
3.4.3	Molekulová hmotnosť	27
3.4.4	Izoelektrický bod	27
3.4.5	Rozpustnosť	28
3.4.6	Zrážanie γ -PGA iónmi kovov	28
3.4.7	Zrážanie γ -PGA pomocou CTAB.....	28
3.4.8	Antimikrobiálna aktivita.....	29
3.5	Vplyv γ -PGA na viabilitu prokaryotických a eukaryotických buniek.....	29
3.5.1	Etanolový stres.....	30
3.5.2	Teplotný stres – vysoká teplota	30
3.5.3	Teplotný stres – mrazenie	30
3.5.4	Osmotický stres	30

3.5.5	Pôsobenie modelových gastrointestinálnych štiav	30
3.5.6	Stanovenie viability pomocou prietokového cytometru	31
3.6	Príprava častíc	31
3.6.1	Príprava alginátových, γ -PGA/alginát a γ -PGA častíc kvapkaním a ultrazvukom	31
3.6.2	Príprava častíc γ -PGA/alginát pomocou enkapsulátoru	31
3.6.3	Príprava nanočastíc γ -PGA/chitosan	32
4	Výsledky a diskusia	33
4.1	Charakterizácia γ -PGA	33
4.1.1	FT-IR spektroskopia	33
4.1.2	Termická analýza	33
4.1.3	Molekulová hmotnosť	35
4.1.4	Izoelektrický bod	36
4.1.5	Rozpustnosť	37
4.1.6	Zrážanie γ -PGA iónmi kovov	38
4.1.7	Zrážanie γ -PGA pomocou CTAB	39
4.1.8	Antimikrobiálna aktivita	40
4.2	Vplyv γ -PGA na viabilitu prokaryotických a eukaryotických buniek	41
4.2.1	Etanolvý stres	42
4.2.2	Teplotný stres – vysoká teplota	43
4.2.3	Teplotný stres – mrazenie	44
4.2.4	Osmotický stres	45
4.2.5	Pôsobenie modelových gastrointestinálnych štiav	46
4.3	Príprava častíc	48
4.3.1	Príprava častíc z γ -PGA a alginátu	48
4.3.2	Príprava nanočastíc γ -PGA/chitosan	51
5	Záver	53
6	Použitá literatúra	55
7	Zoznam použitých skratiek	64

1 ÚVOD

Polymér kyseliny glutámovej (γ -PGA) je vo vode rozpustný, prirodzene sa vyskytujúci polymér. Vďaka jeho netoxicity, biodegradabilite a neimunogenicite nachádza uplatnenie v potravinárskom či farmaceutickom priemysle a pri čistení odpadových vôd.

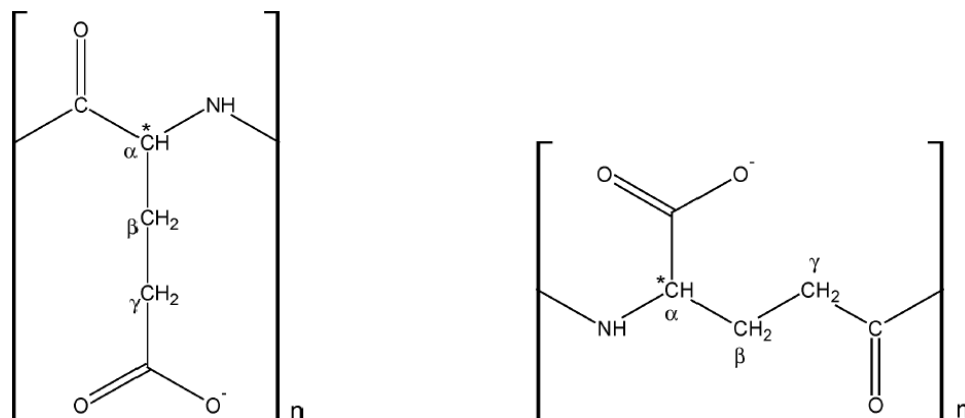
V súčasnosti sú čoraz populárnejšie probiotické potravinárske výrobky obsahujúce mikrobiálne kmene s užitočnými prínosmi pre zdravie organizmu. Vysoká publicita týchto produktov priťahuje pozornosť spotrebiteľov. Zdravotné prínosy však závisia od viability probiotických mikroorganizmov a zachovania ich vlastností. Počas skladovania a pri prechode gastrointestinálnym traktom dochádza k výraznej strate ich životaschopnosti. Preto pretrváva potreba zvýšenia prežitia probiotík. Použitie γ -PGA by mohlo navýšiť životaschopnosť probiotík pri procese lyofilizácie, keďže je účinným kryoprotektantom. Je tiež pH senzitívnym polymérom, pri nízkom pH ovocných štiav alebo žalúdočnej šťavy tvorí kompaktnú α -helikálnu konformáciu, ktorá by chránila mikroorganizmus a v cieľovom mieste v črevách by dochádzalo k jeho uvoľneniu narušením vodíkových väzieb. Probiotiká sú pri spracovaní a skladovaní vystavené aj množstvu iných stresov, pri ktorých bol efekt γ -PGA na viabilitu probiotických mikroorganizmov študovaný v tejto práci.

Enkapsulácia do polymérnych materiálov nachádza uplatnenie nielen v potravinárskom priemysle na zapuzdrenie probiotík a prírodných zložiek ako vitamíny, antioxidanty, ale aj v kozmetickom a farmaceutickom priemysle na podávanie antimikrobiálnych a terapeutických činidiel. γ -PGA v zmesi s alginátom alebo chitosanom sa zdá byť na to vhodným kandidátom.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polymér kyseliny glutámovej

Polymér kyseliny glutámovej (PGA) je biodegradabilný, neimunogénny aniónový homopolyamid pozostávajúci z jednotiek D- a/alebo L-glutámovej kyseliny. V závislosti od prepojenia jednotiek peptidovou väzbou medzi α -aminoskupinou a karboxylovou skupinou, môžeme polymér rozlíšiť na dve izoformy, α -PGA a γ -PGA (Obrázok 1) [1; 2; 3].



Obrázok 1: Štruktúra α -PGA (naľavo) a γ -PGA [1]

Preferovaná metóda produkcie α -PGA je chemická syntéza pomocou nukleofilne iniciovanej polymerizácie γ -chráneného N-karboxyanhydridu kyseliny L-glutámovej. Kým mikrobiálna syntéza α -PGA je náročná a je ju možné realizovať len pomocou rekombinantného kmeňa *Escherichia coli*, γ -PGA môže byť produkovaná veľkým množstvom mikrobiálnych druhov. V súčasnosti existujú ešte ďalšie tri spôsoby pre produkciu γ -PGA: chemická syntéza, peptidová syntéza, biotransformácia. V porovnaní s týmito metódami je mikrobiálna syntéza najefektívnejšia a má veľa výhod, vrátane lacných surovín, minimálneho znečistenia životného prostredia, vysokej čistoty prírodného produktu a miernych reakčných podmienok [1; 4].

2.2 Organizmy produkujúce γ -PGA

Polymér γ -PGA prvýkrát objavili vedci Ivánovics a Bruckner v roku 1937 ako súčasť kapsuly *Bacillus anthracis*, gram-pozitívnej sporujúcej baktérie spôsobujúcej antrax. V roku 1942 Bowarnick preukázal, že γ -PGA je voľne sekretovaná do rastového média *Bacillus subtilis* ako produkt fermentácie. Odvtedy bol γ -PGA objavený u druhov zo všetkých troch domén (archea, baktérie, eukaryota). Prírodzene vyskytujúci sa zdroj γ -PGA je v tradičnom japonskom jedle *natto*, fermentačnom produkte baktérií *Bacillus subtilis* rastúcich na sóji [4; 5; 6; 7].

Organizmus používaný na výrobu zložiek potravy, kozmetiky a liekov musí byť uznávaným bezpečným producentom, nemal by byť súčasným producentom potenciálne toxických alebo imunogénnych látok, ktoré by mohli kontaminovať produkt. Baktérie rodu *Bacillus* (hlavne *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens*) sa najčastejšie používajú na produkciu γ -PGA, považujú sa za bezpečné a majú dlhú históriu bezpečného použitia v potravinárskych výrobkoch [8; 9].

Kmene *Bacillus* produkujúce γ -PGA môžu byť rozdelené do dvoch skupín podľa požiadaviek na živiny. Producenti závislí od kyseliny glutámovej vyžadujú externý prísun kyseliny L-glutámovej, glukózu, kyselinu citrónovú a/alebo glycerol ako zdroje uhlíka na výrobu γ -PGA alebo aktiváciu enzýmového systému syntézy γ -PGA. Kmene, ktoré môžu produkovať polymér v neprítomnosti externe dodanej kyseliny glutámovej vyžadujú dusík z organických alebo anorganických zdrojov a rôzne cukry. Kmene závislé od kyseliny glutámovej priťahujú veľkú pozornosť, pretože sú vo všeobecnosti lepšími producentmi. Najvyššia konečná koncentrácia γ -PGA ($101,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) s vysokou produktivitou ($2,19 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) bola dosiahnutá u producenta *Bacillus subtilis* ZJU-7 závislého od kyseliny glutámovej [8; 10; 11; 12].

Enantioméne čistý γ -D-PGA syntetizuje len *Bacillus anthracis*. Druh *Natrialba aegyptiaca* je schopný produkovať čistú L-enantioménu formu γ -PGA, avšak nie je vhodný pre priemyselnú výrobu γ -PGA kvôli jeho vysokej náročnosti na kultiváciu. Všetky ostatné druhy poskytujú polyméry pozostávajúce zo zmesi dvoch enantioménych foriem viac alebo menej racemickej kompozície. Stereochemické zloženie γ -PGA sa mení v rôznych kmeňoch a pri rôznych kultivačných podmienkach. Pomer izomérov kyseliny glutámovej v γ -PGA je ovplyvnený koncentráciou Mn^{2+} v kultivačnom médiu niektorých druhov *Bacillus*. Zvýšenie koncentrácie Mn^{2+} zrejme zvyšuje aktivitu enzýmu glutamát racemázy [8; 13; 1].

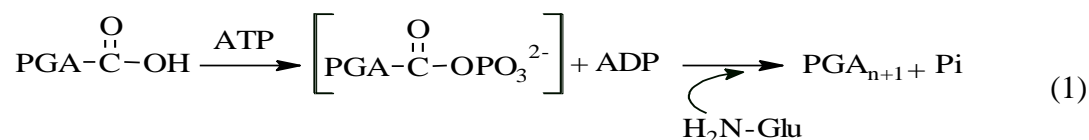
2.3 Biosyntéza γ -PGA

Prekurzorom γ -PGA je exogénna (získaná cez transportný systém glutamátu) alebo endogénna kyselina L-glutámová (L-Glu). Endogénna produkcia kyseliny L-glutámovej vyžaduje najskôr konverziu uhlíkového zdroja na acetyl-CoA, následne na kyselinu α -ketoglutárovú (α -KG) cez Citrátový cyklus. Kyselina α -ketoglutárová slúži ako priamy prekurzor pre syntézu kyseliny L-glutámovej. Konverzia kyseliny α -ketoglutárovej na kyselinu L-glutámovú môže prebiehať dvomi spôsobmi. Buď reakciou katalyzovanou 2-oxoglutarát aminotransferázou medzi kyselinou α -ketoglutárovou a L-glutamínom (L-Gln), alebo reakciou kyseliny α -ketoglutárovej so síranom amónnym katalyzovanou enzýmom glutamát dehydrogenáza v neprítomnosti glutamínu [4; 7].

Kyselina D-glutámová (D-Glu) inkorporovaná do rastúceho reťazca γ -PGA musí byť získaná z kyseliny L-glutámovej racemizačnou reakciou. Existujú dva gény glutamát

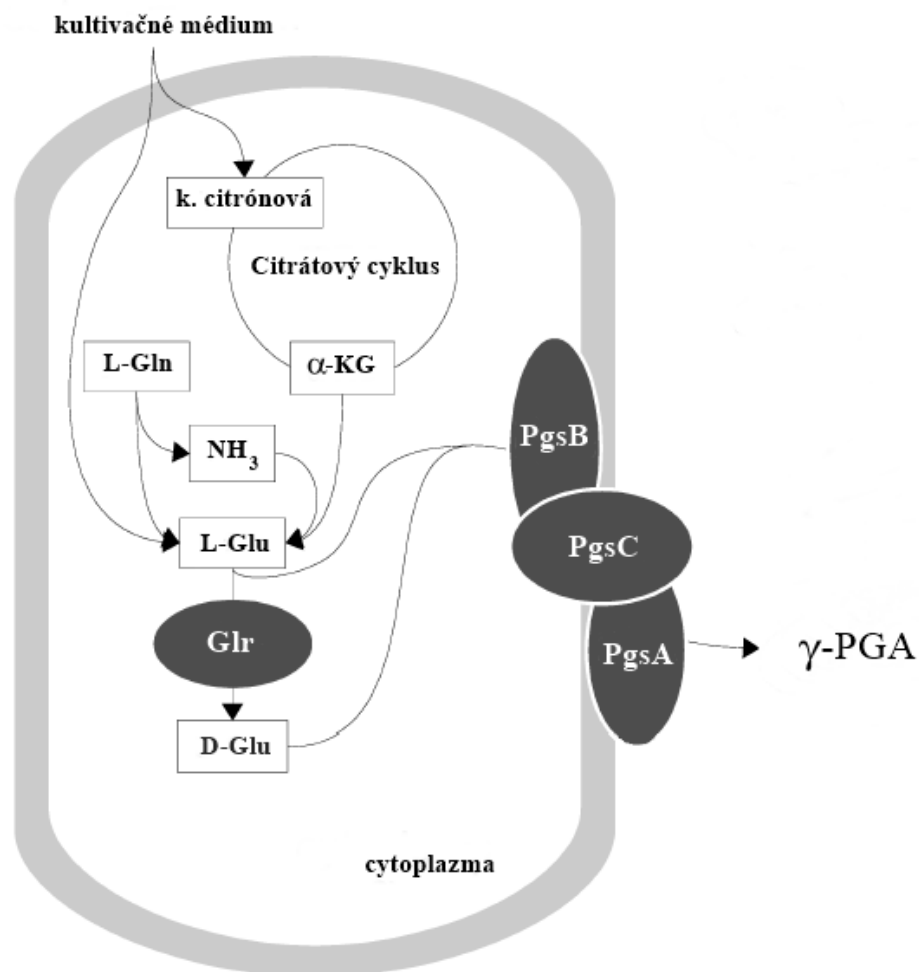
racemázy – *racE* (tiež nazývaný *glr*) a *yrpC*. Ich zapojenie do γ -PGA syntézy je stále nejasné [5].

V prípade *Bacillus anthracis* sú gény kódujúce proteíny zúčastňujúce sa na syntéze γ -PGA na plazmide, na rozdiel od iných druhov rodu *Bacillus*, kde sú gény prítomné na chromozóme. Ak je γ -PGA spojený s bakteriálnym povrchom a tvorí kapsulu, gény sa nazývajú *cap* a ak je nasyntetizovaný γ -PGA uvoľnený, gény majú názov *pgs* (gén polyglutamát syntetázy). Obidva génové súbory *cap* a *pgs* majú najmenej 4 gény: *capB*, *C*, *A* a *E* alebo *pgsB*, *C*, *A* a *E*. Gény *pgsBCA* sú zhodné s génmi *capBCA* *Bacillus anthracis*. Ukázalo sa, že mechanizmus polymerizácie je závislý od ATP. V rovnici (1) je znázornený navrhovaný reakčný mechanizmus membránového komplexu γ -DL-PGA syntetázy u *Bacillus subtilis*. Najskôr je fosforylová skupina ATP prenesená na koncovú karboxylovú skupinu rastúcej γ -PGA pomocou substrát-dependentnej ATP hydrolýzy. V dôsledku nukleofilného ataku aminoskupiny kyseliny glutámovej na fosforylovanú karboxylovú skupinu vzniká amidová väzba [2; 5; 4; 1; 14].



Táto reakcia pokračuje v polymerizácii γ -PGA na aktívnom mieste syntetázového komplexu (PgsBCA). PgsB a PgsC spolu tvoria hlavnú časť katalytického miesta, zatiaľ čo PgsA odstraňuje predĺžený reťazec z aktívneho miesta, čo je potrebné na pridanie ďalšieho monoméru a transport γ -PGA cez kompaktnú bunkovú membránu. Bolo zistené, že *pgsE* pri produkcii γ -PGA nehrá úlohu a pri vysokých koncentráciách *pgsA*, *pgsB* a *pgsC* je komplex PgsBCA vytvorený aj v neprítomnosti génu *pgsE*. Ďalší výskum ukázal, že *pgsE* je nevyhnutný pre produkciu γ -PGA v neprítomnosti Zn^{2+} [2; 5; 4; 1].

Pri analýzach substrát-dependentnej ATP hydrolýzy na ligáciu amidov sa predpokladá, že ligázy vykazujú prísnu stereošpecifitu pre aminokyselinové substráty. γ -PGA syntetázový komplex je pravdepodobne konformačne jedinečný a atypický enzým z rodiny ligáz, pretože obidva enantioméry glutamátu považuje za substrát [14].



Obrázok 2: Navrhovaná dráha syntézy γ -PGA u druhov *Bacillus* [1]

2.4 Funkcia γ -PGA v organizmoch

γ -PGA má rôzne biologické funkcie líšiac sa podľa druhov organizmov, ktoré ho syntetizujú a ich prostredia. Pôdne baktérie (väčšinou z rodu *Bacillus*) používajú γ -PGA na sekvestráciu toxických kovových iónov, čím sa zvyšuje ich odolnosť voči nepriaznivým podmienkam. γ -PGA môže slúžiť ako zdroj glutamátu pre baktérie v štádiu hladovania počas neskoršej stacionárnej fázy. *Planococcus halophilus*, *Sporosarcina halophila* a *Natrialba asiatica* (jediné zistené γ -PGA produkujúce archea) používajú γ -PGA na zníženie vysokých miestnych koncentrácií solí, čo im umožňuje prežiť v nepriateľskom prostredí. γ -PGA pomáha pri tvorbe biofilmu, vstrebávaní základných živín z prostredia u *Bacillus subtilis*. Bolo preukázané, že bez tvorby γ -PGA nie je druh schopný produkovať biofilm alebo tvorba biofilmu je veľmi nízka [5; 6; 3; 4; 15].

Dve vysoko patogénne baktérie *Bacillus anthracis* a *Staphylococcus epidermidis*, syntetizujú povrchovo-asociovanú γ -PGA, ktorá im umožňuje uniknúť fagocytóze a pôsobiť ako bakteriálny faktor virulencie. Okrem toho sa kapsula *Bacillus anthracis* skladá výlučne z D-enantioméru, čo ju robí obzvlášť neimunogénnou [5; 6; 3].

Pŕhlivce sú jedinými eukaryotickými organizmami, o ktorých je známe, že produkujú γ -PGA. Na ramenách majú špeciálne organely, nematocysty (pichľavé bunky), ktoré im pomáhajú pri premiestňovaní a na zachytávanie korisťe. Dokonca ich používajú na obranu mechanizmom explózie, kedy produkujú veľké množstvo γ -PGA, ktorá spúšťa explóziu vytvorením osmotického tlaku [3].

Prítomnosť γ -PGA bola preukázaná aj v neurónoch u myší, kde pravdepodobne zohráva úlohu pri regulácii dynamiky mikrotubulov modifikáciou interakcie tubulínu s tubulín-asociovanými proteínmi a Ca^{2+} [2].

2.5 Vlastnosti γ -PGA

2.5.1 Štruktúrna charakteristika, fyzikálne a chemické vlastnosti

Kyselina glutámová, stavebný monomér γ -PGA, má tri chemicky aktívne funkčné skupiny a ich chemická reaktivita nasleduje v tomto poradí: $\alpha\text{-NH}_2 > \alpha\text{-COOH} > \gamma\text{-COOH}$. Vo fermentačnom procese je väčšina kyseliny L-glutámovej enzymaticky racemizovaná na kyselinu D-glutámovú a obe kyseliny D- a L-glutámové sú kopolymerizované tvorbou γ -peptidových väzieb medzi menej reaktívnymi $\gamma\text{-COOH}$ skupinami a $\alpha\text{-NH}_2$ skupinami [16].

Molekulová hmotnosť γ -PGA sa pohybuje od 100 kDa do 2500 kDa. Konečná molekulová hmotnosť γ -PGA je závislá na mnohých faktoroch, ako napríklad pH kultivačného média, jeho prevzdušnenie, miešanie, iónová sila. Zvýšenie doby fermentácie zníži molekulovú hmotnosť γ -PGA z dôvodu produkcie špecifických depolymeráz samotným organizmom, ktoré katalyzujú rozpad polyméru [3; 17; 18].

Zloženie kultivačného média ovplyvňuje kryštalinitu, farbu γ -PGA a má vplyv na to, či sa vytvorí soľ alebo voľná kyselinová forma γ -PGA. Amorfná forma γ -PGA je ľahko vo vode rozpustná, zatiaľ čo kryštalická forma je relatívne nerozpustná vo vode. Po izolácii z kultivačného média je získaný biely alebo nahnedlý prášok (ak sú v médiu prítomné železité ióny) [19].

Voľná kyselinová forma γ -PGA je nerozpustná vo vode, rozpustná je iba v organickom rozpúšťadle DMSO. Soli tohto polyméru s rôznymi kationmi (K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+}) sú úplne rozpustné vo vode a sú bez chuti [2; 3; 16].

Ako už bolo spomínané, γ -PGA môže obsahovať len D-glutamát, L-glutamát alebo oba enantioméry. γ -PGA obsahujúci len L alebo D enantioméry je rozpustný v etanole. Ak γ -PGA obsahuje ekvimolárne množstvá enantiomérov L a D, v etanole precipituje [4; 15].

γ -PGA sa viaže s iónmi kovov, ako napríklad Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , prostredníctvom chelácie. Nasledujú konformačné zmeny z náhodného zvinutia (*angl.* random coil) do obalených agregátov a následne dôjde k vyzrážaniu. Na selektívne vyzrážanie γ -PGA vytvorením komplexu je Cu^{2+} najefektívnejším kovovým iónom, dokonca aj pri jeho nízkej koncentrácii. [16; 20].

Tepelná stabilita γ -PGA je do 210 °C, kde sa topí a rozkladá súčasne. Navrhnutý mechanizmus tepelnej degradácie γ -PGA je depolymerizácia na kyselinu pyroglutámovú, laktam kyseliny glutámovej [21].

V Tabuľka 1 možno vidieť rozdielnosť bodov topenia a teplôt rozkladu protonovanej γ -PGA-H a ionizovanej formy γ -PGA⁻. Veľké množstvo hydratovanej vody odráža silnú väzbovú schopnosť vody a hygroskopickú povahu solí γ -PGA [16].

