

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

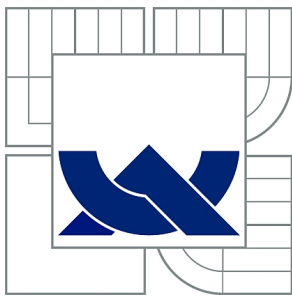
PRODUKCE EXTRACELULÁRNÍCH HYDROLÁZ POMOCÍ
SPECIFICKÝCH DRUHŮ PLÍSNÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

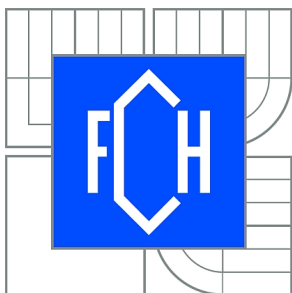
ZUZANA POKRÝVKOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PRODUKCE EXTRACELULÁRNÍCH HYDROLÁZ POMOCÍ SPECIFICKÝCH DRUHŮ PLÍSNÍ

PRODUCTION OF EXTRACELLULAR HYDROLASES BY SPECIFIC MOULD SPECIES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ZUZANA POKRÝVKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0895/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Zuzana Pokrývková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	
Konzultanti:	Ing. Iveta Kostovová	

Název bakalářské práce:

Produkce extracelulárních hydroláz pomocí specifických druhů plísní

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše zaměřená na charakterizaci buněčné stěny kvasinek a přehled vybraných extracelulárních plísňových hydroláz.
2. Zavedení a optimalizace metod kultivace kvasinek a plísně *Paecilomyces lilacinus*, stanovení aktivity vybraných hydroláz.
3. Experimentální studie - aplikace hydroláz z *P. lilacinus* při rozrušení buněčné stěny kvasinek.
4. Vyhodnocení výsledků a diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Zuzana Pokrývková
Student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

Abstrakt

Táto bakalárska práca je zameraná na štúdium možností produkcie extracelulárnych hydrolytických enzýmov plesňou *Penicillium lilacinum* na dvoch substrátoch. Teoretická časť práce je zameraná na charakterizáciu vybraných hydrolytických enzýmov, ich vlastnosti, možnosť produkcie a ich aplikácie.

V experimentálnej časti boli hydrolytické enzýmy produkované plesňou *Penicillium lilacinum* pri statickej kultivácii v minerálnom médiu a v médiu kde ako substrát boli použité kmene kvasiniek *Sporobolomyces roseus* a *Rhodotorula glutinis*.

V priebehu kultivácie bola sledovaná produkcia celulózy, amylázy, xylanázy, lipázy, proteázy a manázy a to vždy 3., 5., 8., 10. a 12. deň kultivácie.

Produkcia sa líši v závislosti na čase a použitom substráte. Amylázová, celulózová, xylanázová aktivita bola meraná v dvoch periódach - na začiatku kultivácie (3. až 5. deň) a na konci kultivácie. Zvyšné enzýmy boli detegované najmä v 8. až 10. deň kultivácie.

Tri najlepšie vzorky s najvyššou hodnotou enzýmových aktivít boli ďalej použité k testovaniu lyofilizácie a k purifikácii pomocou ultrafiltrácie. Enzýmy ďalej boli testované k rozbíjaniu bunkovej steny kvasiniek. V závere práce boli úspešne pripravené protoplasty kvasiniek *Rhodotorula glutinis* a *Sporobolomyces roseus*.

Kľúčová slova: extracelulárne hydrolytické enzýmy, *Penicillium lilacinum*, *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula glutinis*

Abstract

This bachelor's thesis is focused on studying the possibilities of producing extracellular hydrolytic enzymes by the fungus *Penicillium lilacinum* on two substrates. The theoretical part is focused on the characterization of selected hydrolytic enzymes, their characteristics, the possibilities of production and their applications.

In the experimental part the production of hydrolytic enzymes by the fungus *Penicillium lilacinum* was performed in mineral medium and in a medium wherein as substrate yeast strains *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis* were used.

During cultivation process, production of cellulases, amylases, xylanases, lipases, proteases, and mannases was monitored. Samples were taken on 3rd, 5th, 8th, 10th and 12th day of cultivation.

Production varies depending on time and substrate type. Amylase, cellulose and xylanase activity was measured in two steps - at the beginning of culture (3 to 5 day) and at the end of cultivation. The rest of enzymes were detected mainly in the 8th to 10th day of culture.

The best three samples with the highest value of enzyme activities were further used for lyophilization and purification by ultrafiltration. Further, enzymes were tested for disruption of yeast cell wall. In the conclusion, the yeast protoplasts of yeast strains *Rhodotorula glutinis* and *Sporobolomyces roseus* were prepared successfully.