Tabuľka 1: Tepelná analýza γ -PGA a minerálnych solí γ -PGA [16]

	H	Na ⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Hydratovaná voda [%]	0	10	42		20	40
Teplota dehydratácie [°C]	0	109	139		110	122
Bod topenia, T _m , [°C]	206	160	193,2	219		160
Teplota rozkladu, T _d , [°C]	209,8	340	341	223	335,7	331,8

2.5.2 Konformačné a molekulárne interakcie γ -PGA

γ -PGA môže zaujať týchto 5 konformácií: α -helix, β -skladaný list, prechod z helix do random coil, random coil a spojený agregát. Konformácie sú flexibilné a môžu sa meniť so zmenou podmienok prostredia, ako je pH, koncentrácia polyméru a iónová sila. γ -PGA je polyelektrolyt, takže buď protonovaná alebo ionizovaná forma je prítomná v závislosti od pH média a preto aj jeho konformácia je závislá od pH. V γ -PGA-H existujú 4 silné intramolekulárne vodíkové väzby medzi karbonylovou skupinou γ -peptidovej väzby a aminoskupinou druhej γ -peptidovej väzby. Tieto silné vodíkové väzby tvoria kompaktnú ľavotočivú α -helikálnu konformáciu, čo vedie k silne hydrofóbnému charakteru a stáva sa nerozpustná vo vode pri pH 2,0. Zvýšením pH a teda aj ionizačným stupňom je podporovaný prechod z α -helixu na β -skladaný list, vodíkové spojenie sa rozpadá. Akonáhle sa γ -PGA stáva úplne ionizovaný (približne od pH 6 a vyššie), polymér prijme usporiadanie random coil, kde elektrostatické odpudzovacie sily medzi negatívne nabitými bočnými skupinami glutamátu uprednostňujú menej kompaktný stav s vyššou konformačnou entropiou [3; 18; 22; 4; 16].

Bol tiež zistený vplyv pH na viskozitu γ -PGA. Viskozita roztoku γ -PGA je pravdepodobne vysoko príbuzná deprotonovanému stupňu COOH skupín v postranných reťazcoch γ -PGA. A teda, so zvyšujúcim sa pH (približne až do pH 8) sa zvyšuje viskozita roztoku γ -PGA s ionizáciou kyselinovej formy na ionizovanú [23; 16].

Pri aplikácii osmotického tlaku dochádza k osmoticky indukovanému prechodu z random coil do α -helikálneho stavu v dôsledku zníženia aktivity vody v roztoku. Vzhľadom k tomu, že konformácia random coil závisí od stability hydratácie, γ -PGA prijme entropicky nižší α -helikálny stav na získanie energie interakcií intramolekulárneho vodíkového viazania, a tým vyžaduje menej vody pre stabilitu [22].

V zriedených roztokoch sú molekuly γ -PGA od seba izolované a správajú sa nezávisle, reťazce polymérov interagujú primárne s molekulami rozpúšťadla. Naopak pri vyšších koncentráciách sa polymérne reťazce prekrývajú a stávajú sa zapletené, preto sú intermolekulárne interakcie značne zvýšené v porovnaní s reťazcami v zriedených roztokoch [23].

Pri štúdiu morfológie s použitím mikroskopie atomárných síl bolo pozorované, že tvar γ -PGA-H je tyčinkovitý a u γ -PGA-Na guľovitý. Štruktúra γ -PGA-Na zaujíma random coil konformáciu, na rozdiel od konformácie α -helix γ -PGA-H. Negatívne nabité karboxylové skupiny majú silnú elektrostatickú odpudivosť, ktorá je rezistentná voči intramolekulárnej interakcii vodíkových väzieb [23].

2.5.3 Rozdiely γ -PGA oproti proteínom

Na rozdiel od väčšiny proteínových materiálov sa γ -PGA syntetizuje spôsobom nezávislým od ribozómu. Látky, ktoré inhibujú transláciu proteínov (ako je chloramfenikol), nemajú žiaden vplyv na produkciu γ -PGA. Kvôli γ -spojeným jednotkám glutámových zvyškov je γ -PGA rezistentný voči proteázam, ktoré štiepia α -amino väzby. Peptidová väzba v γ -PGA môže byť hydrolyzovaná iba endo- a exo- γ -glutamylpeptidázou, ktorá je v prírode zriedkavá a preto má γ -PGA určitú odolnosť proti mikrobiálnemu ataku. γ -PGA sa tiež odlišuje od proteínov tým, že môže byť zafarbený farbivami, ako je Metylénová modrá, ale nie Coomassie blue [4; 3; 16; 1].

2.6 Aplikácie γ -PGA

γ -PGA je biologicky odbúrateľný, multifunkčný, kompatibilný, netoxický pre ľudí a dokonca jedlý polymér. Navyše niekoľko štúdií ukázalo, že γ -PGA je sám o sebe slabý imunogén a nevyvoláva imunitné odpovede, pravdepodobne kvôli svojej jednoduchej homopolymérnej štruktúre, podobnej štruktúre polysacharidov. Pre tieto vlastnosti boli v minulých rokoch študované potenciálne aplikácie γ -PGA a jeho derivátov z priemyselného hľadiska. γ -PGA má obrovský potenciál ako nový makromolekulárny materiál, avšak je ešte potrebné vyriešiť problém jeho výrobných nákladov. Odhadnuté náklady sú desaťnásobne až stonásobne vyššie ako u konvenčných materiálov [14; 24].

Aplikácia tohto polyméru sa mení v závislosti od jeho molekulovej hmotnosti. γ -PGA s rozmanitou molekulovou hmotnosťou sa môže použiť na rôzne účely v oblasti bioinžinierstva, na tvorbu scaffoldov a hydrogélův. Systémy na ciele dodávanie liečiv vyžadujú nižšiu molekulovú hmotnosť, pretože molekuly väčšie ako 30 kDa sa ťažšie rozptyľujú kapilármi a glomerulárnym endoteliom. Vyššia molekulová hmotnosť γ -PGA obmedzuje priemyselnú aplikáciu kvôli vysokej viskozite, nekontrolovateľnej reológii a obtiažnym modifikáciám. Na jej zníženie sa využívajú metódy ako ultrazvuková degradácia, alkalická hydrolýza, mikrobiálna a enzymatická degradácia [18; 5; 25].

Odlišné aplikácie má tiež γ -PGA s rôznym stereochemickým zložením. Na kozmetické účely sa využíva γ -PGA s vysokým obsahom L-glutamátu, vďaka svojej kompatibilite s pokožkou. Pre potreby pomalšej degradácie polyméru sa používa γ -PGA s vysokým obsahom D-glutamátu [13].

2.6.1 Farmaceutické a lekárske aplikácie

α -karboxylové bočné reťazce γ -PGA môžu byť chemicky modifikované na zavádzanie rôznych liekov alebo na moduláciu amfifility polyméru. Tieto vlastnosti sú veľmi užitočné pre farmaceutické a biomedicínske aplikácie. Konjugáty γ -PGA-liečivo, nanočastice a hydrogély vyrobené z γ -PGA alebo jeho derivátov majú širokú škálu aplikácií ako nosiče liečiv alebo materiály pre tkanivové inžinierstvo [24].

2.6.1.1 Konjugáty γ -PGA-liečivo

Molekulárna hmotnosť γ -PGA je rozhodujúcim faktorom pri určovaní vlastností pre systémy na dodávanie liekov vrátane riadenia rýchlosti uvoľňovania liečiva. Molekuly liečiva sú viazané na γ -PGA prostredníctvom kovalentnej väzby, čím je liečivo rozpustnejšie a ľahšie sa podáva. V prípade dodávky protirakovinového liečiva vstupuje konjugát polymér-liek do nádorových miest a liek sa uvoľňuje v priebehu času ako polymér biodegraduje na kyselinu glutámovú. γ -PGA bol úspešne konjugovaný liečivom paclitaxel (Taxol®). Výrazne sa zlepšila bezpečnosť a účinnosť lieku (v porovnaní so štandardným paclitaxelom) zvýšením farmakokinetického profilu a rozpustnosti vo vode. Okrem toho to tiež zlepšilo selektivitu pre nádor prostredníctvom zvýšenej akumulácie a retencie v nádorovom tkanive. Výsledkom je teda efektívnejšie využitie protirakovinového liečiva a menší vedľajší účinok pre pacienta. Polymér môže byť konjugovaný inými liekmi s voľnou hydroxylovou skupinou ako doxorubicín, daunomycín, kaptomycín. Okrem chemoterapeutických činidiel môžu byť na voľných karboxylových skupinách pripojené antidiabetické liečiva ako phloridzin a pomocou syntetických linkerov protilátky [26; 24; 4].

2.6.1.2 Nanočastice pre systém na dodávanie liekov

Nanoparticulárne systémy na dodávanie liekov majú niekoľko výhod oproti iným systémom. Majú vyššiu intracelulárnu absorpciu spôsobenú ich subcelulárnou veľkosťou. Lieky môžu byť začlenené bez akýchkoľvek chemických reakcií, nanočastice stabilizujú účinnosť liečiva a dochádza k zníženiu podráždenia tkaniva. Samotné liečiva sú chránené pred degradačnými faktormi, ako je svetlo a pH, a sú enkapsulované s vysokou účinnosťou v polymérnej matici alebo v jadre nanočastíc. Obrovský záujem je o polymérne nanočastice pre farmaceutické a biomedicínske aplikácie vyrobené z materiálov, ktoré sú biodegradabilné a biokompatibilné *in vivo*. Nanočastice s obsahom γ -PGA sa používajú ako systémy na dodávanie liekov v rakovinovej terapii, v antimikrobiálnej génovej terapii a dodávanie vakcín alebo adjuvans, ktoré môžu indukovať antigénovo špecifickú humorálnu a bunkovú

imunitu. Úspešne boli pripravené nanočastice chitosan/ γ -PGA elektrostatickou interakciou medzi amino skupinami chitosanu a karboxylovými skupinami γ -PGA. Tento nanokomplex je vhodný na podávanie biologicky aktívnych látok, ako napríklad proteínov a protizápalových liekov. Tiež bol pripravený pH citlivý systém nanočastíc z chitosanu a γ -PGA na orálne podávanie inzulínu [27; 24; 25; 28].

2.6.1.3 Hydrogély pre tkanivové inžinierstvo

Pre tkanivové inžinierstvo sú dôležité tri kľúčové činitele: bunky, rastové faktory a scaffoldy. Polymérny scaffold je významný nielen pre udržanie priestoru a tuhosti pre bunkový rast, diferenciáciu a organizáciu, ale tiež pri zásobovaní živinami. Aplikácie γ -PGA ako scaffoldu priťahujú pozornosť v oblasti tkanivového inžinierstva. Gélový scaffold vytvorený z homogénnej zmesi chitosanu a γ -PGA vykazuje vyššiu mechanickú pevnosť, hydrofilnosť a cytocompatibilitu ako samotný chitosan. Táto kompozitná matrica je vhodná na pripojenie buniek a proliferáciu. Inkorporácia rastových faktorov do scaffoldov sa používa na liečenie a regeneráciu tkanív a orgánov. Sulfonovaný γ -PGA (γ -PGA-S) napodobňuje heparín a tak môže byť použitý ako antikoagulant. γ -PGA pri 72% sulfonácii postranných karboxylových skupín môže nahradiť heparín v bunkovej kultúre cicavcov. γ -PGA-S hydrogély s aktivitou FGF-2 (základný rastový faktor fibroblastov) sú platformou pre stabilnú inkorporáciu FGF-2. Použitím kombinácie zosieťovanej γ -PGA a zabudovaného polymérneho reťazca γ -PGA-S72 je vytvorená polopriepustná polymérna sieť podobná heterogélu na udržanie mobility a aktivity FGF-2. Tieto γ -PGA-S scaffoldy môžu byť v tkanivovom inžinierstve využité pri neovaskulárnom liečení ischemie a zápalu [24; 1; 6].

2.6.1.4 Biologické lepidlo

γ -PGA môže byť využitý ako biologické lepidlo na mäkké tkanivá. Gelácia systému γ -PGA/želatína bola zosilnená zosieťovacím činidlom 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-(etylkarbodiimid) hydrochlorid (EDC). Zmiešané lepidlá zosieťované EDC nevykazovali žiadnu cytotoxicitu voči fibroblastom, nebola pozorovaná žiadna významná zápalová reakcia pri subkutánnej implantácii potkanom. Bioadhezíva na báze γ -PGA/želatína zostali na mieste počas 7 dní, zatiaľ čo fibrínové lepidlo bolo takmer úplne degradované [29].

2.6.2 Kozmetické aplikácie

γ -PGA je homogénne miešateľná a chemicky stabilná v matrici zložiek, ktoré sa typicky používajú v krémoch na tvár. Má schopnosť vytvárať na koži hladký, pružný a samozvlhčujúci film, ktorý zlepšuje sensorické vnímanie a poskytuje ochranu vonkajšej vrstvy kože. Okrem exfoliácie tiež efektívne zvyšuje schopnosť zadržania vlhkosti. Účinok retencie vlhkosti γ -PGA je dva až trikrát vyšší ako u kyseliny hyalurónovej. Je vynikajúcim hydrofilným zvlhčovadlom a zvyšuje produkciu prírodných zvlhčujúcich faktorov, ako je kyselina pyrrolidónkarboxylová, kyselina mliečna a kyselina urokánová. γ -PGA má tiež

potenciál ako prirodzená náhrada kolagénu alebo kyseliny hyalurónovej, a tak môže pôsobiť ako látka proti starnutiu [30; 31].

Použitie γ -PGA ako aktívnej zložky inhibítora hyaluronidázy je účinné pri udržiavaní zvlhčovania pokožky a elasticity. Hyaluronidáza je enzým, ktorý degraduje kyselinu hyalurónovú prítomnú v kožnej dermis. Toto zloženie môže tiež zmiernovať alergické symptómy tým, že inhibuje priepustnosť zápalových buniek [32].

V prípravkoch na starostlivosť o pokožku môže byť využitý komplex γ -PGA-vitamín, ktorý má za následok zvýšenie stability, podporu absorpcie a zlepšenie trvalého uvoľňovania vitamínov, ako aj hygroskopicitu, zvlhčovacie vlastnosti a kompatibilitu s pokožkou. Komplex γ -PGA-vitamín C má inhibičný účinok na kolagenázu, enzým, ktorý degraduje kolagén prítomný v koži a znižuje pružnosť kože a tvorbu vrások [33; 34].

Okrem starostlivosti o pokožku výskum preukázal schopnosť γ -PGA udržať pevnosť vlasov pri procese bielenia zvyšovaním prirodzenej schopnosti zadržania vlhkosti, a tiež vytvorením ochranej vrstvy na vlasoch [30].

2.6.3 Potravinársky priemysel

Keďže γ -PGA je jedným z hlavných zložiek *natto*, tradičného japonského jedla pripraveného zo sójových bôbov fermentovaných *Bacillus subtilis*, môže byť využitý aj pre potravinárske aplikácie. Predpokladaný denný príjem γ -PGA v Japonsku je približne 16 mg/deň. γ -PGA je bez chuti a všeobecne považovaný za bezpečnú látku (GRAS), biodegradovateľnú a jedlú a menej náchylnú na intestinálne tráviace enzýmy [34; 35; 36].

2.6.3.1 Doplnok stravy

γ -PGA je považovaný za kandidáta pre funkčné potraviny zamerané na podporu zdravia kostí. Štúdie naznačujú, že spotreba *natto* sa spája so zníženou stratou kostnej hmoty v postmenopauze japonských žien. Predpokladá sa, že spôsob účinku γ -PGA je zvyšovanie rozpustnosti vápnika v lumenoch čreva, a tým sa zvyšuje paracelulárna absorpcia vápnika v tenkom čreve. Okrem toho prídavok γ -PGA alebo jeho solí do jedla obsahujúceho biologicky aktívne látky ako vitamíny, polyfenoly, karotenoidy a zvyšuje príjem týchto látok v tenkom čreve. Vitamín K₂, rozpustný v tukoch a dôležitý kofaktor pri tvorbe kostí, bol solubilizovaný proteínom pozostávajúcim hlavne z kyseliny glutámovej. Tieto zistenia naznačujú, že prirodzene sa vyskytujúci γ -PGA a funkčná výživa doplnená o γ -PGA môžu prispieť k prevencii osteoporózy, zníženiu straty vápnika, udržiavaniu pevnosti kostí, zlepšeniu rastu a zdravého stavu kostí [35; 37; 38].

Schopnosť γ -PGA rozpustiť vápnik možno nájsť uplatnenie v rozpúšťaní fyziologických kameňov [16].

Krmna zmes obsahujúca γ -PGA podávaná dobytku, hydine alebo domácim zvieratám okrem zvyšovania absorpcie minerálov v črevnom trakte a bráneniu tvorby slabých

a deformovaných končatín, zvyšuje pevnosť škrupín vajec u sliepok. Očakáva sa tiež znižovanie telesného tuku a zlepšenie naberania hmotnosti u kurčiat [16; 39].

2.6.3.2 Kryoprotektant

Zmrazovacie skladovanie je všeobecne užitočné, účinné a je to sľubná metóda na zachovanie mnohých biologicky aktívnych a dôležitých materiálov. Táto metóda je použiteľná na zachovanie potravín, mikroorganizmov, biologických prípravkov a liekov. Zmrazovanie a rozmrazovanie často spôsobuje poškodenie bunkovej štruktúry a denaturáciu proteínov. Na chránenie mrazeného jedla pred poškodením alebo na stabilizáciu kryo-konzervovaných materiálov je používané pridávanie kryoprotektantov. Pri kryoprotekcii dochádza k poklesu ľadovej frakcie zmrazeného materiálu. Soli γ -PGA sú účinné kryoprotektanty. Mechanizmus, ktorým je ich aktivita možné vysvetliť, zatiaľ nie je určený, avšak protimrznúca aktivita sa zdá byť spôsobená najmä Coulombovou silou disociujúcich protiónov a ich rozbíjajúcim účinkom na sieťovú štruktúru vody viazanú vodíkom. Majú slabšiu chuť ako bežne využívané kryoprotektanty (sacharidy, anorganické soli a aminokyseliny) a môžu byť pridané do potravín vo väčších množstvách bez vážnej zmeny chuti. γ -PGA v rozmedzí molekulovej hmotnosti pod 20 kDa má dokonca vyššiu protimrznúcu aktivitu ako glukóza [40; 41].

2.6.3.3 Vplyv na viabilitu probiotických baktérií

Probiotické organizmy sú živé organizmy poskytujúce zdravie hostiteľovi, keď sa podávajú v primeranom množstve. Existuje mnoho zdravotných a nutričných výhod probiotických organizmov, vrátane podpory zdravého tráviaceho systému, prevencie infekcie močových ciest, prevencie rakoviny a podpory imunitnej odpovede. γ -PGA môže poskytnúť ochranný účinok pre probiotické baktérie vo veľmi kyslom prostredí v žalúdku a pri vysokej koncentrácii žlče v tenkom čreve, kde dochádza k značnej strate životaschopnosti. Ochrana v kyslom prostredí je pravdepodobne spôsobená stabilnou kompaktnou konformáciou α -helix, ktorú γ -PGA nadobúda pri pH 2 (viď kapitola 2.5.2). Keď γ -PGA dosiahne črevo (pH 6-6,5), dochádza k narušeniu vodíkových väzieb, čo vedie k uvoľneniu baktérie do cieľového miesta [42; 19; 43].

Výskum ďalej naznačuje, že γ -PGA môže byť použitý na zlepšenie probiotického prežitia počas rôznych štádií prípravy, skladovania a používania probiotických buniek [42].

2.6.3.4 Redukcia absorpcie oleja pri vyprážíaní

γ -PGA má veľký potenciál na použitie ako zdravé funkčné činidlo na redukovanie oleja vo vyprážíaných výrobkoch. Absorpcia množstva oleja do šišky bola 5krát znížená, keď sa koncentrácia γ -PGA v ceste na šišky zvýšila z 0,25 na 1 g/100 g cesta. Fritovanie je komplexný proces dehydratácie a výsledky teda môžu byť vysvetlené vynikajúcou retenciou

vody γ -PGA a tým, že reguluje odparovanie vlhkosti. Tiež sa zlepšili senzorické kvality šišiek – vzhľad a chuť pri γ -PGA 1 g/100 g cesta [44].

2.6.3.5 Modifikátor vnímania chuti

Bolo tiež zistené, že γ -PGA má funkciu modifikácie vnímania chuti a teda, maskovanie chuti alebo naopak jej zvýraznenie. Má účinok na maskovanie horkej chuti chloridu draselného, aminokyselín, peptidov, minerálov, vitamínov a kofeínu. Zlepšuje korenistosť, zabraňuje zhoršeniu chuti a udržuje vyváženú chuť v jedlách a nápojoch, ako je kari, omáčka na grilovanie, kola alebo zázvorové pivo [34].

2.6.3.6 Zahusťovadlo, zosilňovač textúry a iné funkcie

V patentoch sú uvedené aj niektoré ďalšie aplikácie γ -PGA v potravinárskom priemysle. γ -PGA sa používa ako zahusťovadlo v potravinách/nápojoch na zvýšenie viskozity a zlepšenie pitnej schopnosti. Pridanie γ -PGA vo výrobe škrobových potravín, ako sú pekárenské výrobky a rezance, zabraňuje starnutiu, zlepšuje textúru a udržiava tvar výrobku. Textúru zlepšuje aj jeho použitie v cereáliách. Existuje niekoľko správ o použití γ -PGA ako stabilizátora zmrzliny alebo penového stabilizátora vaječného bielka. γ -PGA zabraňuje zrážaniu polyfenolov a preto sa používa v nápojoch, ktoré ich obsahujú. Používa sa tiež v kyslom mliečnom nápoji, pretože zlepšuje dispergovateľnosť proteínov a teda zabraňuje ich zrážaniu. Oxidačná stabilita emulgovaných potravín typu olej vo vode, ako napríklad majonéza a dressingy, je zlepšená pridaním γ -PGA [34; 5].

2.6.4 Životné prostredie

2.6.4.1 Adsorpcia ťažkých kovov a rádionuklidov

Remediácia kontaminovaných pôd, sedimentov a vody je obrovská výzva, ktorej ľudia v súčasnosti čelia. Zvyšuje sa záujem o výskum využitia biochemických procesov na redukcii environmentálnych rizík spojených s ťažkými kovmi a rádionuklidmi. Niekoľko štúdií skúmalo viazanie kovov a rádionuklidov pomocou biopolymérov produkovaných mikroorganizmami. γ -PGA z *Bacillus licheniformis* viaže rôzne ióny kovov ako Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} a Cr^{3+} , dokonca viaže U^{4+} [37].

2.6.4.2 Flokulančná aktivita

Flokulácia je bežnou a účinnou metódou na odstraňovanie suspendovaných pevných látok, iónov kovov v odpadových vodách. Môže byť alternatívnou metódou centrifugácie a filtrácie na zber mikrobiálnych buniek z kultivačného média v potravinových a fermentačných priemysloch [45].

Organické syntetické flokulanty sú široko používané kvôli ich nižším nákladom a vyššej efektívnosti, avšak ich nevýhodou je, že sú menej biodegradovateľné a produkujú karcinogénne

monoméry (napr. akrylamid), čím zvyšujú environmentálne a zdravotné problémy. Preto vývoj bezpečných a biologicky odbúrateľných flokulantov je naliehavou priemyselnou potrebou. Bioflokulanty sú biopolyméry sekretované mikroorganizmami s vysokou molekulovou hmotnosťou ako proteíny, glykoproteíny a polysacharidy [45; 46].

Medzi týmito bioflokulantami je γ -PGA považovaný za najlepší kvôli vysokej flokulačnej aktivite a schopnosti flokulovať širokú škálu organických (celulóza, kvasinky) a anorganických (aktívne uhlie, kyslý íl, pôda, zlúčeniny vápnika a horčíka) suspenzií. V kaolíkových suspenziách je flokulačná aktivita flokulantu stimulovaná prídavkom katiónov, ako napríklad Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} k suspenzii. Flokulačná aktivita však klesá, keď sú katióny používané nad ich optimálne koncentrácie. Jednomocné katióny ako K^+ tiež zvyšujú flokulačnú aktivitu, ale ich účinok je oveľa menší v porovnaní s dvojmocnými katiónmi. Náboj medzi bioflokulantami zvyšuje hustotu a veľkosť vločiek. Ca^{2+} , Mg^{2+} destabilizujú negatívne nabité častice kaolínu neutralizáciou a premostovaním a podporujú vločkovanie [45; 7].

2.6.4.3 Adsorbent kationových farbív

Farebná voda vypúšťaná z farbiacich procesov priamo do odpadových vôd, okrem toho, že nie je esteticky príjemná, môže mať aj deštruktívny vplyv na životné prostredie. Je preto nevyhnutné odstrániť rozpustené farbivá pred vypustením odpadu do akýchkoľvek vodných tokov. γ -PGA je vhodný adsorbent na odstránenie farbív ako Malachitová zeleň a Metylénová modrá z vodných roztokov. Tento spôsob adsorpcie by mohol ponúknuť zelené riešenie pre globálny priemysel v aplikácii farbív. Náklady môžu byť podstatne znížené efektívnou recykláciou γ -PGA. Približne 98 % farbiva adsorbovaného na γ -PGA sa môže získať pri pH 1, čo uľahčuje opätovné použitie polyméru [47].

2.6.4.4 Bioremediácia, hnojivo

Intenzívny chov zvierat produkuje veľké množstvo hnoja a jeho rozsiahle rozširovanie na poľnohospodárskych poliach v konečnom dôsledku vedie k eutrofizácii pôdy a povrchových vôd, ako aj k znečisteniu atmosféry kvôli vysokému obsahu amónneho dusíka v tomto odpade. Navyše v závislosti od typu pôdy a mikroflóry, amónne ióny sú čiastočne oxidované na dusičnany. Premena amónneho katiónu na biomasu a γ -PGA poskytne prechodné zásoby amónneho katiónu a tiež ďalších živín vyskytujúcich sa v odpade a poslúžia ako hnojivo. Pomalá degradácia γ -PGA má za následok nízke koncentrácie voľného amoniaku ako živín pre rastliny. Kvôli polyaniónovému charakteru sa na polymér viažu dvojmocné katióny (Ca^{2+} , Mg^{2+}) a týmto spôsobom sú zrejme koncentrované a účinnejšie prenesené do rhizosféry rastlín. Výskumníci uviedli, že *Bacillus licheniformis* bol schopný rásť v kvapalnom hnoji ošípaných v prítomnosti glukonátu sodného alebo citrátu a glycerolu. Ich experimenty ukázali, že obsah amoniaku bol výrazne znížený a výsledkom bola výroba 0,16-0,85 g/l γ -PGA [48; 49].

2.6.5 Ostatné aplikácie γ -PGA

2.6.5.1 Superabsorpčný polymér

Poľnohospodárske aplikácie γ -PGA zahŕňajú prípravu superabsorpčného polyméru. V posledných rokoch sú kvôli zlej biodegradabilite tradičnej absorpčnej akrylovej živice vyvíjané nové biologicky rozložiteľné absorpčné živice. Po ožarovaní sa molekulárna štruktúra γ -PGA zmení a zvýši sa tiež absorpcia vlhkosti, 1 gram γ -PGA môže absorbovať viac ako 1 kg vody [50].

2.6.5.2 Biodegradabilný plast

γ -PGA je sľubný ako nový nylonový (polyamidový) plast, hoci nie je termoplastický pod vlhkosťou okolia. V súčasnosti existujúce pokusy na jeho použitie v priemysle na výrobu vo vode nerozpustných materiálov, ako sú plasty, vlákna a filmy, boli zatiaľ z veľkej časti neúspešné. A to z dôvodu jeho hygroskopickkej povahy a skutočnosti, že výskyt mnohonásobných karboxylových zvyškov v γ -PGA spôsobuje ťažkosti plastifikácie. Je preto nevyhnutné navrhnúť spôsob, ktorý je účinný pri transformácii štruktúry a funkcie karboxylovej skupiny γ -PGA tak, aby sa mohol premeniť na bio-nylonový materiál nerozpustný vo vode [51].

2.6.5.3 Pokročilá biochémia

γ -PGA má potenciálne aplikácie aj v pokročilej biochémii. Enzýmy potiahnuté γ -PGA môžu byť užitočné aj za extrémnych podmienok, ako vysoké koncentrácie solí, suché prostredie, extrémne nízke teploty a vysoké pH, kedy sú enzýmy zvyčajne inaktivované. V budúcnosti môže byť γ -PGA použitý na spracovanie podmienenene labilných makromolekúl vrátane DNA a polysacharidov [51].

Tabuľka 2: Súhrn potenciálnych aplikácií γ -PGA a jeho derivátov

Oblasť	Aplikácia γ -PGA	Funkcia	Zdroj
Farmácia a lekárstvo	Nosič liečiv	dodávky chemoterapeutík, antidiabetík, vaccín	[24]
	Tkanivové inžinierstvo	lepšie mechanické vlastnosti, hydrofilnosť a cytokompatibilita ako samotný chitosan	[1]
	Biologické lepidlo	náhrada fibrínového lepidla	[29]
Kozmetika	Zvlhčovadlo	zvlhčovanie, exfoliácia a znižovanie tvorby vrások v prípravkoch na starostlivosť o pleť	[30; 31]
Potravinársky priemysel	Doplnok stravy	zvýšená absorpcia Ca^{2+} v tenkom čreve, prevencia osteoporózy, zvýšenie pevnosť škrupín vajec, zníženie telesného tuku u hospodárskych zvierat	[38; 39]
	Kryoprotektant	γ -PGA pod 20 kDa má vyššiu nemrznúcu aktivitu ako glukóza, jeho prídavok je bez zmeny chuti potravín	[40; 41]
	Vplyv na viabilitu probiotických baktérií	zlepšenie probiotického prežitia počas rôznych štádií prípravy, skladovania a používania	[42]
	Činidlo na redukciu absorpcie oleja	γ -PGA ako zdravé funkčné činidlo na redukovanie oleja vo vyprázaných výrobkoch	[44]
	Modifikátor vnímania chuti	maskovanie horkej chuti KCl, aminokyselín, peptidov, minerálov, vitamínov a kofeínu; zvýrazňuje korenistosť	[34]
	Zahusťovadlo	zvýšenie viskozity v potravinách a nápojoch	[34]
Životné prostredie	Adsorbent ťažkých kovov a rádionuklidov	viazanie rôznych iónov kovov ako Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} a Cr^{3+} ; U^{4+}	[37]
	Flokulant	schopnosť flokulovať širokú škálu organických a anorganických suspenzií	[45]
	Adsorbent farbív	odstránenie farbív ako Malachitová zeleň a Metylénová modrá z vodných roztokov	[47]
	Bioremediácia	schopnosť <i>Bacillus licheniformis</i> rásť v kvapalnom hnoji ošipovaných, premena NH_4^+ z odpadu na biomasu a γ -PGA, ktoré slúžia ako hnojivo	[49]
Ďalšie aplikácie	Superabsorbent	náhrada tradičnej absorpčnej akrylovej živice	[50]
	Biodegradabilný plast	sľubný nylonový (polyamidový) plast	[51]
	Pokročilá biochémia	spracovanie podmienene labilných makromolekúl vrátane DNA a polysacharidov	[51]

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Polymér kyseliny glutámovej

Na celú experimentálnu činnosť bola využívaná γ izoforma polyméru kyseliny glutámovej. Polymér bol zakúpený od spoločnosti Carbosynth Ltd. (Spojené kráľovstvo).

3.1.2 Ostatné chemikálie

Glycín (Lach-ner, s.r.o.)

Kyselina chlorovodíková 35–38% (Lach-ner, s.r.o.)

Chlorid sodný (Lach-ner, s.r.o.)

Hydrogénuhličitan sodný (Lach-ner, s.r.o.)

Uhličitan sodný (Lach-ner, s.r.o.)

Hexahdrát chloridu horečnatého (Lach-ner, s.r.o.)

Chlorid vápenatý dihydrát (Lach-ner, s.r.o.)

Chlorid horečnatý hexahdrát (Lach-ner, s.r.o.)

Cetyltrimetylamóniumbromid (Sigma-Aldrich s.r.o.)

Lactobacillus MRS Broth (Himedia)

Yeast Extract (Himedia)

Pepton (Himedia)

Glukóza (Lach-ner, s.r.o.)

BHI Broth (Himedia)

Nutrient Broth (Himedia)

LB Broth (Sigma-Aldrich s.r.o.)

Glycerol (Lach-ner, s.r.o.)

Sacharóza (Lach-ner, s.r.o.)

Chlorid draselný (Lach-ner, s.r.o.)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahdrát (Lach-ner, s.r.o.)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, s.r.o.)

Žlčové soli – zmes kyseliny cholovej a deoxycholovej (Sigma-Aldrich s.r.o.)

Pankreatín z pankreasu ošípaných (Sigma-Aldrich s.r.o.)

Pepsín zo žalúdočnej sliznice ošípaných (Sigma-Aldrich s.r.o.)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Lach-ner, s.r.o.)

Chitosan – stredná molekulová hmotnosť (Sigma-Aldrich s.r.o.)

Alginát sodný (Sigma-Aldrich s.r.o.)

3.2 Použité prístroje

Analytické váhy BAS 31, Boeco (Nemecko)
Magnetické miešadlo, IKA (Nemecko)
Magnetické miešadlo s vyhrievaním H3760, Benchmark (USA)
Laboratórne váhy EK-300i, Helago (SR)
Laminárny box Aura mini, Bioair Instruments (UK)
Vortex lab dancer, IKA (Nemecko)
Centrifúga 5417R, Eppendorf (Nemecko)
Termostat INB 300, Memmert (Nemecko)
Temperovaná trepačka ES-20, Biosan (Lotyšsko)
pH meter pH 720 set, InoLab (Česká republika)
Zetasizer Nano ZS s titrátorom MPT-2 Multi Purpose, Malvern Instruments (UK)
Prietokový cytometer Apogee A50, Apogee Flow Systems (UK)
ELISA Reader BioTek ELx808, Biotek (DE)
Enkapsulátor BÜCHI B-392 Pro (CHE)

3.3 Použité mikroorganizmy

Na testovanie antimikrobiálnej aktivity γ -PGA boli použité štyri bakteriálne kultúry: *Micrococcus luteus* CCM 1569, *Serratia marcescens* CCM 8587, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus epidermidis* CCM 4418 získané z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.

Pri štúdiu vplyvu γ -PGA na mikroorganizmy pri stresových podmienkach bol využitý bakteriálny kmeň *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825 z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne a kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* CCY 21-4-102 zo Zbierky kultúr kvasiniek, ktorá je súčasťou Chemického ústavu SAV.

3.3.1 Kultivácia mikroorganizmov

3.3.1.1 *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*

Na prípravu kvapalného média bolo použité komerčné NB médium (Nutrient Broth) o koncentrácii 25 g/l. 50 ml média bolo preliatých do 100 ml Erlenmayerovej banky a sterilizované na 40 minút pri 120 °C v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom. Zaočkované médium bolo inkubované pri teplote 37 °C v temperovanej trepačke pri 130 rpm na 24 hodín.

3.3.1.2 *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*

Tekuté médium pre *E. coli* o objeme 50 ml bolo pripravené z komerčného LB média (Luria-Bertani Broth) na koncentráciu 20 g/l. Na prípravu média pre *S. epidermidis* bolo využité komerčné BHI médium (Brain-Heart Infusion Broth) o koncentrácii 37 g/l. Po 40 minútovej

sterilizácii pri 120 °C v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom a zaočkovaní bolo prevedené do sterilnej veľkej centrifugačnej skúmavky. Kultivácia prebiehala pri 37 °C po dobu 24 hodín.

3.3.1.3 *Lactobacillus rhamnosus*

Na kultiváciu *L. rhamnosus* bolo využívané médium MRS Broth o koncentrácii 55,15 g/l. Príprava inokula prebiehala navážením odpovedajúceho množstva MRS Broth do kadičky a rozpustením v destilovanej vode. Rozmiešané médium bolo prevedené do troch veľkých centrifugačných skúmaviek po 35 ml a sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom pri teplote 120 °C po dobu 40 minút. Po vychladnutí MRS média bolo k nemu v laminárnom boxe pridané 0,5 ml z rozmrazenej kryoskúmavky. Baktérie boli kultivované v temperovanom termostate 24 hodín pri 37 °C. Takto pripravené tekuté uchovávacie médium bolo po 24 hodinách premiestnené do chladničky s teplotou 4°C, kde sa rast baktérií zastaví a zostanú v stacionárnej fáze rastu a je ho možné využívať približne 30 dní.

Z tekutého uchovávacieho média bolo pre experiment pripravené 24 hodinové inokulum pridaním 1 ml do 10 ml sterilného MRS Broth a kultivovaním pri teplote 37 °C.

3.3.1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Na dlhodobé uchovávanie kvasinky *S. cerevisiae* bolo použité YPD médium (Tabuľka 3) s obsahom agaru o koncentrácii 18 g/l. Médium bolo sterilizované 40 minút v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom pri teplote 120 °C a v laminárnom boxe naliate do sterilných skúmaviek a stuhnuté v šikmej polohe. Kultúra bola zaočkovaná na vopred pripravený šikmý agar. Skúmavky boli ponechané v termostate po dobu 48 hodín pri teplote 25 °C a následne prenesené do chladničky a uchovávané pri teplote 4 °C.

Inokulum bolo pripravené očkovaním kvasinky zo šikmého agaru do 50 ml sterilného YPD média v 100 ml Erlenmayerovej banke a ponechaním v temperovanej trepačke pri 130 rpm 48 hodín a teplote 25 °C.

Tabuľka 3: YPD médium

yeast extract	10 g
glukóza	20 g
pepton	20 g
destilovaná voda	1000 ml

3.4 Charakterizácia γ -PGA

3.4.1 FT-IR spektroskopia

Na analýzu chemickej štruktúry γ -PGA bol použitý Nicolet™ iS50 FTIR spektrometer (Thermo Scientific™), konkrétne technika ATR (zoslabený úplný odraz) na jednodrazovom

diamantovom kryštáli. Spektrum bolo merané v rozsahu vlnočtov $4\ 000\text{--}400\ \text{cm}^{-1}$, v rozlíšení $8\ \text{cm}^{-1}$ ako priemer 64 skenov.

3.4.2 Termická analýza

Termogravimetrická analýza bola vykonaná na prístroji TGA Q5000 (TA Instruments). Diferenčná skenovacia kalorimetria γ -PGA bola prevedená na teplotne modulovanom kalorimetri DSC Q2000 (TA Instruments) v troch nasledujúcich cykloch. V prvom cykle bola vzorka zahriata na $150\ ^\circ\text{C}$ a pri tejto teplote udržiavaná po dobu 5 minút. V druhom cykle boli vzorky chladené na teplotu $-80\ ^\circ\text{C}$ a v treťom cykle prebehlo zahrievanie na teplotu $250\ ^\circ\text{C}$. Teplotná rampa bola vo všetkých troch cykloch nastavená na $2\ ^\circ\text{C}/\text{min}$. Vyhodnotené boli údaje získané počas tretieho teplotného cyklu.

3.4.3 Molekulová hmotnosť

Analýza molekulovej hmotnosti bola prevedená metódou SEC-MALS. SEC-MALS systém bol zložený zo SEC chromatograf 1260 Series, UV-VIS detektor od Agilent Technologies Ltd. a MALS detektor DAWN-HELEOS II, diferenčný refraktometer Opti-Lab T-rEX od Wyatt Technology Ltd. Vzorky boli pripravené rozpustením γ -PGA v destilovanej vode na koncentráciu $10\ \text{mg}/\text{ml}$ a prefiltrovaním cez filter s pórmí o veľkosti $0,45\ \mu\text{m}$. Na analýzu bola použitá kolóna PL-aquagel-OH MIXED-H $8\ \mu\text{m}$ a mobilná fáza $0,1\ \text{mol}/\text{l}\ \text{NaNO}_3$. Objem nástreku vzorky do systému bol $50\ \mu\text{l}$ alebo $100\ \mu\text{l}$ a rýchlosť prietoku systémom bola nastavená na hodnotu $0,6\ \text{ml}/\text{min}$. Získané dáta boli vyhodnotené pomocou softvéru Astra 6.1.

3.4.4 Izoelektrický bod

Určenie izoelektrického bodu bolo prevádzané pomocou automatického titrátoru, ktorý je príslušenstvom pre prístroj Zetasizer Nano ZS. Na meranie bolo napipetované $10\ \text{ml}$ roztoku γ -PGA do plastovej skúmavky s magnetickým miešadlom zo zásobného roztoku o koncentrácii $1\ \text{g}/\text{l}$ polyméru v destilovanej vode, miešaného 24 hodín. Táto skúmavka s magnetickým miešadlom bola pripevnená k automatickému titrátoru a následne vložená pH sonda. Neutrálna počiatočná hodnota pH roztoku γ -PGA bola znižovaná až na hodnotu $1,5$ prídavkami titračného činidla, ktorým bola zvolená $1\ \text{mol}/\text{l}\ \text{HCl}$.

Prostredníctvom softvéru bol nastavený typ merania – pH Titration, mód – Size and Zeta Potential a priebeh titrácie. V každom bode pH bol premeraný zeta potenciál (3 série po 15 meraní) a Z-priemer veľkosti molekúl (3 série po 10 meraní). Všetky merania prebiehali pri teplote $25\ ^\circ\text{C}$.

Pomocou kontinuálnej titrácie bol zmeraný zeta potenciál od počiatočnej hodnoty pH približne $6,3$ do 2 s krokom titrácie $0,5$ a od pH 3 do $1,5$ s krokom $0,2$.

Namerané hodnoty zeta potenciálu a veľkosti molekúl z prevedených meraní boli v programe MS Excel spriemerované a boli stanovené ich smerodajné odchýlky, zobrazené ako chybové úsečky.

3.4.5 Rozpustnosť

Do eppendorf skúmaviek boli navážené množstvá γ -PGA tak, aby po pridaní rozpúšťadla bola výsledná koncentrácia polyméru 1, 5, 10, 15, 20, 50 a 75 g/l. Po prídavku rozpúšťadiel boli vzorky premiešavané za pomoci pipety a pozorované rozpúšťanie polyméru.

Ako rozpúšťadlo bola používaná destilovaná voda, etanol, destilovaná voda : etanol o pomeroch 25 : 75, 50 : 50 a 75 : 25. Pri rozpúšťadle etanol bola vzorka s 20 g/l γ -PGA tiež zahrievaná vo vodnom kúpeli pri teplote 50 °C po dobu jednej hodiny. Použité boli aj pufre glycín-HCl s kyslým pH, fyziologický roztok s neutrálnym a uhličitanový pufor so zásaditým pH.

Tabuľka 4: Glycín-HCl pufor, pH 3

glycín	0,75 g
0,5 M HCl	do pH 3
destilovaná voda	doliať na objem 100 ml

Tabuľka 5: Fyziologický roztok, pH 7,4

NaCl	0,9 g
destilovaná voda	100 ml

Tabuľka 6: Uhličitanový pufor, pH 10,95

NaHCO ₃	0,11 g
Na ₂ CO ₃	0,93 g
destilovaná voda	100 ml

3.4.6 Zrážanie γ -PGA iónmi kovov

γ -PGA bol zrážaný vápenatými a horečnatými kationmi. Bol pripravený nasýtený roztok CaCl₂·2H₂O rozpustením 48,85 g tejto zlúčeniny v 50 ml destilovanej vode a nasýtený roztok MgCl₂·6H₂O navážením množstva 83,5 g zlúčeniny a rozpustením v 50 ml destilovanej vode.

Do kadičiek boli pripravené roztoky γ -PGA o koncentráciách 5, 10 a 15 g/l o celkovom objeme 5 ml.

K roztokom polyméru boli prikvapkávané kvapkadlom nasýtené roztoky chloridov a pridávané boli tiež nárazovo v rôznych pomeroch. Vznik zrazenín a samotné zrazeniny boli pozorované.

3.4.7 Zrážanie γ -PGA pomocou CTAB

Meranie prebiehalo na prístroji Zetasizer Nano ZS s automatickým titrátorom. Bol pripravený roztok γ -PGA o koncentrácii 1 g/l. Tento roztok bol miešaný 24 hodín na magnetickom miešadle. Z neho bolo na meranie odpipetované 10 ml do skúmavky a následne bola skúmavka pripevnená na automatický titrátor. Roztok γ -PGA bol titrovaný 10 mmol/l a 20 mmol/l roztokom CTAB.

Prostredníctvom softvéru bol nastavený typ merania – Additive Titration, mód – Size and Zeta potential a priebeh titrácie. Nastavené bolo koncentračné rozmedzie tenzidu a počet titračných bodov. V každom titračnom bode bol premeraný zeta potenciál (3 série po 10 meraní) a Z-priemer veľkosti molekúl (3 série po 10 meraní). Všetky merania prebiehali pri teplote 25 °C.

Namerané hodnoty zeta potenciálu a veľkosti molekúl z prevedených meraní boli v programe MS Excel spriemerované a boli stanovené ich smerodajné odchýlky, zobrazené ako chybové úsečky.

3.4.8 Antimikrobiálna aktivita

Na stanovenie antimikrobiálnej aktivity γ -PGA bola prevedená bujónová mikrodilučná metóda, pri ktorej je sledovaný rast mikroorganizmov meraním zákalu na 96 jamkovej mikrotitračnej doštičke. Boli pripravené roztoky γ -PGA o koncentracii 1, 5, 10, 15, 20, 50 a 75 g/l a následne boli vysterilizované pri 110 °C po dobu 30 minút v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom. Po 24 hodinovej kultivácii *M. luteus*, *S. marcescens*, *E. coli* a *S. epidermis* (kapitola 3.3.1.1 a 3.3.1.2) boli bunky nariadené sterilným médiom, ktoré bolo použité aj na ich kultiváciu tak, aby absorbanca pri 630 nm bola 0,1. Nariadené bunky boli pipetované na mikrotitračnú doštičku o objeme 150 μ l. K nim bolo pridané 50 μ l z roztokov γ -PGA o rôznych koncentraciách. Kontrola bola pripravená pridaním 50 μ l sterilnej destilovanej vody k 150 μ l bakteriálnej kultúry. Každá vzorka a aj kontrola boli pripravené trikrát. Absorbancia vzoriek bola premeraná ihneď a po 24 hodinách kultivácie pri vlnovej dĺžke 630 nm.