Keywords: extracellular hydrolytic enzymes, *Penicillium lilacinum*, *Sporobolomyces roseus*, *Rhodotorula glutinis*

POKRÝVKOVÁ, Z. *Produkce extracelulárních hydroláz pomocí specifických druhů plisní*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 50 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc..

PREHLÁSENIE

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

.....
podpis študenta

Týmto by som chcela úprimne poďakovať svojej vedúcej bakalárskej práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. za jej odborné rady a Ing. Ivete Kostovovej za pomoc a veľkú ochotu pri vypracovávaní experimentálnej časti a celej mojej rodine a priateľovi Janovi Kubíkovi za veľkú podporu.

OBSAH

1 Úvod.....	8
2 TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1 Plesne	9
2.1.1 Morfológia	9
2.1.2 Rozmnožovanie.....	9
2.1.3 Rod <i>Penicillium</i>	10
2.1.4 Plesň <i>Penicillium lilacinum</i>	11
2.2 Karotenogénne kvasinky.....	11
2.2.1 Bunková stena kvasiniek.....	11
2.2.2 Významné metabolity	12
2.2.3 <i>Rhodotorula glutinis</i>	12
2.2.4 <i>Sporobolomyces roseus</i>	13
2.3 Spôsoby kultivácie	13
2.4 Enzýmy	14
2.4.1 Klasifikácia enzýmov.....	15
2.4.2 Použitie enzýmov v praxi.....	15
2.4.3 Použitie enzýmov pri rozrušení bunkovej steny kvasiniek	15
2.5 Vybrané hydrolytické enzýmy	15
2.5.1 Celulózy	16
2.5.2 Amylázy	16
2.5.3 Xylanázy	17
2.5.4 Proteázy.....	17
2.5.5 Lipázy.....	17
2.5.6 Manázy.....	18
2.6 Izolácia a purifikácia enzýmov	18
2.6.1 Membránové separačné procesy	18
2.6.2 Elektromigračné techniky	19
2.7 Uchovávanie a stabilizácia enzýmov	20
2.7.1 Lyofilizácia	20
3 CIEĽ PRÁCE	21
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	22
4.1 Mikrobiálne kmene, chemikálie a prístrojové vybavenie.....	22

4.1.1 Použité mikroorganizmy	22
4.1.2 Použité chemikálie	22
4.1.3 Prístroje a pomôcky	23
4.2 Kultivácia.....	24
4.2.1 Kultivácia plesne <i>Penicillium lilacinum</i>	24
4.2.2 Kultivácia karotenogénnych kvasiniek	25
4.3 Postupy pri stanovení enzýmových aktivít	26
4.3.1 Stanovenie proteolytickej aktivity	26
4.3.2 Stanovenie lipolytickej aktivity	26
4.3.3 Stanovenie celulázy.....	27
4.3.4 Stanovenie amylázy	27
4.3.5 Stanovenie xylanázy	28
4.3.6 Stanovenie manázy	28
4.4 Stanovenie extracelulárnych bielkovín.....	28
4.4.1 Zloženie činidiel.....	28
4.4.2 Stanovenie kalibračnej krivky.....	28
4.4.3 Stanovenie koncentrácie bielkovín	29
4.5 Izolácia a purifikácia enzýmov	29
4.5.1 Ultrafiltrácia	29
4.5.2 Vertikálna PAGE SDS elektroforéza	29
4.6 Príprava protoplastov	30
5 VÝSLEDKY a DISKUSIA.....	31
5.1 Stanovenie enzýmových aktivít.....	31
5.1.1 Stanovenie aktivity celulázy	31
5.1.2 Stanovenie aktivity amylázy	32
5.1.3 Stanovení aktivity xylanázy	33
5.1.4 Stanovenie aktivity lipázy.....	35
5.1.5 Stanovenie aktivity proteázy	36
5.1.6 Stanovenie aktivity manázy	37
5.2 Stanovenie koncentrácie extracelulárnych bielkovín	38
5.3 Uchovávanie a stabilizácia enzýmov	41
5.3.1 Zmena aktivity enzýmov pri lyofilizácií	42
5.4 Purifikácia a identifikácia enzýmov	42

5.4.1 Ultrafiltrácia	42
5.4.2 Elektroforéza PAGE-SDS	42
5.5 Príprava protoplastov použitím enzýmového preparátu	43
6 ZÁVERY.....	45
7 POUŽITÁ LITERATÚRA.....	46

1 ÚVOD

Výroba a spotreba enzýmov každoročne rastie. Medzi najvýznamnejšia a priemyselne najpoužívanejšie hydrolytické enzýmy patria proteázy, amylázy, celulózy či lipázy. Sú produkované celou radou plesní, baktérii a kvasiniek. Predovšetkým tieto mikrobiálne enzýmy sú komerčne využívané preparáty a majú širokú škálu využitia.