3.5 Vplyv γ -PGA na viabilitu prokaryotických a eukaryotických buniek

Po 24 hodinovej kultivácii *L. rhamnosus* (3.3.1.3) a 48 hodinovej kultivácii *S. cerevisiae* (3.3.1.4) bolo odobraté 0,5 ml z inokula do eppendorf skúmavky a scentrifugované pri 7000 rpm, teplote 25 °C a dobe 5 minút. Supernatant bol vyliaty. K bunkám boli v závislosti od jednotlivého stresu pridávané objemy PBS pufru resp. modelových gastrointestinálnych štiav bez a s prídavkom γ -PGA. Kontrolné vzorky neobsahovali γ -PGA.

Tabuľka 7: PBS pufor, pH 7,5

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
destilovaná voda	1000 ml

3.5.1 Etanolový stres

Pri etanolovom strese s 10 obj. % etanolu bolo k bunkám v prvej eppendorf skúmavke pridané 0,45 ml PBS pufru a 0,05 ml etanolu. K sedimentu v druhej skúmavke bolo napipetované 0,45 ml PBS s prídavkom γ -PGA o koncentrácii 10 g/l a 0,05 ml etanolu. Pri 15 obj. % etanolu bolo napipetované k bunkám 0,425 ml PBS resp. PBS s 10 g/l γ -PGA a 0,075 ml etanolu. Vzorky boli zvortexované a vystavené stresu po dobu 1 hodiny.

3.5.2 Teplotný stres – vysoká teplota

Vzorky boli pripravené pridaním 0,5 ml PBS resp. PBS s 10 g/l γ -PGA k sedimentu buniek a zvortexovaním. Pôsobenie vysokej teploty prebiehalo pri teplotách 50 °C a 70 °C po dobu 5 a 15 minút vo vodnom kúpeli.

3.5.3 Teplotný stres – mrazenie

Mrazenie prebiehalo v mraziacom boxe pri teplote okolo -15 °C 1 hodinu. Vykonané boli tiež 3 zmrazovacie cykly, kedy po 1 hodine boli vzorky z mraziaceho boxu vybraté a po rozpustení opäť zmrazené a tento proces opakovaný ešte dvakrát. V experimente bol k sedimentu buniek pridávaný objem 0,5 ml roztoku o koncentráciách 10 a 15 g/l γ -PGA v pufré PBS. Kryoprotektívne účinky γ -PGA boli tiež porovnávané so známymi kryoprotektantami, ktoré boli k bunkám pridané o koncentrácii 10 g/l v PBS pufré – glukózou, sacharózou a glycerolom (79 μ l v 10 ml PBS). Kontrolná vzorka bola pripravená pridaním 0,5 ml pufru PBS k sedimentu buniek.

3.5.4 Osmotický stres

Do eppendorf skúmaviek so sedimentom buniek bolo napipetované 0,5 ml PBS so 100 g/l NaCl alebo 0,5 ml PBS so 100 g/l NaCl obohateného o 10 g/l γ -PGA. Pre dosiahnutie celkovej koncentrácie 200 g/l NaCl bolo odpovedajúce množstvo rozpustené priamo v pufré PBS a v PBS obsahujúcom 10 g/l γ -PGA. Vzorky boli po zvortexovaní vystavené stresu 30 minút a 1 hodinu.

3.5.5 Pôsobenie modelových gastrointestinálnych štiav

Po scentrifugovaní buniek a vyliatí supernatantu bolo k bunkám pridané 0,5 ml šťavy alebo 0,5 ml šťavy s obsahom 10 g/l γ -PGA. Modelové šťavy boli predtým vytemperované na 37 °C. Vzorky boli scentrifugované a vložené do termostatu vyhriateho na 37 °C pre simuláciu gastrointestinálneho prostredia na 30 minút, 1 a 2 hodiny.

Tabuľka 8: Pankreatická šťava, pH 8,9

pankreatín	0,125 g
NaHCO ₃	0,750 g
destilovaná voda	50 ml

Tabuľka 9: Žalúdočná šťava, pH 0,9

pepsín	0,125 g
HCl 35%	0,42 ml
destilovaná voda	50 ml

Tabuľka 10: Žlčová šťava, pH 8

žlčové soli	0,2 g
fosfátový pufor*	50 ml

Tabuľka 11: Fosfátový pufor*, pH 8

NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0,532 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	16,680 g
destilovaná voda	1000 ml

3.5.6 Stanovenie viability pomocou prietokového cytometru

Po uplynutí doby pôsobenia stresových podmienok na bunky boli vzorky nariadené desiatkovým riedením na 10⁻². K vzorkám bolo napipetované 5 µl roztoku propidium jodidu o koncentrácii 1 mg/ml a vzorky boli ponechané v tme 5-10 minút.

Pred analýzou viability buniek na prietokovom cytometry bolo prostredníctvom jeho softvéru nastavené množstvo odobratého vzorky (100 µl) z eppendorf skúmavky a rýchlosť prietoku vzorky (19,5 µl/min – u *L. rhamnosus* a 4,16 µl/min u *S. cerevisiae*). Každá vzorka bola premeraná trikrát.

Zo získaných histogramov boli odčítané množstvá živých a mŕtvych/poškodených buniek. Z ich sumy bolo vypočítané percentuálne zastúpenie živých buniek. Táto hodnota bola spriemerovaná pomocou programu MS Excel a vypočítané smerodajné odchýlky, ktoré predstavujú v grafe chybové úsečky.

3.6 Príprava častíc

3.6.1 Príprava alginátových, γ-PGA/alginát a γ-PGA častíc kvapkaním a ultrazvukom

Do 10 ml 2% CaCl₂ bolo prikvapkané kvapkadlom 2 ml roztoku 1% alginátu alebo 10 ml 0,5% γ-PGA za miešania magnetickým miešadlom. Pri príprave častíc pomocou ultrazvukového homogenizátoru Bandelin Sonoplus HS3200 (SonorexTechnik) bolo k 10 ml 2% CaCl₂ pridávané 2 ml roztoku 1% alginátu alebo 10 ml 0,5% γ-PGA.

Pri príprave γ-PGA/alginát bolo k 10 ml 2% CaCl₂ prikvapávané alebo pridávané (pri ultrazvuku) 2 ml roztoku zmiešaného z 0,5% γ-PGA s 2% alginátom o pomere 1 : 1.

Pripravené vzorky boli vhodne nariadené a bol zmeraný Z-priemer veľkosti častíc a zeta potenciál podľa 3.6.3.1.

3.6.2 Príprava častíc γ-PGA/alginát pomocou enkapsulátoru

Na prípravu γ-PGA/alginát častíc bol pripravený roztok 5% γ-PGA zmiešaného s 2% alginátom v pomere 1 : 1. Roztok bol prevedený do zásobnej fľaše a pomocou enkapsulátora B-395 Pro (BÜCHI) bol tryskou o rozmere 450 µm roztok rozprašovaný

do vytvrdzovacieho roztoku – 50 ml 2% CaCl₂, ktorý bol neustále miešaný magnetickým miešadlom. Častice v ňom boli ponechané po dobu 30 minút a následne boli pozorované optickým mikroskopom Intraco Micro LM 666 PV/∞ LED.

3.6.3 Príprava nanočastíc γ -PGA/chitosan

Nanočastice boli pripravené iónovou predgelačnou metódou podľa Pereira a kol. s upraveným postupom [52]. 10 ml 25 mmol/l roztoku CaCl₂ bolo prikvapkané k 100 ml 0,031% roztoku γ -PGA pomocou striekačkového čerpadla, ktoré je súčasťou prístroja enkapsulátor B-395 Pro (BÜCHI) počas 60 minút za miešania magnetickým miešadlom (rýchlosť čerpania 0,17 ml/min). Následne bolo prikvapkaných rovnakým spôsobom 20 ml 0,07% chitosanu ku γ -PGA/CaCl₂ počas 90 minút (rýchlosť čerpania 0,22 ml/min). Roztok chitosanu bol predtým upravený na pH 5 kyselinou chlorovodíkovou a zahriaty, aby došlo k jeho rozpusteniu. Zo suspenzie nanočastíc po prídavkoch chitosanu bolo odoberané po 1 ml na stanovenie Z-priemer veľkosti častíc, distribúcie veľkosti častíc a ich zeta potenciálu prístrojom Zetasizer Nano ZS (3.6.3.1).

3.6.3.1 Meranie veľkosti častíc a ich zeta potenciálu

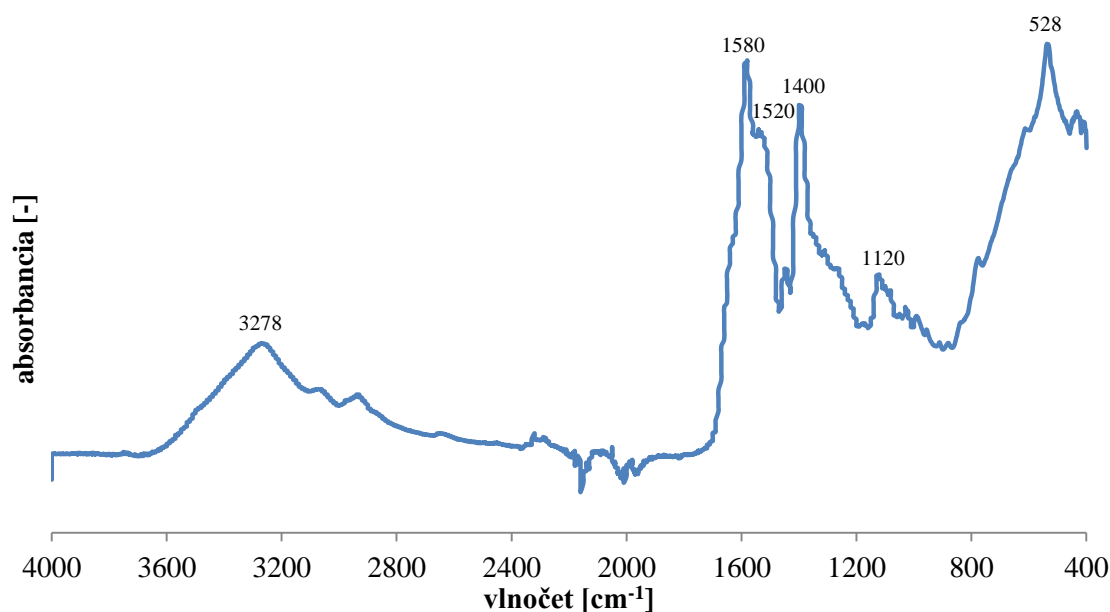
Meranie prebiehalo na prístroji Zetasizer Nano ZS. Pri meraní distribúcie veľkosti častíc a Z-priemeru veľkosti častíc bolo do plastovej kyvety pridané 1 ml vzorku a pri meraní zeta potenciálu bola k približne 0,7 ml vzorky v kyvete pridaná navyše univerzálna „dip“ cela.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Charakterizácia γ -PGA

4.1.1 FT-IR spektroskopia

Analýza chemickej štruktúry polyméru bola uskutočnená pomocou FT-IR spektroskopie. Spektrum (Obrázok 3) reprezentuje molekulárnu absorpciu IR žiarenia skupinami atómov γ -PGA a môže byť považované za jeho molekulárny „odtlačok prsta“.



Obrázok 3: FT-IR spektrum γ -PGA

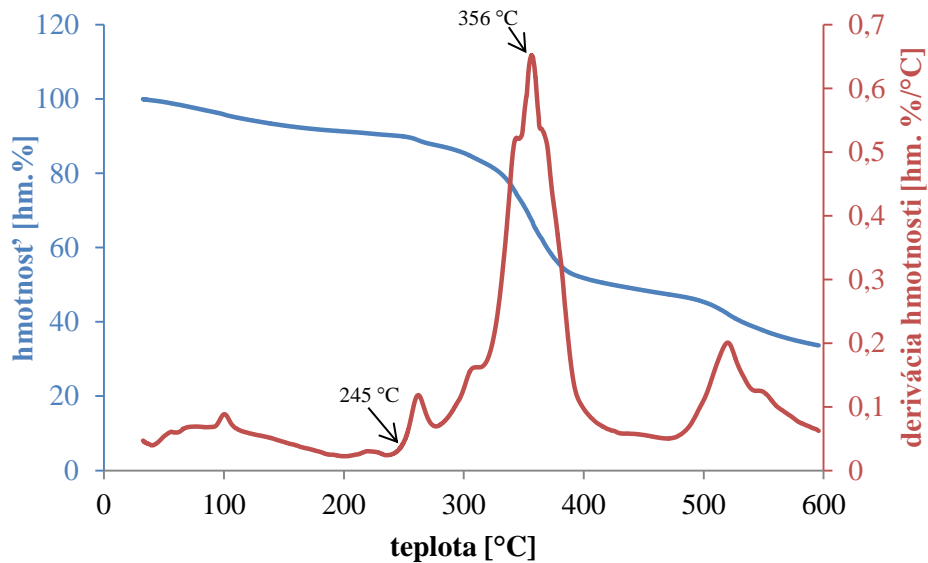
Charakteristická amid I absorpcia v oblasti vlnóčtu 1650 cm^{-1} je prekrytá širším píkom. Amid II vibráciu možno vo vibračnom spektre vidieť pri 1520 cm^{-1} . Silné C=O absorpcie v COOH sú pri 1580 cm^{-1} a 1400 cm^{-1} . C-N skupiny a N-H skupiny sú pozorovateľné pri 1120 cm^{-1} a 530 cm^{-1} v uvedenom poradí. Skupina pásov od $3300\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ predstavuje vibráciu OH v COOH, absorbovanú vodu a prekrývajúce sa absorpcie skupín NH a CH. V spektre je teda možno nájsť všetky funkčné skupiny a štruktúrne motívy typické pre γ -PGA.

4.1.2 Termická analýza

Na termickú analýzu γ -PGA boli prevedené dve metódy, a to termogravimetrická analýza (TGA) a diferenčná skenovacia kalorimetria (DSC).

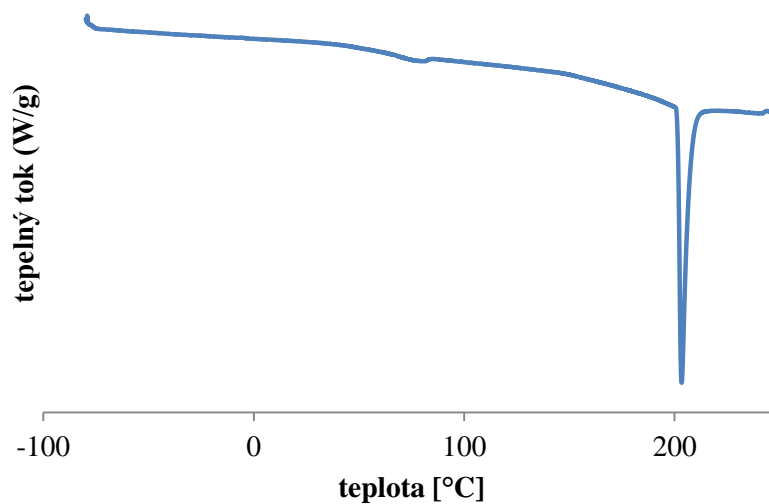
Obrázok 4 znázorňuje priebeh teplotných zmien hmotností γ -PGA stanovených v rámci TGA. Krivka ukazuje nepretržitý úbytok hmotnosti od začiatku zahrievania vzorky, kedy najskôr dochádzalo k odparovaniu absorbovanej vody, neskôr približne od 245 °C začal

γ -PGA degradovať. Tepelná degradácia polyméru nastala hlavne pri teplote 356 °C, ako vidieť z krivky prvej derivácie hmotnosti. Zvyšok vzorky bol pri 600 °C okolo 34 hm. %.



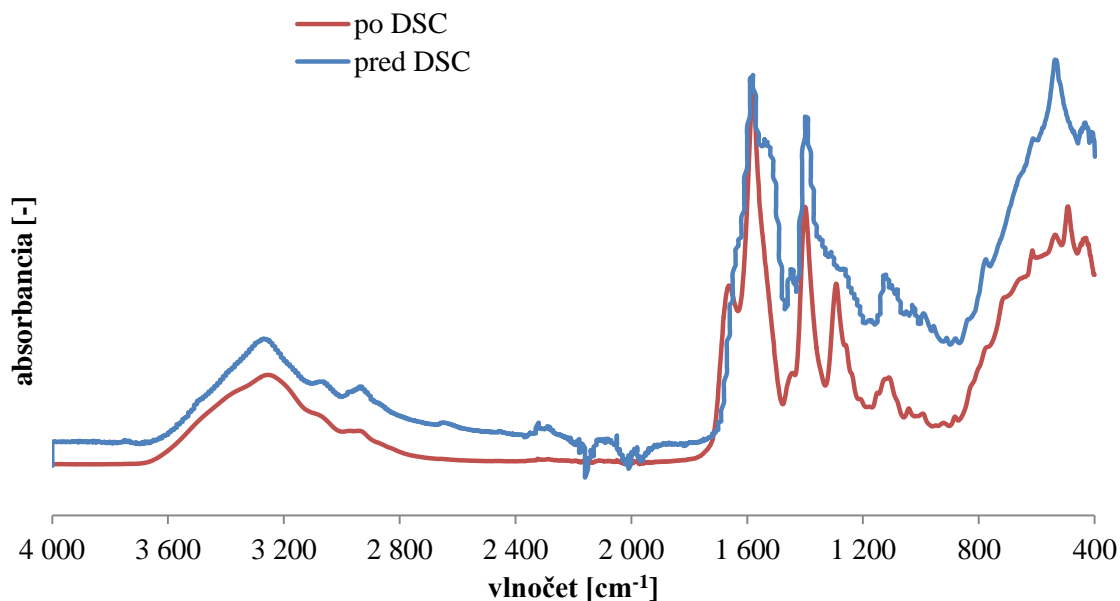
Obrázok 4: TGA γ -PGA

Výsledky DSC sú znázornené na Obrázok 5, na termograme je vidieť endotermický pík v rozmedzí teplôt 200 °C až 212 °C s maximom v teplote 203 °C. Teoreticky by bolo možné tento pík priradiť topeniu materiálu, avšak trochu neštandardný je jeho tvar a šírka.



Obrázok 5: DSC krivka γ -PGA

Preto bolo po DSC analýze γ -PGA zmerané jeho FT-IR spektrum a porovnané s FT-IR spektrom γ -PGA pred týmto tepelným namáhaním (Obrázok 6). Zmeny nastali v oblasti vlnočtu 1650 cm^{-1} a 1280 cm^{-1} , možno vidieť píky, ktoré pred DSC neboli pozorované. Je teda zrejmé, že pík nezodpovedá topeniu materiálu, ale chemickému procesu, pri ktorom došlo k zmene chemickej štruktúry materiálu.



Obrázok 6: FT-IR spektrum γ -PGA pred a po DSC

Z termickej analýzy možno zhodnotiť, že γ -PGA je tepelne stabilný napríklad na účely bežných operácií, ako je napríklad príprava roztoku v horúcej vode alebo na účely sterilizácie pripravených roztokov polyméru, prebiehajúcej zvyčajne pri teplote 120 °C.

4.1.3 Molekulová hmotnosť

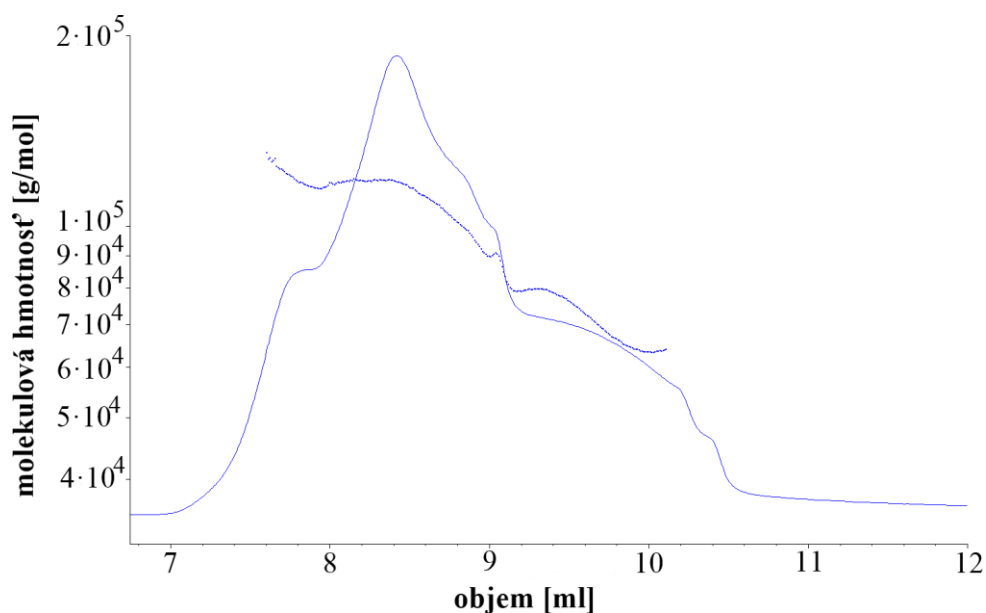
Molekulová hmotnosť je dôležitá charakteristika polymérov. Aplikácie γ -PGA sa menia podľa jeho molekulovej hmotnosti [18]. Na stanovenie hmotnostne strednej molekulovej hmotnosti γ -PGA (M_w), číselne strednej molekulovej hmotnosti (M_n) a indexu polydisperzity (PDI) bola využitá metóda SEC-MALS.

Pri sledovaní vplyvu počtu reťazcov na meranú veličinu hovoríme o M_n a pri meraní vplyvu hmotnosti reťazcov na meranú veličinu o M_w . Index polydisperzity je mierou šírky pravdepodobnostného rozdelenia zastúpenia reťazcov podľa dĺžky. Je definovaný vzťahom $PDI = M_w / M_n$, pričom vždy platí $PDI \geq 1$. Čím väčšie sú rozdiely medzi dĺžkami reťazcov, tým väčšia je hodnota PDI. Hodnota 1 nastáva pre monodisperzný systém [53; 54].

Tabuľka 12: Výsledky zo SEC-MALS analýzy γ -PGA

M_w [kDa]	M_n [kDa]	PDI
$89,279 \pm 2,739$	$84,824 \pm 0,285$	$1,053 \pm 0,035$

Molekulová hmotnosť γ -PGA býva v rozmedzí od 100 do 2500 kDa [3]. Na túto prácu využívaný γ -PGA mal nižšiu molekulovú hmotnosť, ktorej hodnota sa pohybovala okolo 90 kDa (Tabuľka 12). Index polydisperzity nadobúdal hodnoty blízko jednotky, polymérne reťazce boli teda približne rovnako dlhé. Na Obrázok 7 je ukážka chromatogramu zo SEC-MALS analýzy γ -PGA.

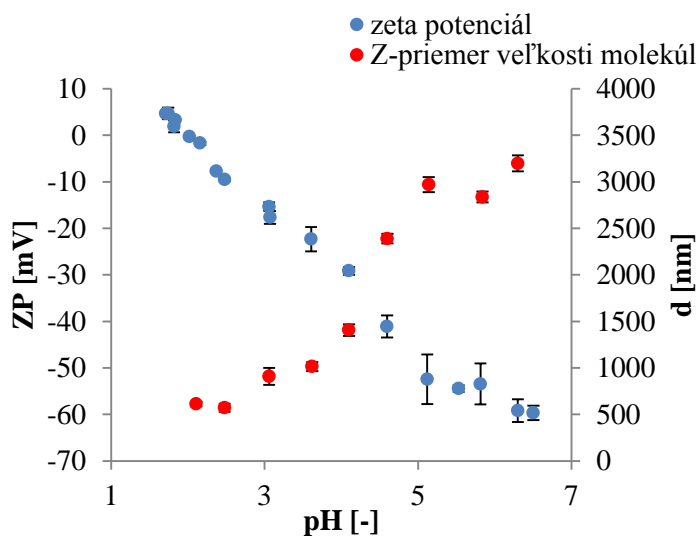


Obrázok 7: SEC-MALS chromatogram γ -PGA; závislosť molekulovej hmotnosti na elučnom objeme

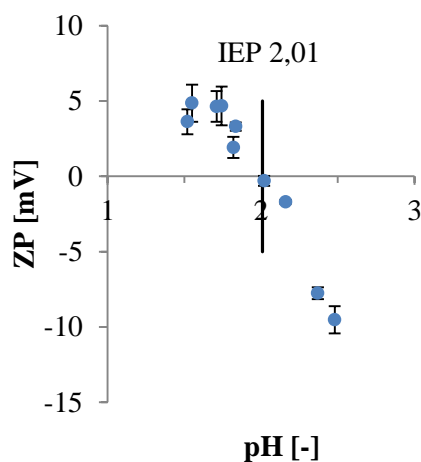
4.1.4 Izoelektrický bod

Na stanovenie hodnoty izoelektrického bodu (IEP) γ -PGA bol prevedený titračný experiment. Z hodnoty zeta potenciálu možno určiť izoelektrický bod. IEP je hodnota pH, pri ktorom častica, molekula alebo koloid je elektricky neutrálna, a zeta potenciál je nulový [55].

Pri meniacom sa pH roztoku γ -PGA o koncentrácii 1 g/l pomocou 1 mol/l HCl boli metódou elektroforetického rozptylu svetla stanovené hodnoty zeta potenciálu (ZP). Súčasne prebiehalo aj meranie priemernej distribúcie veľkosti molekúl vo vzorke metódou dynamického rozptylu svetla.



Obrázok 8: Závislosť Z-priemeru veľkosti molekúl, zeta potenciálu na pH pri titracii 1g/l γ -PGA 1 mol/l HCl



Obrázok 9: Izoelektrický bod γ -PGA

S klesajúcou hodnotou pH rástla hodnota zeta potenciálu a klesal priemer veľkosti molekúl γ -PGA (Obrázok 8). V kapitole 2.5.2 bolo zmienené, že pH má významný vplyv na štruktúru a molekulárne interakcie γ -PGA, a tak za zmenu tvaru je primárne zodpovedná transformácia z random coil na α -helix v sekundárnej štruktúre γ -PGA. S klesajúcim pH vznikajú silné intramolekulárne vodíkové väzby tvoriace kompaktnú α -helikálnu konformáciu [16].

Na Obrázok 9 sú vybrané namerané hodnoty zeta potenciálu od pH približne 3,5 do 1,5 pre lepšie znázornenie IEP γ -PGA, ktorý bol pomocou softwaru Zetasizer Nano ZS stanovený pri hodnote pH 2,01. Táto nameraná hodnota zodpovedá publikovaným údajom z patentového zdroja, ktorý udáva hodnotu IEP γ -PGA v rozmedzí od 1,5 do 3,5 [56].

4.1.5 Rozpustnosť

Na prácu s polymérom bolo potrebné zistiť jeho rozpustnosť alebo všeobecnejšie povedané kompatibilitu polymér-rozpúšťadlo. Množstvá γ -PGA boli navážené tak, aby po pridaní rozpúšťadiel bola získaná výsledná koncentrácia 1, 5, 10, 15, 20, 50 a 75 g/l. Ako rozpúšťadlo bola zvolená destilovaná voda a etanol z dôvodu, že tieto rozpúšťadlá sú vhodné pre biomedicínske aplikácie. Destilovaná voda a etanol boli tiež zmiešané v rôznych pomeroch, a to konkrétne pomery 75 : 25, 50 : 50 a 25 : 75. Na určenie vplyvu pH na rozpúšťanie γ -PGA, bolo rozpúšťanie polyméru prevádzané v glycín-HCl pufri o pH 3, fyziologickom roztoku o pH 7,4 a uhličitanovom pufri o pH 10,95. Výsledky rozpúšťania γ -PGA v spomínaných rozpúšťadlách sú spracované v Tabuľka 13.

Tabuľka 13: Rozpustnosť γ -PGA v rôznych rozpúšťadlách, pri rôznych koncentráciách

	koncentrácia γ -PGA [g/l]						
	1	5	10	15	20	50	75
voda	+	+	+	+	+	+	+
etanol	-	-	-	-	-	-	-
voda : etanol 75 : 25	+	+	+	+	+	+	+
voda : etanol 50 : 50	+	+	-	-	-	-	-
voda : etanol 25 : 75	-	-	-	-	-	-	-
glycín-HCl pufor, pH 3	+	+	+	+	+	+	+
fyziologický roztok, pH 7,4	+	+	+	+	+	+	+
uhličitanový pufor, pH 10,95	+	+	+	+	+	+	+

(+) rozpustný, (-) nerozpustný

γ -PGA má vysokú rozpustnosť vo vode, rozpustil sa aj pri koncentrácii 75 g/l. So zvyšujúcou sa koncentráciou γ -PGA bol získavaný čoraz viskóznejší roztok. Zmena viskozity bola pozorovaná od koncentrácie 5 g/l. Farba roztoku sa nemenila, roztok zostal číry aj pri najvyššej použitej koncentrácii.

γ -PGA nebol rozpustený v etanole ani pri najnižšej koncentrácii. Vznikla zakalená zmes – suspenzia a bola pozorovaná sedimentácia γ -PGA. Suspenzia o koncentrácii γ -PGA 20 g/l bola zahrievaná vo vodnom kúpeli o teplote 50 °C a ani po hodine nebol polymér rozpustený – teplota nemá vplyv na rozpúšťanie γ -PGA v etanole.

Pri rozpúšťaní polyméru pri pomere destilovaná voda : etanol 75 : 25, bol γ -PGA rozpustený a s jeho zvyšujúcou sa koncentráciou vznikali čím ďalej viskóznejší roztok. Pri pomere etanol : voda 50 : 50 bol γ -PGA o koncentrácii 5, 10 g/l rozpustený, pri vyšších koncentráciách vznikali viditeľné kľbká polyméru, ktoré nebolo možné rozmiešať. Keď bolo použité rozpúšťadlo voda : etanol 25 : 75, vzorky so zvyšujúcou sa koncentráciou boli zakalené a časť polyméru priľnula k stene eppendorf skúmavky.

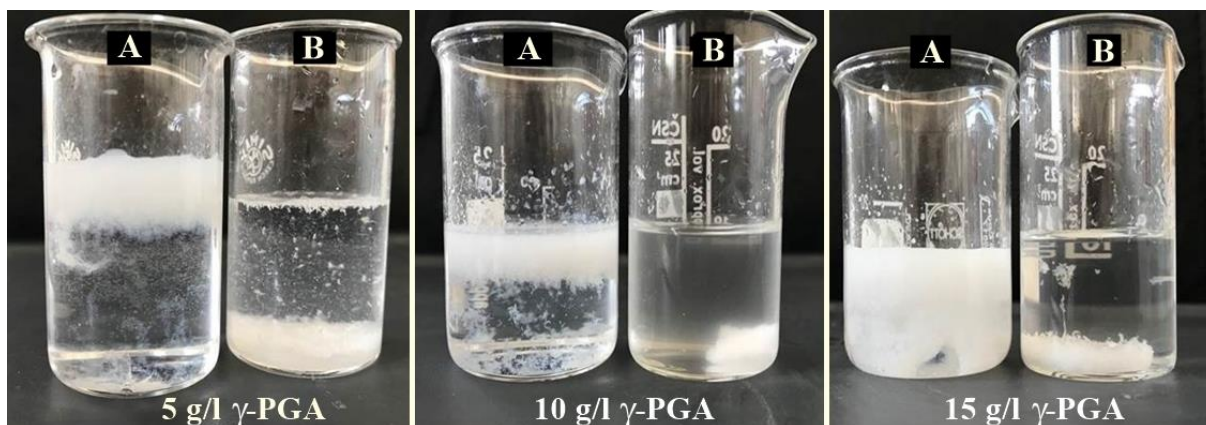
Pri použití glycín-HCl pufru, fyziologického pufru a uhličitanového pufru ako rozpúšťadiel pre γ -PGA bol polymér rozpustený pri všetkých použitých koncentráciách, od 20 g/l γ -PGA bolo rozpúšťanie pomalšie. Boli získané číre roztoky polyméru s pufrom. Bola tiež pozorovaná zvyšujúca sa viskozita so zvyšujúcou sa koncentráciou γ -PGA. Pri porovnávaní viskozít u použitých pufrov o rôznych pH pri jednej koncentrácii nebol voľným okom zistený rozdiel. Viskozita roztoku γ -PGA by mala byť príbuzná deprotonovanému stupňu karboxylových skupín v postranných reťazcoch γ -PGA, a teda s rastúcim pH by mala rásť viskozita roztoku [23].

Podľa informácií o rozpustnosti γ -PGA z vedeckej literatúry, ktoré sú spísané v kapitole 2.5.1, by na prácu využívaný γ -PGA mal obsahovať L aj D enantioméry kyseliny glutámovej kvôli jeho nerozpustnosti v etanole a malo by ísť o soľ polyméru, ktorá je vo vode úplne rozpustná [2; 4].

4.1.6 Zrážanie γ -PGA iónmi kovov

O γ -PGA už niekoľko štúdií preukázalo, že má afinitu ku katiónom ťažkých kovov a s niektorými multivalentnými katiónmi tvorí zrazeniny [57]. Tieto vlastnosti polyméru sú tiež spísané v kapitole 2.5.1.

Na zrážanie γ -PGA boli použité divalentné katióny vápnika a horčíka. Boli pripravené roztoky γ -PGA o koncentráciách 5 g/l, 10 g/l a 15 g/l. K týmto roztokom polyméru boli pridávané nárazovo v pomeroch a prikvapkávané nasýtené roztoky $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, bola pozorovaná zrazenina.



Obrázok 10: Zrážanie γ -PGA nasýteným roztokom $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (A – prídavok v pomeroch, B – prídavok kvapkaním)

Po nárazovom pridaní nasýteného roztoku $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ k roztoku γ -PGA o koncentrácii 5 g/l v pomere 1 : 1 nebola pozorovaná žiadna vizuálna zmena, pri pomere 1 : 2 (γ -PGA : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) vznikol zákal a pri pomere 1 : 3 bol pozorovaný vznik zrazeniny. V roztoku γ -PGA o koncentrácii 10 g/l už pri prídavku $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v pomere 1 : 1 vznikol zákal a pri 1 : 2 častice. V roztoku γ -PGA o koncentrácii 15 g/l vznikli častice ihneď po pridaní $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v pomere 1 : 1.

U všetkých použitých koncentráciách γ -PGA vznikol zákal po prikvapnutí 6 ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, po ďalšom prídavku (1 ml) došlo k odčíreniu roztoku a tvorbe zrazeniny. Bola pozorovaná sedimentácia zrazeniny a vytvorenie pevného zhluku zrazeniny pri koncentrácii 10 g/l a 15 g/l γ -PGA.

Pozorovaná bola rozdielnosť medzi pridávaním $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nárazovo v pomeroch (častice sa držali na hladine a príliš nesedimentovali) a pridávaním kvapkaním (Obrázok 10).

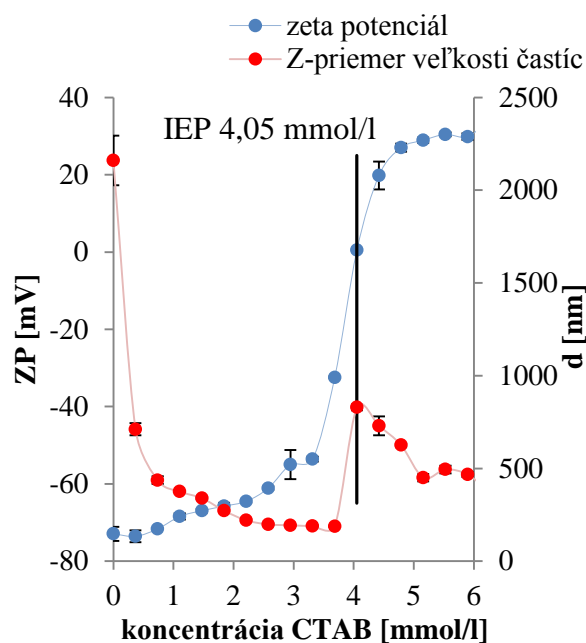
Chloridová soľ Mg^{2+} zrážanie γ -PGA nespôsobovala. Dôvodom môže byť, že v prípade Ca^{2+} má γ -PGA obmedzený počet miest pre tento ión a po nasýtení týchto miest dôjde k vyzrážaniu polyméru na rozdiel od Mg^{2+} . γ -PGA by mal mať tiež približne 14krát väčšiu väzbovú afinitu pre Ca^{2+} v porovnaní s Mg^{2+} . Tvorba zrazeniny iónom Ca^{2+} je pravdepodobne čiastočne dôsledkom tejto väzbovej afinity [20].

4.1.7 Zrážanie γ -PGA pomocou CTAB

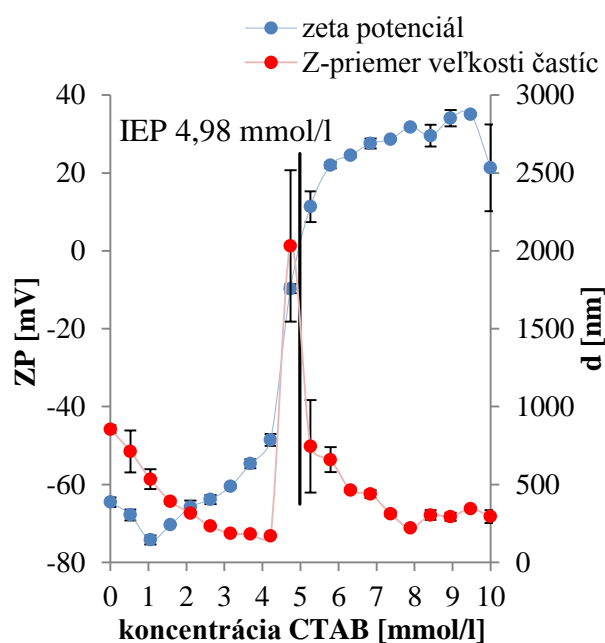
O iónové komplexy nerozpustné vo vode a stabilné voči zahrievaniu, ktoré vznikajú spájaním karboxylových polypeptidov s kationovými povrchovo aktívnymi látkami bol prejavovaný značný záujem, keďže môžu byť aplikované na veľkom množstve priemyselných, ako aj biologických procesov [58; 59].

Pomocou prístroja Zetasizer Nano ZS s automatickým titrátorom bola študovaná interakcia medzi polyaniómom γ -PGA s opačne nabitým – kationovým surfaktantom CTAB vo vodnom prostredí, konkrétne bol meraný zeta potenciál a Z-priemer veľkosti častíc po prídavkoch CTAB o koncentrácii 10 mmol/l a 20 mmol/l k roztoku γ -PGA o koncentrácii 1 g/l. Výsledky

sú zobrazené na Obrázok 11 a Obrázok 12, ako závislosť zeta potenciálu a Z-priemeru veľkosti častíc na koncentrácii pridávaného CTAB k γ -PGA.



Obrázok 11: Titrácia roztoku 1g/l γ -PGA
10 mmol/l roztokom CTAB



Obrázok 12: Titrácia roztoku 1g/l γ -PGA
20 mmol/l roztokom CTAB

Na začiatku titrácie nadobúdala systém γ -PGA-CTAB vysoko záporné hodnoty zeta potenciálu. S rastúcou koncentráciou tenzidu CTAB prechádzal systém zo stabilného do nestabilného stavu – zvyšovala sa hodnota zeta potenciálu väzbou pozitívne nabitého CTAB na γ -PGA, až dosiahla nulovú hodnotu pri neutralizácii nábojov – izoelektrický bod. Pri titrácii γ -PGA 10 mmol/l roztokom CTAB bol IEP dosiahnutý pri koncentrácii 4,05 mmol/l CTAB vo vzorke. Titrácia γ -PGA 20 mmol/l roztokom CTAB bola uskutočnená z dôvodu zisku väčšieho množstva titračných bodov za IEP, ktorý bol nadobudnutý pri koncentrácii CTAB 4,98 mmol/l. Za IEP zeta potenciál stúpal s postupnými prídavkami CTAB až do kladných hodnôt a systém sa dostával opäť do stabilného stavu.

Veľkosť častíc najskôr pri interakciách γ -PGA s CTAB klesala, v IEP došlo k prudkému nárastu veľkosti častíc spôsobeného agregáciou systému γ -PGA-CTAB. Následne dochádzalo k zmenšovaniu vzniknutých agregátov až k ustáleniu veľkosti častíc.

4.1.8 Antimikrobiálna aktivita

Antimikrobiálna schopnosť je dôležitá charakteristika materiálu určeného pre biomedicínske aplikácie [60]. Antimikrobiálna aktivita γ -PGA bola hodnotená pomocou bujónovej mikrodilučnej metódy (postup v 3.4.8). Testované boli grampozitívne baktérie *M. luteus*, *S. epidermis* a gramnegatívne baktérie *S. marcescens* a *E. coli*. Pre každú koncentráciu γ -PGA (1, 5, 10, 15, 20, 50 a 75 g/l) a taktiež kontrolu (destilovaná voda) boli premerané tri vzorky. Výsledky sú uvedené v Tabuľka 14.

Tabuľka 14: Antimikrobiálna aktivita γ -PGA proti *M. luteus*, *S. epidermis*, *S. marcescens*, *E. coli*

	koncentrácia γ -PGA [g/l]						
	1	5	10	15	20	50	75
<i>M. luteus</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. epidermis</i>	-	-	+	+	++	++	++
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-

Rozdiel v porovnaní s kontrolou: (-) <5% , (+) 5-10 % , (++) 10-20%

Zaznamenaný bol mierny inhibičný účinok γ -PGA na grampozitívne baktérie *M. luteus* a *S. epidermis* od koncentrácie 10 g/l. U *S. epidermis* bola antimikrobiálna účinnosť γ -PGA od koncentrácie 20 g/l navýšená. U gramnegatívnych baktérií *S. marcescens* a *E. coli* nebol pozorovaný inhibičný účinok ani pri vysokých koncentráciách γ -PGA.

Štúdie zaoberajúce sa antimikrobiálnou aktivitou γ -PGA zistili jeho antimikrobiálnu schopnosť aj proti gramnegatívnym baktériám, bola však výrazne nižšia než proti grampozitívnym baktériám [60; 61]

Hydrofóbne materiály sú citlivejšie k adhézii mikroorganizmov s hydrofóbnymi a negatívne nabitými vlastnosťami. Hydrofóbne interakcie medzi mikroorganizmom a materiálom by navýšili mikrobiálnu adhéziu, čo by viedlo k proliferácii mikroorganizmov. Dôvodom antimikrobiálnej aktivity γ -PGA môže byť preto jeho hydrofilita a aniónová povaha, ktorá viedla k menšej mikrobiálnej adhézii. [60; 61; 62]

4.2 Vplyv γ -PGA na viabilitu prokaryotických a eukaryotických buniek

Probiotiká (laktobacily, bifidobaktérie, niektoré kmeňe *S. cerevisiae*) sa stretávajú s rôznymi podmienkami environmentálneho stresu, ako sú zmeny pH, osmolarita, teplota, kyslík, koncentrácia chemikálií počas manipulácie, spracovania, výroby a skladovania. Mali by prežiť a udržať si vysokú životaschopnosť po dosiahnutí gastrointestinálneho traktu, aby priniesli priaznivé účinky hostiteľovi. Dôsledkom týchto stresov sa však všeobecne zistilo zníženie probiotickej životaschopnosti a aktivity [63; 64].

S. cerevisiae sa tiež používa na výrobu fermentačných produktov, ako je víno, pivo a biopalivo. Počas fermentácie je kvasinka vystavená množstvu stresov, ktoré vplývajú na jej prežitie, napr. oxidačnému, osmotickému, etanolovému stresu a šoku z chladu počas uskladnenia konečného produktu [64].

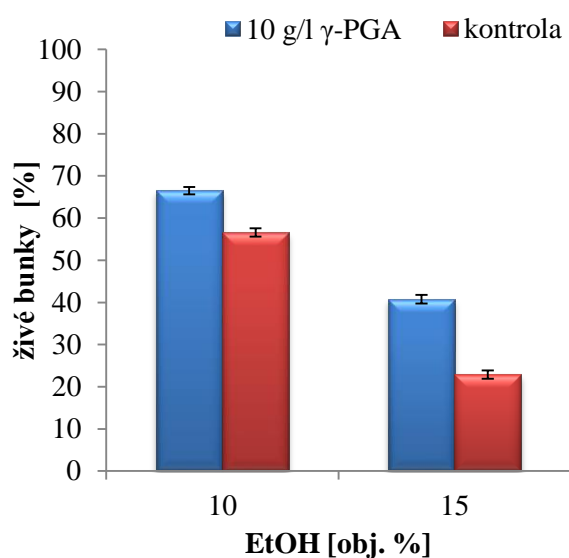
V štúdiu bol skúmaný vplyv γ -PGA na prežitie prokaryotických buniek baktérie *L. rhamnosus* CCM 1825 a eukaryotických buniek kvasinky *S. cerevisiae* CCY 21-4-102 pri stresových podmienkach. Použitie koncentrácie γ -PGA (10 a 15 g/l) pri experimentoch nemali výrazné inhibičné účinky na grampozitívne baktérie (4.1.8), ktorou je aj *L. rhamnosus*. Boli prevádzané rôzne stresy vrátane pôsobenia etanolu, vysokej teploty, mrazenia a NaCl.

Bunky boli tiež vystavené simulovaným gastrointestinálnym podmienkam, ktoré zahŕňali expozíciu modelovej žalúdočnej šťavy, pankreatickej šťavy a žlčovej šťavy.

Prietoková cytometria poskytla rýchlu a spoľahlivú metódu na kvantifikáciu viabilných buniek v bunkovej suspenzii. Na posúdenie životaschopnosti (postup v kapitole 3.5.6) bola použitá fluorescenčná sonda propidium jodid, ktorá ľahko preniká do poškodených, priepustných membrán neživotaschopných buniek a viaže sa na dvojvláknovú DNA interkaláciou medzi párami báz [65].

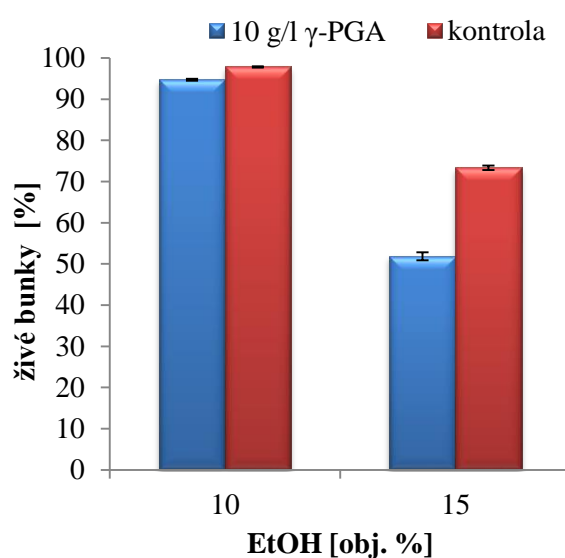
4.2.1 Etanolvý stres

Na prípravu vzoriek pre etanolvý stres (kapitola 3.5.1) bol k bunkám *L. rhamnosus* a *S. cerevisiae* pridaný pufo PBS (kontrolná vzorka) alebo pufo PBS obsahujúci 10 g/l γ -PGA. Ďalej bol pridaný etanol na 10 a 15 obj. %. Doba expozície etanolovému stresu bola 1 hodina. Výsledky sú prezentované na Obrázok 13 a Obrázok 14.



Obrázok 13: Vplyv γ -PGA na viabilitu

L. rhamnosus pri hodinovom etanolovom strese



Obrázok 14: Vplyv γ -PGA na viabilitu

S. cerevisiae pri hodinovom etanolovom strese

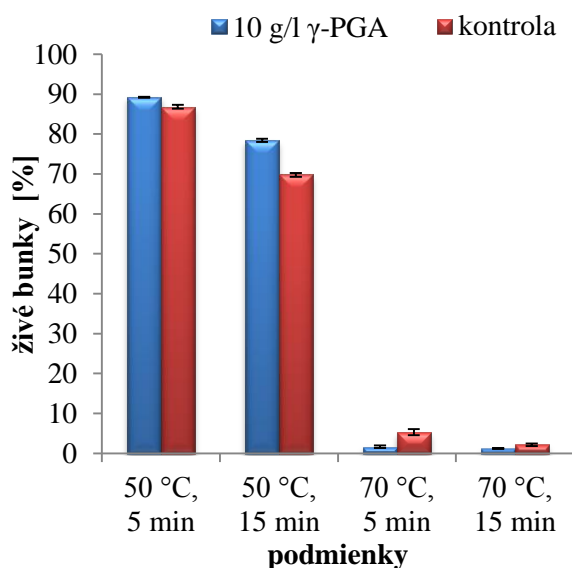
Protektívne účinky γ -PGA na *L. rhamnosus* sa prejavili pri strese s 10 a 15 obj. % etanolu (Obrázok 13). Pri použití 15 obj. % bol zaznamenaný výrazný rozdiel viabilných buniek s použitím prídavku γ -PGA oproti etanolovému stresovaniu bez polyméru. Etanolová toxicita sa vo všeobecnosti pripisuje interakcii etanolu s bunkovou membránou, čo vedie k strate jej integrity [66]. Polymér mohol znížiť kontakt etanolu s bunkovou membránou baktérie.

Druh kvasinky *S. cerevisiae* sa všeobecne považuje za etanoltolerantný. Čisté izolované kultúry sú etanoltolerantné do 10, max 12 obj. % etanolu [67]. Po hodinovom pôsobení etanolu o 10 obj. % mal kmeň *S. cerevisiae* CCY 21-4-102 takmer 100 % viabilných buniek. Pri 15 obj. % etanolu bola už etanoltolerancia tohto kmeňa nižšia. γ -PGA mal negatívny

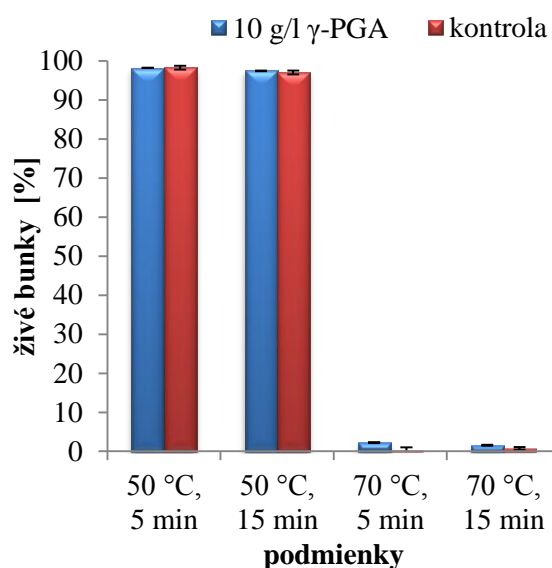
vplyv – jeho prídavok znižoval viabilitu buniek, mohol ovplyvniť prirodzenú ochranu kvasinky pred etanolom.

4.2.2 Teplotný stres – vysoká teplota

Vzorky pre teplotné stresy boli pripravené podľa postupu uvedeného v kapitole 3.5.2. Vplyv γ -PGA na viabilitu buniek *L. rhamnosus* a *S. cerevisiae* bol sledovaný pri teplotách 50 °C a 70 °C. K bunkám bol pridávaný pufo PBS s 10 g/l γ -PGA a bez obsahu γ -PGA (kontrolná vzorka). Vzorky boli vystavené príslušným teplotám vo vodnom kúpeli na 5 a 15 minút. Výsledky sú uvedené na Obrázok 15 a Obrázok 16.



Obrázok 15: Vplyv γ -PGA na viabilitu *L. rhamnosus* pri pôsobení teploty 50 °C a 70 °C po dobu 5 a 15 minút



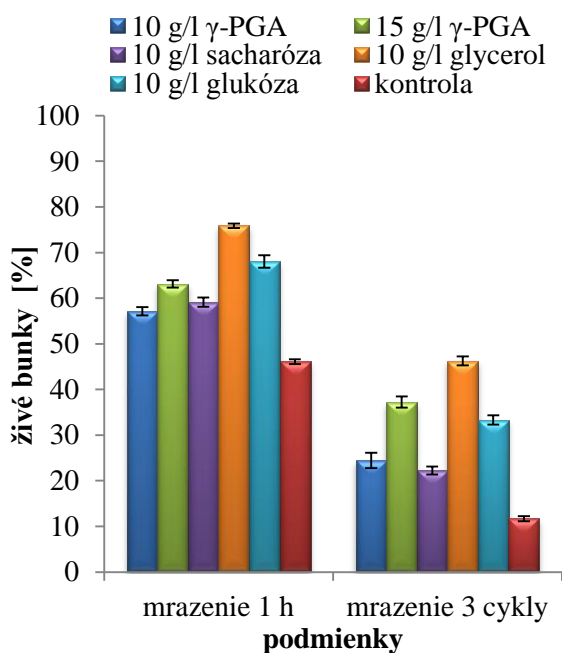
Obrázok 16: Vplyv γ -PGA na viabilitu *S. cerevisiae* pri pôsobení teploty 50 °C a 70 °C po dobu 5 a 15 minút

Keďže optimálna teplota pre rast kmeňa *L. rhamnosus* CCM 1825 je 37 °C, teplota 50 °C nebola pre bunky príliš stresujúcou, ako vidieť na Obrázok 15. Z nadobudnutých výsledkov možno usúdiť, že pri 50 °C γ -PGA mierne ochránil bunky – mohol pôsobiť na bakteriálnu membránu, kde sú mastné kyseliny náchylné na poškodenie teplom, pri ktorom následne dochádza k agregácii proteínov, poškodeniu ribozómov a tiež RNA [68]. Na stratu viability baktérii malo výrazný vplyv použitie teploty 70 °C, pri ktorej bolo zanalyzované 5 a menej percent živých buniek. Pri tejto teplote však γ -PGA už bunky neochránil.

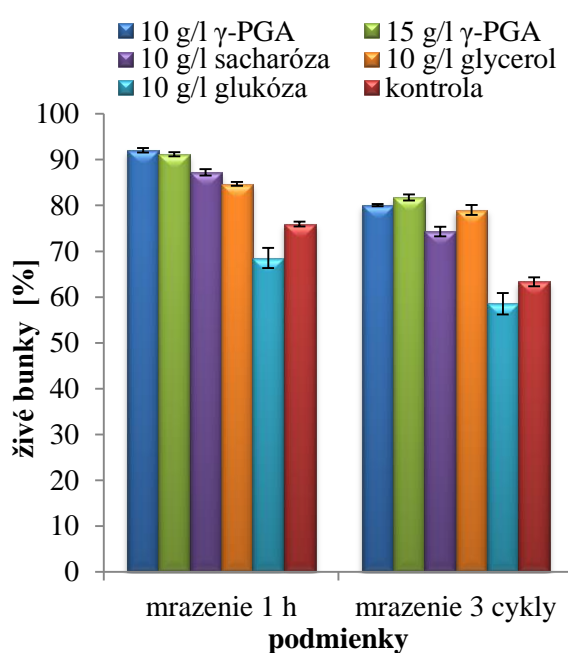
Pri 50 °C nedochádzalo k znižovaniu viability buniek kvasinky *S. cerevisiae* po 5 ani 15 minútach pôsobenia tohto stresu (Obrázok 16) a preto nemožno vyhodnotiť či mal polymér vplyv viabilitu buniek. Teplota 70 °C usmrtila takmer všetky bunky *S. cerevisiae*.

4.2.3 Teplotný stres – mrazenie

Mrazenie buniek prebiehalo pri teplote $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 hodiny, tiež prebehlo trikrát opakované hodinové mrazenie a následne rozmrazenie vzoriek (postup 3.5.3). K bunkám *L. rhamnosus* a *S. cerevisiae* bol pridávaný pufr PBS s obsahom 10 g/l a 15 g/l γ -PGA. Kryoprotektívny efekt γ -PGA bol tiež porovnaný s konvenčnými kryoprotektantami sacharóza, glycerol a glukóza o koncentráciách 10 g/l v pufr PBS. Príprava kontrolnej vzorky pozostávala z pridania čistého pufru PBS k sledovaným bunkám mikroorganizmov. Výsledky sú zobrazené na Obrázok 17 a Obrázok 18.



Obrázok 17: Vplyv γ -PGA a iných kryoprotektantov na viabilitu *L. rhamnosus* pri mrazení



Obrázok 18: Vplyv γ -PGA a iných kryoprotektantov na viabilitu *S. cerevisiae* pri mrazení

Výsledky z mrazenia *L. rhamnosus* (Obrázok 17) pri použití 10 g/l γ -PGA ako kryoprotektantu ukazujú, že schopnosť kryoprotekcie pri hodinovom mrazení a mrazení s tromi cyklami bola porovnateľná s 10 g/l sacharózy. Bol tiež testovaný efekt 15 g/l γ -PGA, pri ktorom bola nameraná mierne vyššia viabilita buniek baktérie oproti 10 g/l γ -PGA, rozdiel bol však navýšený pri trikrát opakovanom hodinovom mrazení. Najlepšiu kryoprotekčnú ochranu pre *L. rhamnosus* vykazoval prídavok 10 g/l glycerolu. Vysoké percento viabilných buniek bolo zanalyzované aj pri 10 g/l glukózy.

Pri študovaní vplyvu γ -PGA na kvasinku *S. cerevisiae* pri hodinovom mrazení vykázalo použitie tohto polyméru o koncentracii 10 aj 15 g/l najvyššie percento viabilných buniek (Obrázok 18). Pri mrazení s tromi cyklami bola percentuálna hodnota životaschopných buniek opäť najvyššia s použitím 10 a 15 g/l γ -PGA ako kryoprotektantu, avšak navyše porovnateľná

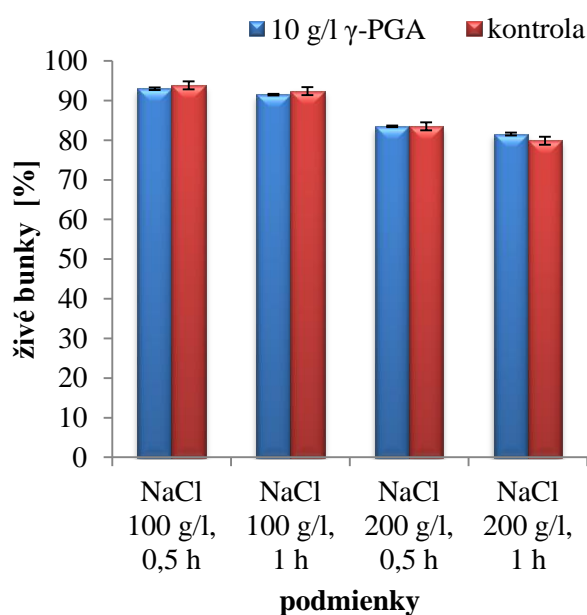
s 10 g/l glycerolu. Nebol pozorovaný rozdiel medzi použitím koncentrácií 10 a 15 g/l γ -PGA u *S. cerevisiae*, tak ako tomu bolo u *L. rhamnosus*.

Funkcii kryoprotektantov a kryoprotektívnym účinkom γ -PGA bola venovaná kapitola 2.6.3.2. Pri celkom zhodnotení výsledkov z tohto teplotného stresu mražením možno potvrdiť, že γ -PGA je účinný kryoprotektant. Pri kmeni *L. rhamnosus* CCM 1825 a taktiež *S. cerevisiae* CCY 21-4-102 polymér ochránil bunky v porovnaní s kontrolnou vzorkou – bunkami, ktoré boli vystavené mrazu bez akéhokoľvek kryoprotektantu.

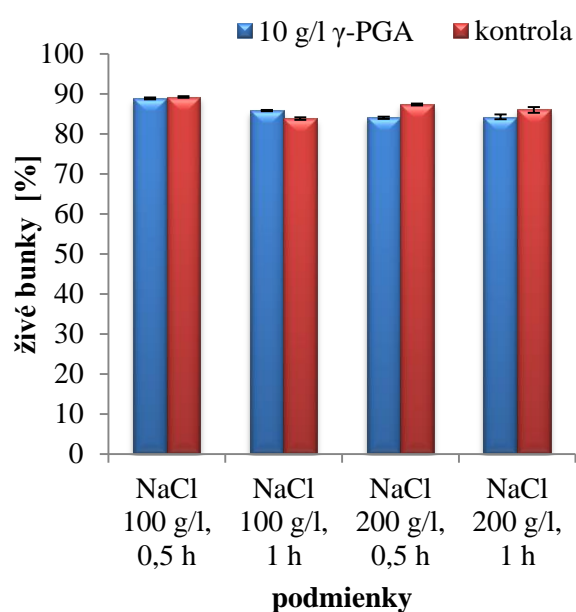
Na štúdiu využity γ -PGA má molekulovú hmotnosť 90 kDa (kapitola 4.1.3), avšak γ -PGA s nižšou molekulovou hmotnosťou je lepším kryoprotektívnym činidlom ako γ -PGA s vysokou molekulovou hmotnosťou. Použitie γ -PGA na kryoprotekciu má výhodu oproti bežne využívaným kryoprotektantom, že môže byť pridaný do potravín vo väčších množstvách bez zmeny chuti [40].

4.2.4 Osmotický stres

V experimente (postup podľa 3.5.4) boli bunky *L. rhamnosus* a *S. cerevisiae* vystavené NaCl o koncentráciách 100 a 200 g/l rozpustenému v pufré PBS. K bunkám bol navyše pridávaný γ -PGA o koncentracii 10 g/l a sledovaný jeho vplyv na viabilitu buniek pri osmotickom strese, ktorému boli bunky exponované na 30 minút a jednu hodinu. Kontrolná vzorka neobsahovala γ -PGA. Výsledky z osmotického stresu sú zaznamenané na Obrázok 19 a Obrázok 20.



Obrázok 19: Vplyv γ -PGA na viabilitu *L. rhamnosus* pri osmotickom strese



Obrázok 20: Vplyv γ -PGA na viabilitu *S. cerevisiae* pri osmotickom strese

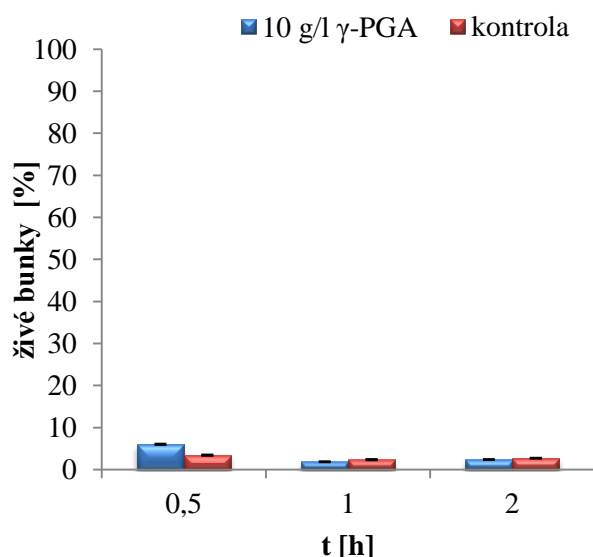
Percentuálna hodnota živých buniek baktérie *L. rhamnosus* po aplikácii 100 g/l NaCl po dobu 30 minút a taktiež 1 hodiny bola vyššia než 90 % (Obrázok 19). Strata viability buniek baktérie bola mierne zaznamenaná po expozícii NaCl o koncentrácii 200 g/l.

U kvasinky *S. cerevisiae* (Obrázok 20) nebol pozorovaný rozdiel medzi životaschopnosťou po vystavení buniek koncentráciám 100 g/l a 200 g/l NaCl a taktiež ani pri dobe expozície stresu.

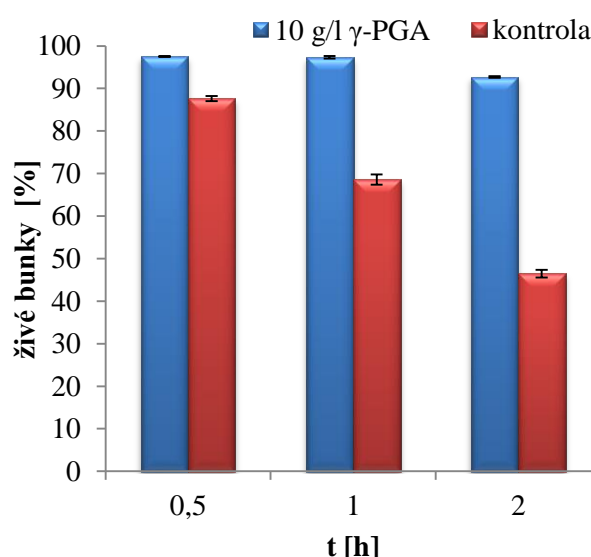
Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že externe dodaný γ -PGA nemá vplyv na prežitie buniek *L. rhamnosus* CCM 1825 a *S. cerevisiae* CCY 21-4-102 počas osmotického stresu, na rozdiel od mikroorganizmov *Planococcus halophilus*, *Sporosarcina halophila* a *Natrialba asiatica*, ktoré γ -PGA produkujú a používajú na zníženie vysokých miestnych koncentrácií solí, čo im umožní prežiť v nepriateľskom prostredí [5; 15].

4.2.5 Pôsobenie modelových gastrointestinálnych štiav

Cieľom štúdie bolo skúmať účinok γ -PGA na vybrané kmene *L. rhamnosus* CCM 1825 a *S. cerevisiae* CCY 21-4-102 v simulovaných gastrointestinálnych podmienkach (postup v kapitole 3.5.5). Pre tento účel bola pripravená žalúdočná šťava o pH 0,9 (Tabuľka 9), pankreatická šťava o pH 8,9 (Tabuľka 8) a žlčová šťava o pH 8 (Tabuľka 10). K modelovým šťavam bol pridaný γ -PGA o koncentrácii 10 g/l. Kontrolné vzorky polymér neobsahovali. Viabilita mikroorganizmov bola premeriavaná po 30 minútach, 1 a 2 hodinách pôsobenia štiav.



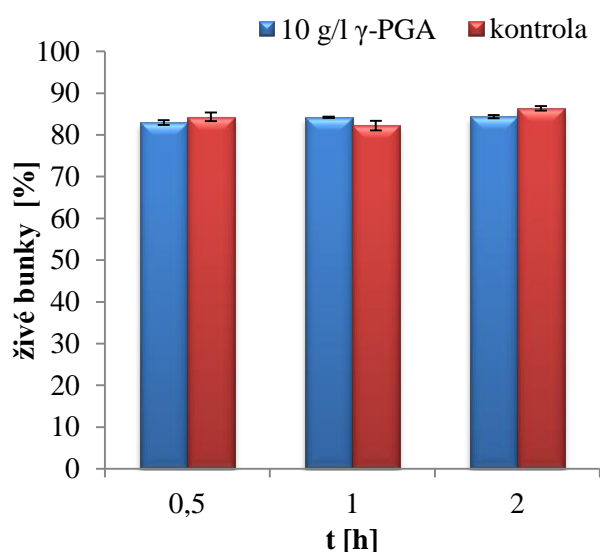
Obrázok 21: Vplyv γ -PGA na viabilitu *L. rhamnosus* pri pôsobení modelovej žalúdočnej šťavy v časových intervaloch



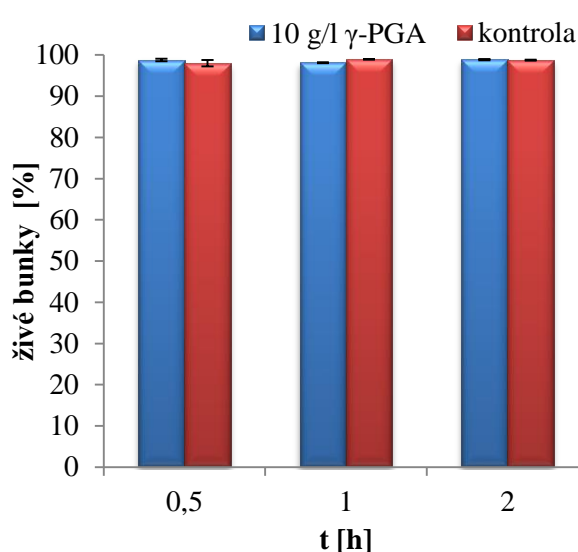
Obrázok 22: Vplyv γ -PGA na viabilitu *S. cerevisiae* pri pôsobení modelovej žalúdočnej šťavy v časových intervaloch

V štúdiu využívaný *L. rhamnosus* (Obrázok 21) bol intolerantný k žalúdočnej šťave. Už po 30 minútach jej expozície bola viabilita buniek nižšia než 10 %. Prídavok γ -PGA neprospeš na zvýšenie prežitia baktérie v kyslom prostredí.

Zaujímavé výsledky boli získané u *S. cerevisiae* (Obrázok 22), kedy mal γ -PGA o koncentrácii 10 g/l ochranný účinok na kvasinku vystavenú žalúdočnej šťave, pri jeho prídavku nedochádzalo k strate životaschopnosti ani po dvoch hodinách jej pôsobenia. Keďže kvasinky sú schopné rásť a prežiť v širšom rozsahu hodnôt pH ako baktérie, percentuálny úbytok živých buniek nebol tak výrazný ako u *L. rhamnosus*, s časom lineárne klesal [69].



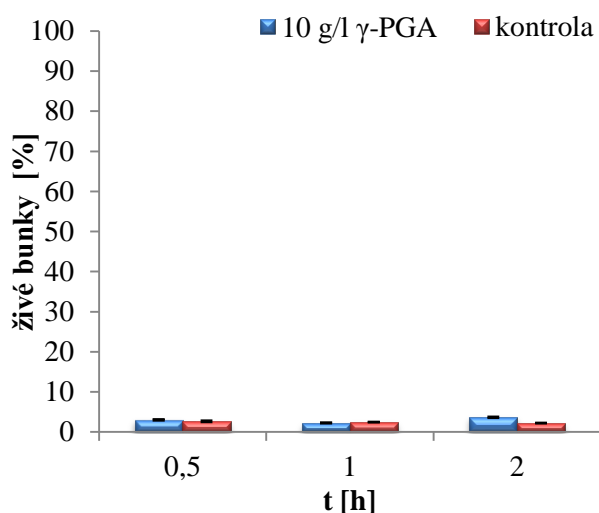
Obrázok 23: Vplyv γ -PGA na viabilitu *L. rhamnosus* pri pôsobení modelovej pankreatickej šťavy v časových intervaloch



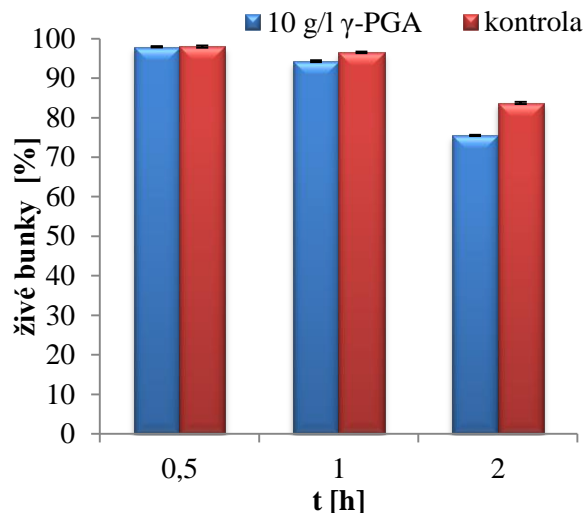
Obrázok 24: Vplyv γ -PGA na viabilitu *S. cerevisiae* pri pôsobení modelovej pankreatickej šťavy v časových intervaloch

U *L. rhamnosus* bolo percento živých buniek po všetkých testovaných časoch účinkovania pankreatickej šťavy nižšie než 85 a s časom sa neznížovalo. Obrázok 23 taktiež demonštruje, že γ -PGA nepreukázal ochranu pre bunky počas expozície pankreatickej šťavy.

Po vystavení *S. cerevisiae* pankreatickej šťave (Obrázok 24) sa neprejavil jej škodlivý vplyv na prežitie buniek ani po dvoch hodinách jej pôsobenia, a keďže pankreatická šťava nemala dosah na redukciu viability, nemožno hodnotiť či prídavok γ -PGA mal ochranný efekt na bunky.



Obrázok 25: Vplyv γ -PGA na viabilitu *L. rhamnosus* pri pôsobení modelovej žlčovej šťavy v časových intervaloch



Obrázok 26: Vplyv γ -PGA na viabilitu *S. cerevisiae* pri pôsobení modelovej žlčovej šťavy v časových intervaloch

Celková strata životaschopnosti bola zaznamenaná u *L. rhamnosus* už po 30 minútach pôsobenia modelovej žlčovej šťavy (Obrázok 25). γ -PGA nepodporil prežitie buniek baktérie pri vystavení tejto šťave.

Kvasinka bola naopak rezistentná voči žlčovej šťave a pri 30 minútach a jednej hodine nebol pozorovaná žiadna strata životaschopnosti (Obrázok 26). Mierna percentuálna strata živých buniek nastala až po dvoch hodinách. Podľa získaných výsledkov mal γ -PGA negatívny účinok na bunky kvasinky, v jeho prítomnosti o koncentrácii 10 g/l bolo po dvoch hodinách zanalyzovaných menej živých buniek oproti kontrole.

4.3 Príprava častíc

4.3.1 Príprava častíc z γ -PGA a alginátu

Pri štúdiu vplyvu γ -PGA na mikroorganizmy *L. rhamnosus* a *S. cerevisiae* pri pôsobení modelových tráviacich štiav (kapitola 4.2.5) polymér rozpustený v gastrointestinálnej šťave nemal vplyv na ich viabilitu, okrem expozície *S. cerevisiae* žalúdočnej šťave, pri ktorej sa vo vzorke s obsahom 10 g/l γ -PGA ani po dvoch hodinách neznižila životaschopnosť, zatiaľ čo vo vzorke bez polyméru životaschopnosť lineárne s časom klesala.

Výskumy ohľadom ochrany probiotických buniek pri žalúdočnej a žlčovej šťave však jasne ukazujú ochranu buniek pomocou γ -PGA. Bunky rozsuspendované v roztoku od 2,5% γ -PGA a následnej lyofilizácii sú pokryté vrstvou polyméru, ktorá ich chráni pred nízkym pH žalúdočnej šťavy a tiež vysokými koncentráciami žlčových solí [19; 43; 70].

Enkapsulácia druhov *Bifidobacteria* a *Lactobacillus* do alginátu zlepšuje ich prežitie počas skladovania v chladničke, avšak nespôsobuje výrazné zlepšenie ich prežitia pri vystavení silne kyslým prostrediam, akým je aj žalúdočná šťava [70].

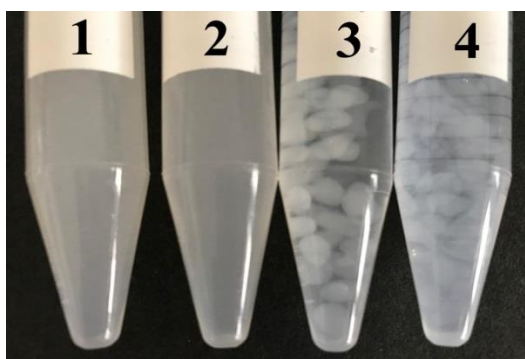
Pridanie γ -PGA k alginátu pri tvorbe častíc by mohlo zvýšiť účinnosť ochrany enkapsulovaných buniek pred gastrointestinálnymi šťavami.

4.3.1.1 Príprava alginátových, γ -PGA/alginát a γ -PGA častíc kvapkaním a ultrazvukom

Častice boli pripravené podľa postupu uvedeného v kapitole 3.6.1 kvapkaním roztokov 0,5% γ -PGA; 0,5% γ -PGA a 2% alginátu v pomere 1 : 1 a 1% alginátu do CaCl_2 . Časticiam pripraveným pomocou ultrazvuku bola zameraná ich veľkosť a zeta potenciál na prístroji Zetasizer Nano ZS postupom v 3.6.3.1.

Kvapkaním a tiež ultrazvukovým dispergovaním 0,5% roztoku γ -PGA do 2% CaCl_2 , vznikol číry roztok.

Častice pozostávajúce z 1% alginátu a tiež 0,5% γ -PGA a 2% alginátu v pomere 1 : 1 spôsobovali zakalenie CaCl_2 pri príprave ultrazvukom ako vidieť na Obrázok 27 a voľne okom pozorovateľné častice vznikali pri kvapkaní týchto roztokov do CaCl_2 . Častice zo zmesi γ -PGA a alginátu vykazovali iné zakalenie ako pripravené len z alginátu.



Obrázok 27: Pripravené častice z: (1) 0,5% γ -PGA s 2% alginátom ultrazvukom, (2) 1% alginátu ultrazvukom, (3) 0,5% γ -PGA s 2% alginátom kvapkaním, (4) 1% alginátu kvapkaním

PDI s hodnotami vyššími než 0,5 poukazujú na široké rozdelenie veľkosti častíc vzniknutých pomocou ultrazvuku (Tabuľka 15). Podľa hodnoty zeta potenciálu častice neboli veľmi stabilné a dochádzalo by k rýchlej agregácii [55].

Tabuľka 15: Častice pripravené ultrazvukom

vzorka	d [nm]	PDI	ZP [mV]
0,5 % PGA	1479,0	1	-6,56
0,5 % PGA : 2% alginát; 1 : 1	3692,3	1	-10,4
1 % alginát	4522,0	0,551	-6,66

4.3.1.2 Príprava častíc γ -PGA/alginát pomocou enkapsulátoru

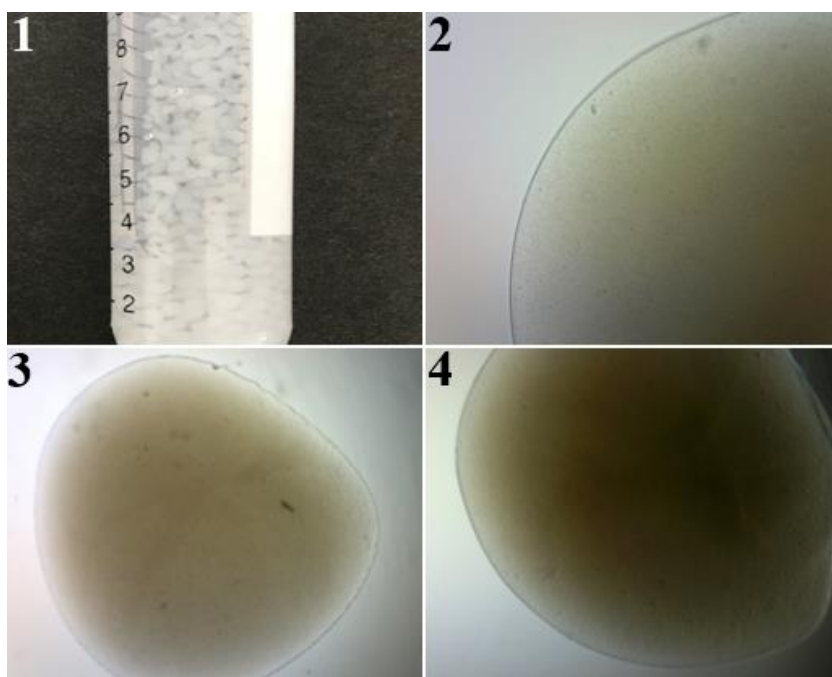
Častice γ -PGA/alginát boli pripravené aj pomocou enkapsulátoru Büchi B-395 Pro s tryskou o rozmere 450 μ m. Pripravené boli z roztokov 5% γ -PGA a 2% alginátu v pomere 1 : 1 a vytvrdené v roztoku CaCl_2 , po ktorom boli pozorované vo svetelnom mikroskope. Postup je uvedený v kapitole 3.6.2.

Na Obrázok 28 sú zobrazené pripravené perličky γ -PGA/alginát. Vo všeobecnosti platí, že priemer perličiek je dvojnásobkom priemeru použitej trysky, avšak ich veľkosť závisí aj od nastavených parametrov na enkapsulátore (rýchlosť toku a frekvencia vibrácií) [71].

Do perličiek o tomto zložení by mohli byť enkapsulované napríklad probiotické baktérie. Ich prečistené bunky by boli pred prípravou častíc rozsuspendované v zmesi polymérov γ -PGA/alginát [71].

Enkapsulované probiotické baktérie do γ -PGA/alginát periel by sa mohli pridať do potravín, kde by ich prítomnosť sensoricky neprekážala, ako cereálnych, ryžových alebo krupičných kaší.

Mechanizmus ochrany probiotických baktérii pri trávení by mohol byť nasledovný. Alginát a takisto aj γ -PGA sú polyméry reagujúce na pH. Zmršťujú sa v prostredí nízkeho pH (ako žalúdočná šťava pH 1,2), ale pri vyššom pH expandujú (črevo pH 6-6,5), čo vedie k uvoľneniu baktérie do cieľového miesta [72; 43].



Obrázok 28: Pripravené γ -PGA/alginát perly: (1) pozorované voľným okom, (2) zväčšenie $\times 10$, (3-4) zväčšenie $\times 4$

4.3.2 Príprava nanočastíc γ -PGA/chitosan

Chitosan (CS) je polysacharid získaný deacetyláciou prírodného chitínu a pre svoje výnimočné vlastnosti (netoxickosť, biokompatibilita a biodegradabilita) je takisto ako γ -PGA veľmi zaujímavým materiálom v odboroch biomedicína, kozmetika [73].

Nanočastice γ -PGA/CS sa všeobecne považujú za vhodné na podávanie biologicky aktívnych látok, ako napríklad proteínov a protizápalových liekov. Pri enkapsulácii týchto látok do polymérnych nanočastíc prostredníctvom iónových interakcií nie je potrebná povrchová modifikácia, organické rozpúšťadla alebo kovalentné spojenie medzi látkami a polymérom [25; 74].

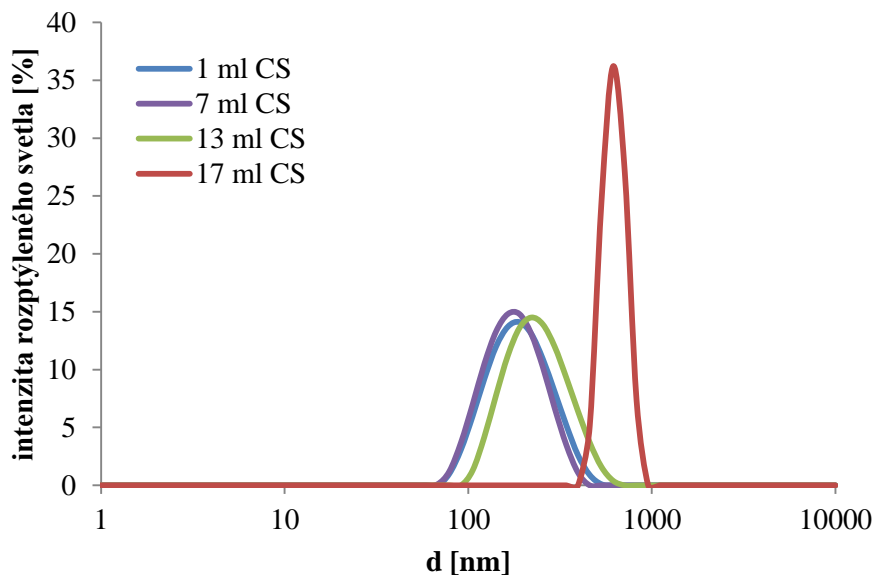
Samosporiadané nanočastice z γ -PGA a CS strednej molekulovej hmotnosti vzniknuté elektrostatickou interakciou medzi amino skupinami chitosanu a karboxylovými skupinami γ -PGA boli pripravené iónovou predgelačnou metódou navrhnutou Pereira a kol. [52]. Modifikovaný postup je uvedený v kapitole 3.6.3. K 100 ml 0,031% roztoku γ -PGA bol najskôr prídavaný 25 mmol/l CaCl_2 o objeme 10 ml, následne 0,07% roztok CS. Pri jednotlivých prídavkoch CS boli odoberané vzorky a bola zmeraná distribúcia veľkosti častíc (Obrázok 29), veľkosť a zeta potenciál vzniknutých nanočastíc γ -PGA/CS pomocou prístroja Zetasizer Nano ZS s postupom v 3.6.3.1.

Tabuľka 16: Veľkosť častíc, index polydisperzity a zeta potenciál nanočastíc γ -PGA/CS pri prídavkoch CS ku γ -PGA

prídavok CS [ml]	d [nm]	PDI	ZP [mV]
1	167,9	0,201	-17,1
3	185,6	0,141	-13,1
5	198,7	0,153	-11,9
7	190,2	0,148	-10,3
9	206,8	0,130	-13,8
11	199,3	0,114	-11,2
13	221,2	0,140	-10,4
15	365,9	0,333	-9,2
17	1370,5	0,664	-8,5

V Tabuľka 16 možno vidieť trend zvyšovania veľkosti častíc po prídavkoch CS a znižovanie hodnoty zeta potenciálu neutralizovaním nábojov opačne nabitých polymérov. PDI značí úzke rozdelenie veľkosti nanočastíc do 13 ml pridaného CS. Podľa hodnoty zeta potenciálu, ktorá nadobúdala menej než -30 mV neboli nanočastice γ -PGA/CS príliš stabilné a s časom by dochádzalo k ich agregácii. Do objemu 13 ml pridaného chitosanu bola veľkosť pripravených nanočastíc γ -PGA/CS približne 200 nm, po ďalších prídavkoch dochádzalo

k nárastu veľkosti nanočastíc a pri takmer 19 ml pridaného CS došlo k tvorbe bielej zrazeniny s veľkostnými parametrami nevhodnými pre meranie na prístroji Zetasizer Nano ZS [55].



Obrázok 29: Distribúcia veľkosti nanočastíc γ -PGA/CS podľa intenzity pri prídavkoch CS ku γ -PGA

Veľkosť, distribúcia veľkosti a taktiež zeta potenciál nanočastíc γ -PGA/CS závisí od koncentrácie polymérov a ich pomeru, ako aj na pH a poradí pridávania [24]. Jednotlivé parametre je možné takto jednoducho regulovať.

5 ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bola charakterizácia polyméru kyseliny glutámovej (γ -PGA) a štúdium jeho možných aplikácií.

Chemická štruktúra γ -PGA bola analyzovaná pomocou FT-IR spektroskopie technikou ATR. Na charakterizáciu bol γ -PGA podrobený termickej analýze zahŕňajúcej TGA a DSC. Hlavným zistením termickej analýzy bolo, že γ -PGA je stabilný pri teplotách používaných počas meraní tejto diplomovej práce, napríklad pri sterilizácii jeho roztokov a teplotnom strese mikroorganizmov. Molekulová hmotnosť γ -PGA bola zistená metódou SEC-MALS, pomocou ktorej boli stanovené hmotnostne a číselne stredné molekulové hmotnosti a index polydisperzity s hodnotou blízkou jednotke, čo značilo približne rovnako dlhé polymérne reťazce. Hodnota molekulovej hmotnosti γ -PGA sa pohybovala okolo 90 kDa. IEP γ -PGA bol stanovený pomocou automatickej titrácie roztoku polyméru titračným činidlom HCl. Okrem nadobudnutej hodnoty IEP pri hodnote pH 2,01 bol pri titrácii pozorovaný aj klesajúci Z-priemer veľkosti molekúl polyméru s klesajúcou hodnotou pH roztoku, spôsobený zmenou konformácie γ -PGA. Pred štúdiom aplikácií γ -PGA bola zisťovaná aj jeho kompatibilita s rozpúšťadlami. γ -PGA bol rozpúšťaný až do koncentrácie 75 g/l v rozpúšťadlách voda, voda : etanol 75 : 25, v glycín-HCl pufre, uhličitanovom pufre a fyziologickom roztoku. Pri rozpúšťadle etanol a voda s etanolom o pomere 25 : 75 nebol polymér rozpustený ani pri koncentrácii 1 g/l a pri vode s etanolom v pomere 50 : 50 sa γ -PGA nerozpúšťal od 10 g/l. Vlastnosti γ -PGA viazať ióny kovov boli potvrdené zrážaním pomocou roztoku $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. V experimentoch bol γ -PGA tiež zrážaný kationovým surfaktantom CTAB. Pomocou titračného experimentu bol zistený IEP systému γ -PGA-CTAB, ktorý bol dosiahnutý pri koncentrácii pridaného CTAB okolo hodnoty 4,52 mmol/l. Antimikrobiálna aktivita γ -PGA bola hodnotená na grampozitívne baktérie *M. luteus* a *S. epidermis*, u ktorých bola mierna antimikrobiálna schopnosť γ -PGA zaznamenaná od jeho koncentrácie 10 g/l, pričom sa od koncentrácie 20 g/l u *S. epidermis* ešte mierne navýšila. Na gramnegatívne baktérie *S. marcescens* a *E. coli* nemal γ -PGA antimikrobiálnu účinnosť.

Hlavnou experimentálnou štúdiou v diplomovej práci bolo určenie vplyvu γ -PGA o koncentrácii 10 g/l v pufre PBS na viabilitu prokaryota *L. rhamnosus* a eukaryota *S. cerevisiae* pri stresových podmienkach. Počet živých buniek vo vzorkách s prídavkom γ -PGA bol porovnávaný so vzorkami bez jeho prídavku. Pri strese s 10 a 15 obj. % etanolu počas 1 hodiny na *L. rhamnosus* bol prejavovaný ochranný účinok γ -PGA na túto baktériu. Pri rovnakom strese však boli zaznamenané opačné účinky na *S. cerevisiae*. Pri teplotnom strese s teplotami 50 °C a 70 °C počas 5 a 15 minút polymér ochránil bunky *L. rhamnosus* pri 50 °C, avšak pri teplote 70 °C stratila viabilitu väčšina jeho buniek. Teplota 50 °C kvasinku *S. cerevisiae* nestresovala, polymér ju neochránil pred 70 °C, kedy bunky stratili životaschopnosť už pri jej 5 minútovom pôsobení. Ďalším stresom bolo mrazenie pri -15 °C po dobu 1 hodiny a pri 3 cykloch mrazenia a následného rozmrazenia. Kryoprotektívny

účinok γ -PGA o koncentracii 10 a 15 g/l bol navyše porovnaný s kryoprotektantami sacharóza, glukóza a glycerol o koncentráciách 10 g/l. U kvasinky *S. cerevisiae* bolo pri prídavku γ -PGA po hodinovom mrazení a mrazení s 3 cyklami zaznamenané najvyššie percento živých buniek spomedzi všetkých použitých kryoprotektantov. Hoci u *L. rhamnosus* najvyššie percento zanalyzovaných živých buniek po týchto stresoch nebolo pri použití γ -PGA, stále ho možno označiť za úspešný kryoprotektant. Pri osmotickom strese s NaCl o koncentráciách 100 a 200 g/l po dobu 30 minút a 1 hodiny nebolo pozorované výrazné znižovanie viability u mikroorganizmov a taktiež ani efekt γ -PGA na viabilitu buniek. Posledným vykonaným stresom bolo pôsobenie modelových gastrointestinálnych štiav. Vzorky boli vystavené žalúdočnej, pankreatickej a žlčovej šťave na 30 minút, 1 a 2 hodiny. Najmenším stresom pre bunky bola pankreatická šťava. U *L. rhamnosus* dochádzalo pri pôsobení žalúdočnej a žlčovej šťavy už pri 30 minútach k strate viability majoritnej väčšiny buniek a pri pridaní γ -PGA sa neprejavil jeho ochranný efekt na bunky. Bunky kvasinky *S. cerevisiae* boli v porovnaní s *L. rhamnosus* zreteľne rezistentnejšie voči pôsobeniu modelových štiav. Ochrana kvasinky pomocou polyméru bola sledovaná pri pôsobení žalúdočnej šťavy. Bunky vo vzorke s γ -PGA si zachovali vysokú životaschopnosť aj pri 2 hodinovom pôsobení tejto šťavy, kým viabilita buniek kvasinky klesala vo vzorkách bez polyméru lineárne s časom jej pôsobenia.

Zlepšenie množstva živých buniek po expozícii gastrointestinálnymi šťavami by mohlo byť úspešné ich enkapsuláciou do γ -PGA/alginát periel, ktoré boli pripravené pomocou enkapsulátoru z 5% γ -PGA a 2% alginátu zmiešaných v rovnakom pomere. Samotný 0,5% γ -PGA okom viditeľné perličky pri kvapkaní ani dispergovaní ultrazvukom do CaCl_2 nevytváral. V experimentálnej časti boli kvapkaním a ultrazvukom tiež pripravené alginátové častice z 1% alginátu a častice z 0,5% γ -PGA : 2% alginát v pomere 1 : 1. Častice, ktoré boli pripravené ultrazvukom vykazovali široké rozdelenie ich veľkosti a pomerne nízku stabilitu hodnotenú z ich zeta potenciálu.

Boli pripravené aj nanočastice γ -PGA/chitosan iónovou predgelačnou metódou, do ktorých by mohli byť enkapsulované biologicky aktívne látky. Ich veľkosť nadobúdala hodnoty približne 200 nm. Z dôvodu ich stability vyhodnotenej zo zeta potenciálu by boli vhodné len na krátkodobé skladovanie.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] BUESCHER, Joerg a Argyrios MARGARITIS. Microbial Biosynthesis of Polyglutamic Acid Biopolymer and Applications in the Biopharmaceutical, Biomedical and Food Industries. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008, **27**(1), 1-19. DOI: 10.1080/07388550601166458. ISSN 0738-8551. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388550601166458>
- [2] OGUNLEYE, Adetoro, Victor IRORERE, Craig WILLIAMS, David HILL, Aditya BHAT a Iza RADECKA. Poly- γ -glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology*. 2015, **161**(1), 1-17. DOI: 10.1099/mic.0.081448-0. ISSN 1350-0872. Dostupné také z: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.081448-0>
- [3] NAJAR, I. a S. DAS. POLY-GLUTAMIC ACID (PGA) - STRUCTURE, SYNTHESIS, GENOMIC ORGANIZATION AND ITS APPLICATION: A REVIEW. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2015, **6**(6), 2258-2280. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(6).2258-80. ISSN 09758232.
- [4] LUO, Zhiting, Yuan GUO, Jidong LIU, Hua QIU, Mouming ZHAO, Wei ZOU a Shubo LI. Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, **9**(1), 1-12. DOI: 10.1186/s13068-016-0537-7. ISSN 1754-6834. 10.1186/s13068-016-0537-7. Dostupné také z: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-016-0537-7>
- [5] WANG, Q., X. WEI a S. CHEN. Production and Application of Poly- γ -glutamic Acid. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, 2017, , 693-717. DOI: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00030-0. ISBN 9780444636621. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444636621000300>
- [6] BAJAJ, Ishwar a Rekha SINGHAL. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*. 2011, **102**(10), 5551-5561. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.047. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241100232X>
- [7] SHIH, Ing-Lung a Yi-Tsong VAN. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*. 2001, **79**(3), 207-225. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00074-8. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852401000748>
- [8] SIRISANSANEEYAKUL, Sarote, Mingfeng CAO, Nuttawut KONGKLOM, Chaniga CHUENSANGJUN, Zhongping SHI a Yusuf CHISTI. Microbial production of poly- γ -glutamic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017, **33**(9), 1-8.

- DOI: 10.1007/s11274-017-2338-y. ISSN 0959-3993. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-017-2338-y>
- [9] MORAES, Luana, Priscila BRITO a Ranulfo ALEGRE. The Existing Studies on Biosynthesis of Poly(γ -glutamic acid) by Fermentation. *Food and Public Health*. 2013, **3**(1), 28-36. DOI: 10.5923/j.fph.20130301.04.
- [10] KONGKLOM, Nuttawut, Hongzhen LUO, Zhongping SHI, Chiravoot PECHYEN, Yusuf CHISTI a Sarote SIRISANSANEEYAKUL. Production of poly- γ -glutamic acid by glutamic acid-independent *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 using different feeding strategies. *Biochemical Engineering Journal*. 2015, **100**(2015), 67-75. DOI: 10.1016/j.bej.2015.04.007. ISSN 1369703x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X15001321>
- [11] HUANG, Jin, Yinming DU, Guohua XU, Huili ZHANG, Fan ZHU, Lei HUANG a Zhinan XU. High yield and cost-effective production of poly(γ -glutamic acid) with *Bacillus subtilis*. *Engineering in Life Sciences*. 2011, **11**(3), 291-297. DOI: 10.1002/elsc.201000133. ISSN 16180240. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elsc.201000133>
- [12] JU, Wan-Taek, Yong-Su SONG, Woo-Jin JUNG a Ro-Dong PARK. Enhanced production of poly- γ -glutamic acid by a newly-isolated *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*. 2014, **36**(11), 2319-2324. DOI: 10.1007/s10529-014-1613-3. ISSN 0141-5492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-014-1613-3>
- [13] JIANG, Feng, Gaofu QI, Zhixia JI, Shuling ZHANG, Jun LIU, Xin MA a Shouwen CHEN. Expression of *glr* gene encoding glutamate racemase in *Bacillus licheniformis* WX-02 and its regulatory effects on synthesis of poly- γ -glutamic acid. *Biotechnology Letters*. 2011, **33**(9), 1-4. DOI: 10.1007/s10529-011-0631-7. ISSN 0141-5492.
- [14] SUNG, Moon-Hee, Chung PARK, Chul-Joong KIM, Haryoung POO, Kenji SODA a Makoto ASHIUCHI. Natural and edible biopolymer poly- γ -glutamic acid: synthesis, production, and applications. *The Chemical Record*. 2005, **5**(6), 352-366. DOI: 10.1002/tcr.20061. ISSN 1527-8999. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tcr.20061>
- [15] CANDELA, Thomas a Agnes FOUET. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*. 2006, **60**(5), 1091-1098. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05179.x. ISSN 0950-382X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2958.2006.05179.x>
- [16] HO, Guan-Huei, Tong-Ing HO, Kuo-Huang HSIEH, Yuan-Chi SU, Pi-Yao LIN, Jeng YANG, Kun-Hsiang YANG a Shih-Ching YANG. γ -Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus Subtilis* (Natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2006, **53**(6),

- 1363-1384. DOI: 10.1002/jccs.200600182. ISSN 00094536. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jccs.200600182>
- [17] REGESTEIN NÉE MEISSNER, Lena, Julia ARNDT, Thomas PALMEN, Tim JESTEL, Hitoshi MITSUNAGA, Eiichiro FUKUSAKI a Jochen BÜCHS. Investigation of poly(γ -glutamic acid) production via online determination of viscosity and oxygen transfer rate in shake flasks. *Journal of Biological Engineering*. 2017, **11**(1), 1-16. DOI: 10.1186/s13036-017-0065-4. ISSN 1754-1611. Dostupné také z: <http://jbioleng.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13036-017-0065-4>
- [18] KUMARR, Mrithula, Janifer RAJ, Natarajan GOPALAN, Karna RAMANA a Rakesh SHARMA. Poly (γ -) Glutamic Acid: A Promising Biopolymer. *Defence Life Science Journal*. 2018, **3**(3), 301-306. DOI: 10.14429/dlsj.3.12192. ISSN 2456-0537. Dostupné také z: <https://publications.drdo.gov.in/ojs/index.php/dlsj/article/view/12192>
- [19] *Improved viability of probiotic microorganisms using poly - gamma- glutamic acid*. 2012. WO/2013/030596. Uděleno 7.03.2013. Zapsáno 31.08.2012.
- [20] MCLEAN, Robert, Diane BEAUCHEMIN, Lynann CLAPHAM a Terry BEVERIDGE. Metal-Binding Characteristics of the Gamma-Glutamyl Capsular Polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *Applied and environmental microbiology*. 1990, **56**(12), 3671–3677.
- [21] CHIVITE, Ainhoa. *Ionic complexes of biodegradable polyelectrolytes*. Barcelona, 2014. Dizertácia. Universitat Politècnica de Catalunya. Vedoucí práce Prof. Sebastián Muñoz Guerra.
- [22] STANLEY, Christopher a Helmut STREY. Osmotically Induced Helix-Coil Transition in Poly(Glutamic Acid). *Biophysical Journal* [online]. 2008, **94**(11), 4427-4434 [cit. 2018-11-07]. DOI: 10.1529/biophysj.107.122705. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349508700973>
- [23] WANG, Ling-Ling, Jian-Tao CHEN, Long-Fei WANG, Sha WU, Guang-zhao ZHANG, Han-Qing YU, Xiao-dong YE a Qing-Shan SHI. Conformations and molecular interactions of poly- γ -glutamic acid as a soluble microbial product in aqueous solutions. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 1-11. DOI: 10.1038/s41598-017-13152-2. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-13152-2>
- [24] AKAGI, Takami, Michiya MATSUSAKI a Mitsuru AKASHI. Pharmaceutical and Medical Applications of Poly-Gamma-Glutamic Acid. *Amino-acid homopolymers occurring in nature*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, s. 119-153. Microbiology monographs, v. 15. ISBN 978-3-642-12453-2.
- [25] PEREIRA, Catarina, Joana ANTUNES, Raquel GONÇALVES, Frederico FERREIRA-DA-SILVA a Mário BARBOSA. Biosynthesis of highly pure poly- γ -glutamic acid for

- biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2012, **23**(7), 1583-1591. DOI: 10.1007/s10856-012-4639-x. ISSN 0957-4530. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-012-4639-x>
- [26] RICHARD, Andrew a Argyrios MARGARITIS. Poly(glutamic Acid) for Biomedical Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008, **21**(4), 219-232. DOI: 10.1080/07388550108984171. ISSN 0738-8551. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07388550108984171>
- [27] KHALIL, Ibrahim, Alan BURNS, Iza RADECKA, Marek KOWALCZUK, Tamara KHALAF, Grazyna ADAMUS, Brian JOHNSTON a Martin KHECHARA. Bacterial-Derived Polymer Poly- γ -Glutamic Acid (γ -PGA)-Based Micro/Nanoparticles as a Delivery System for Antimicrobials and Other Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, **18**(2), 1-18. DOI: 10.3390/ijms18020313. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/2/313>
- [28] SONAJE, Kiran, Yi-Jia CHEN, Hsin-Lung CHEN et al. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(γ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*. 2010, **31**(12), 3384-3394. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.042. ISSN 01429612. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296121000058X>
- [29] HSU, Shan-Hui a Chen-Huan LIN. The properties of gelatin–poly (γ -glutamic acid) hydrogels as biological glues. *Biorheology*. 2007, **44**(1), 17-28.
- [30] BEN-ZUR, Natalie a Daniel M. GOLDMAN. Polyglutamic Acid: A Novel Peptide for Skin Care. *Cosmetics Toiletries*. 2007, **122**, 65-74.
- [31] YU-BO, Zhang, Li ZHENG, Hua JIA-CHUAN, Wang YAN-YANG, Qiao CHANG-SHENG a Zhang JIAN-FEI. Review in the biosynthesis and applications of polyglutamic acid. *BioTechnology: An Indian Journal*. 2014, **10**(24), 15184-15190.
- [32] *Hyaluronidase inhibitor containing poly-gamma-glutamic acid as an effective component*. 2005. United States. 12/090678. Uděleno 23.12.2014. Zapsáno 31.10.2005.
- [33] *Poly-gamma-glutamic acid-vitamin complex and use thereof*. 2005. WO/2006/001567. Uděleno 05.01.2006. Zapsáno 04.03.2005.
- [34] TANIMOTO, Hiroyuki. Food Applications of Poly-Gamma-Glutamic Acid. *Amino-acid homopolymers occurring in nature*. Berlin: Springer, 2010, s. 155-168. Microbiology monographs, v. 15. ISBN 978-3-642-12452-5.
- [35] TANIMOTO, Hiroyuki, Tom FOX, John EAGLES, Hitoshi SATOH, Hiroko NOZAWA, Atsushi OKIYAMA, Yasushi MORINAGA a Susan FAIRWEATHER-TAIT. Acute Effect of Poly- γ -Glutamic Acid on Calcium Absorption in Post-Menopausal Women. *Journal of the American College of Nutrition*. 2007, **26**(6), 645-

649. DOI: 10.1080/07315724.2007.10719642. ISSN 0731-5724. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2007.10719642>
- [36] SHYU, Yung-Shin a Wen-Chieh SUNG. Improving the emulsion stability of sponge cake by the addition of γ -polyglutamic acid. *Journal of Marine Science and Technology*. 2010, **18**(6), 895-900.
- [37] SHIH, Ing-Lung a Jane-Yil WU. Biosynthesis and Application of Poly(γ -glutamic acid). *Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives*. Wymondham: Caister Academic, 2009, s. 101-144. ISBN 978-1-904455-36-3.
- [38] *Gamma-polyglutamic acid (gamma-PGA, H Form) and gamma-polyglutamates for use as nutrition supplements in dietary products*. 2005. EP1723855A1. Uděleno 22.11.2006. Zapsáno 16.05.2005.
- [39] *Feed composition containing poly- γ -glutamic acid*. 1996. EP0826310A1. Uděleno 04.03.1998. Zapsáno 10.05.1996.
- [40] SHIH, Ing-Lung, Yi-Tsong VAN a Yi-Yuan SAU. Antifreeze activities of poly(γ -glutamic acid) produced by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*. 2003, **25**(20), 1709-1712. DOI: 10.1023/A:1026042302102. ISSN 01415492. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1026042302102>
- [41] MITSUIKI, Masata, Akinori MIZUNO, Hiroyuki TANIMOTO a Masao MOTOKI. Relationship between the Antifreeze Activities and the Chemical Structures of Oligo- and Poly(γ -glutamic acid)s. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, **46**(3), 891-895. DOI: 10.1021/jf970797m. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970797m>
- [42] BHAT, A.R., V.U. IRORERE, T. BARTLETT, D. HILL, G. KEDIA, D. CHARALAMPOPOULOS, S. NUALKAEKUL a I. RADECKA. Improving survival of probiotic bacteria using bacterial poly- γ -glutamic acid. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, 196, 24-31. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.031. ISSN 01681605. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160514005820>
- [43] ADEBAYO, Olajumoke. Evaluation of bacterial polymers as protective agents for sensitive probiotic bacteria. United Kingdom, 2018. *Dizertačná práca. University of Wolverhampton*.
- [44] LIM, Su-Min, Jungjee KIM, Jae-Yong SHIM, Bue-Young IMM, Moon-Hee SUNG a Jee-Young IMM. Effect of poly- γ -glutamic acids (PGA) on oil uptake and sensory quality in doughnuts. *Food Science and Biotechnology*. 2012, 21(1), 247-252. DOI: 10.1007/s10068-012-0032-2. ISSN 1226-7708. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-012-0032-2>

- [45] BAJAJ, Ishwar a Rekha SINGHAL. Flocculation Properties of Poly(γ -Glutamic Acid) Produced from *Bacillus subtilis* Isolate. *Food and Bioprocess Technology*. 2011, 4(5), 745-752. DOI: 10.1007/s11947-009-0186-y. ISSN 1935-5130. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-009-0186-y>
- [46] SHIH, I.L, Y.T VAN, L.C YEH, H.G LIN a Y.N CHANG. Production of a *biopolymer flocculant from Bacillus licheniformis* **and** its flocculation properties. *Bioresource Technology*. 2001, 78(3), 267-272. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00027-X. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085240100027X>
- [47] INBARAJ, Stephen, C.P. CHIU, G.H. HO, J. YANG a B.H. CHEN. Removal of cationic dyes from aqueous solution using an anionic poly- γ -glutamic acid-based adsorbent. *Journal of Hazardous Materials*. 2006, 137(1), 226-234. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2006.01.057. ISSN 03043894. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389406000835>
- [48] POTTER, M., F. OPPERMANN-SANIO a A. STEINBUCHHEL. Cultivation of Bacteria Producing Polyamino Acids with Liquid Manure as Carbon and Nitrogen Source. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67(2), 617-622. DOI: 10.1128/AEM.67.2.617-622.2001. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.67.2.617-622.2001>
- [49] HOPPENSACK, Astrid, Fred OPPERMANN-SANIO a Alexander STEINBUCHHEL. Conversion of the nitrogen content in liquid manure into biomass and polyglutamic acid by a newly isolated *strain of Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, 218(1), 39-45. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2003.tb11495.x. ISSN 03781097. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2003.tb11495.x>
- [50] YU, Xiang, Min WANG, Qun WANG a Xu WANG. Biosynthesis of Polyglutamic Acid and its Application on Agriculture. *Advanced Materials Research*. 2011, 183-185, 1219-1223. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.183-185.1219. ISSN 1662-8985. Dostupné také z: <https://www.scientific.net/AMR.183-185.1219>
- [51] ASHIUCHI, Makoto. Microbial production and chemical transformation of poly- γ -glutamate. *Microbial Biotechnology*. 2013, 6(6), 664-674. DOI: 10.1111/1751-7915.12072. ISSN 17517915. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12072>
- [52] PEREIRA, A.E.S., I.E. SANDOVAL-HERRERA, S.A. ZAVALA-BETANCOURT, H.C. OLIVEIRA, A.S. LEDEZMA-PÉREZ, J. ROMERO a L.F. FRACETO. γ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity. *Carbohydrate Polymers*.

- 2017, **157**, 1862–1873. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.11.073. ISSN 01448617. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861716313479>
- [53] STOKLASA, Karel. MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE I.: UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ, Fakulta technologická [online]. 2005 [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/939/mod_resource/content/2/Skripta_MMCH_I.pdf
- [54] KOLAFA, Jiří. Vybrané kapitoly z fyzikální chemie: Ústav Fyzikální chemie, VŠCHT Praha [online]. 2014 [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: https://ufch.vscht.cz/files/uzel/0013874/vybrane_kapitoly_fch.pdf?redirected
- [55] Zetasizer Nano Series User Manual: MAN0317 Issue 5.0. United Kingdom: © Malvern Instruments Ltd., 2009.
- [56] The use of poly-gamma-glutamic acid for preparing an agent for increasing the phosphorus assimilation. 1997. DE. 97117498.2 EP 0 838 160 A1. Uděleno 29.04.1998. Zapsáno 09.10.1997.
- [57] MANOCHA, Bhavik a Argyrios MARGARITIS. A novel Method for the selective recovery and purification of γ -polyglutamic acid from *Bacillus licheniformis* fermentation broth. *Biotechnology Progress*. 2010, 26(3), 734-742. DOI: 10.1002/btpr.370. ISSN 87567938. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.370>
- [58] GAMARRA, Ana, Antxon MARTÍNEZ DE ILARDUYA, Marc VIVES, Jordi MORATÓ a Sebastián MUÑOZ-GUERRA. Ionic complexes of poly(γ -glutamic acid) with alkyltrimethylphosphonium surfactants. *Polymer*. 2017, 116, 43-54. DOI: 10.1016/j.polymer.2017.03.065. ISSN 00323861. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386117303300>
- [59] BAKSHI, Mandeep a Shweta SACHAR. Surfactant polymer interactions between strongly interacting cationic surfactants and anionic polyelectrolytes from conductivity and turbidity measurements. *Colloid and Polymer Science*. 2004, 282(9), 993-999. DOI: 10.1007/s00396-003-1022-y. ISSN 0303-402X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00396-003-1022-y>
- [60] TSAO, Ching, Chih CHANG, Yu LIN, Ming WU, Jaw-Lin WANG, Jin HAN a Kuo HSIEH. Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan- γ -poly(glutamic acid) polyelectrolyte *complex* hydrogel. *Carbohydrate Research*. 2010, 345(12), 1774-1780. DOI: 10.1016/j.carres.2010.06.002. ISSN 00086215. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000862151000248X>
- [61] IJADI BAJESTANI, M., S.M. MOUSAVI, S.B. MOUSAVI, A. JAFARI a S.A. SHOJAOSADATI. Purification of extra cellular poly- γ -glutamic acid as an antibacterial agent *using* anion exchange chromatography. *International Journal of*

- Biological Macromolecules. 2018, 113, 142-149. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.082. ISSN 01418130. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017344471>
- [62] HUANG, Keng-Shiang, Chih-Hui YANG, Shu-Ling HUANG, Cheng-You CHEN, Yuan-Yi LU a Yung-Sheng LIN. Recent Advances in Antimicrobial Polymers: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17(9), 1-14. DOI: 10.3390/ijms17091578. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/9/1578>
- [63] CHEN, Ming-Ju, Hsin-Yu TANG a Ming-Lun CHIANG. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic *Lactobacillus kefirianofaciens* M1. *Food Microbiology*. 2017, 66, 20-27. DOI: 10.1016/j.fm.2017.03.020. ISSN 07400020. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074000201630956X>
- [64] PERIS, David, Roberto PÉREZ-TORRADO, Chris HITTINGER, Eladio BARRIO a Amparo QUEROL. On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *Yeast*. 2018, 35(1), 51-69. DOI: 10.1002/yea.3283. ISSN 0749503X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/yea.3283>
- [65] Flow Cytometry Protocol for Analysis of Cell Viability using Propidium Iodide [online]. b.r. [cit. 2019-02-26]. Dostupné z: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide>
- [66] VAN BOKHORST-VAN DE VEEN, Hermien, Tjakko ABEE, Marcel TEMPELAARS, Peter BRON, Michiel KLEEREBEZEM a Maria MARCO. Short- and Long-Term Adaptation to Ethanol Stress and Its Cross-Protective Consequences in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(15), 5247-5256. DOI: 10.1128/AEM.00515-11. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.00515-11>
- [67] FURDÍKOVÁ, Katarína, Fedor MALÍK a Dušan SLUGENĚ. Yeast and ethyl alcohol in viniculture. *Kvasny Prumysl*. 2009, 55(2), 42-45. DOI: 10.18832/kp2009006. ISSN 00235830. Dostupné také z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2009006.html>
- [68] CORCORAN, B., C. STANTON, G. FITZGERALD a R. ROSS. Life Under Stress: The Probiotic Stress Response and How it may be Manipulated. *Current Pharmaceutical Design*. 2008, 14(14), 1382-1399. DOI: 10.2174/138161208784480225. ISSN 13816128.
- [69] BEALES, N. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in*

Food Science and Food Safety. 2004, 3(1), 1-20. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x. ISSN 1541-4337. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>

- [70] BHAT, Aditya. Bacterial production of poly- γ -glutamic acid and evaluation of its effect on the viability of probiotic microorganisms. Spojené královstvo, 2012. Dizertačná práca. University of Wolverhampton.
- [71] Encapsulator B-390: Operation Manual. BÜCHI Labortechnik AG, 2016.
- [72] GUITING, Liu, Chen RONG, Zhang CONG, Chen XIA a Guo SHAOYUN. The pH-responsive alginate hydrogel prepared through solution extrusion and *the* release behavior for different drugs. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2016, 4. DOI: 10.3389/conf.FBIOE.2016.01.01760. ISSN 2296-4185. Dostupné také z: http://www.frontiersin.org/10.3389/conf.FBIOE.2016.01.01760/event_abstract
- [73] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. 2009, **103**(1), 56-65. ISSN 1213-7103.
- [74] KHALIL, Ibrahim, Martin KHECHARA, Sathishkumar KURUSAMY et al. Poly-Gamma-Glutamic Acid (γ -PGA)-Based Encapsulation of Adenovirus to Evade Neutralizing Antibodies. *Molecules*. 2018, 23(10), 2-19. DOI: 10.3390/molecules23102565. ISSN **1420-3049**.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

PGA	polymér kyseliny glutámovej
ATP	adenozíntrifosfát
Glu	kyselina glutámová
IEP	izoelektrický bod
CTAB	cetyltrimetylamóniumbromid
SEC-MALS	vylučovacia chromatografia s detektorom statického rozptylu svetla vo viac uhloch
TGA	termogravimetrická analýza
DSC	diferenčná skenovacia (kompenzačná) kalorimetria
FT-IR spektroskopia	infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
ATR	zoslabený úplný odraz
IEP	izoelektrický bod
CS	chitosan
ZP	zeta potenciál
PDI	index polydisperzity