Plesne sú teda schopné za vhodných podmienok (pH, teplota, použitý substrát) produkovať mnohé enzýmy. V predloženej práci bude testovaná plesň *Penicillium lilacinum*, ktorá bola vybraná pre tvorbu hydrolytických enzýmov na substráte, ktorý tvoria „červené“ kvasinky. Názov dostali na základe produkcie karotenoidov. Karotenogénne kvasinky sa vyznačujú rigidnou bunkovou stenou menej zvyčajného zloženia, čo komplikuje izoláciu subcelulárnych štruktúr. Vďaka hydrolytickým enzýmom produkovaným plesňou, ktorá je schopná adaptovať sa na povrchové polyméry kvasiniek a využívať ich ako substrát, dochádza k postupnému rozštiepeniu bunkovej steny a možnej izolácii proteínov, karotenoidov či DNA.

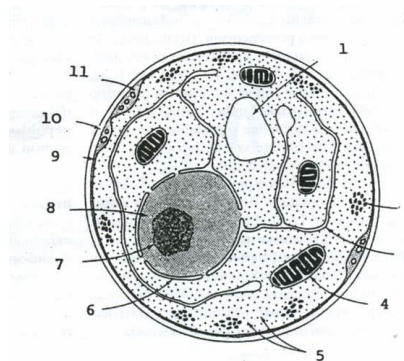
2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Plesne

Plesne sú mikroskopické vláknité eukaryotické mikroorganizmy, radiace sa medzi huby (Fungi) [1].

2.1.1 Morfológia

Bunka plesní má morfologicky diferencované jadro, vyskytujú sa v nej mitochondrie, Golgiho aparát, membránový systém endoplazmatického retikula. V cytoplazme sú prítomné inklúzie kryštalického aj lipidového charakteru. Zásobnou látkou u plesní rodu *Penicillium* a *Aspergillus* je glykogén, tuk, či manán a škrob. U starších buniek môžeme pozorovať takisto prítomnosť veľkého množstva vakuol [1].



Obrázok 1: Schéma bunky húb: 1) vakuola, 2) glykogén, 3) endoplazmatické retikulum, 4) mitochondrie, 5) ribozómy 6) jadrová membrána, 7) jadričko, 8) jadro, 9) lazmaléma, 10) bunková stena, 11) lomazómy [2]

Bunková stena je viacvrstvová aktívna organela, ktorá plní dôležité životné funkcie. Je tvorená lamelami, obsahuje polysacharidy, bielkoviny a lipidy, z polysacharidov dominuje chitín, prítomné sú aj glukány, manány a polysacharidy zložené z galaktozaminu. Ďalej obsahuje enzýmy, ktoré sa zúčastňujú metabolizmu (napr. syntetázy, hydrolázy) a enzýmy potrebné na degradáciu komplexov (napr. lipázy, proteázy). Prítomná môže byť celulóza a látky podobné lignínu, ktoré dodávajú pevnosť bunkovej stene. Stena hýf a konidií obsahuje vysoký obsah tukov a voskov, ktoré sú ochranou proti ich zmáčaniu. V stenách konidií sú prítomné farbivá, čím sú vysporulované časti pestro sfarbené. Farbivá majú ochrannú funkciu pred účinkami ultrafialového žiarenia. Kolónie tvoria hýfy, ktoré môžu byť septované (viacjadrové) alebo neseptované (jednojadrové). Spleť hýf vytvára mycélium. Na mycéliu vyrastajú sporofóry

2.1.2 Rozmnožovanie

Plesne sa vyskytujú v dvoch formách. Rozmnožujú sa pomocou spór alebo rozrastaním hýf. Nepohlavné štádium (anamorfa) je charakteristické mitotickým delením spór. V pohlavnom štádiu (telomorfa) vznikajú spóry meiózou. Holomorfoou označujeme jedince určitého druhu s jeho doteraz známym reprodukčným vybavením.

Pri nepohlavnom (vegetatívnom) rozmnožovaní vznikajú spóry. Nepohlavné sú endospóry (sporangiosóry) alebo exospóry. Z mycélia rastú hýfy sporangiofóry, na ktorých rastú

sporangia, v ktorých sú uložené endospóry. Najčastejšie ale vyrastajú exospóry na hýfach konidiofórach, nazývané konídie. Vznikajú odškrtením od materskej bunky. Konídie môžu byť buď makroskopické, ako je to v prípade rodu *Fusarium*, alebo mikroskopické, čo je typické pre rod *Aspergillus* a *Penicillium*. Konídie majú dva typy vzniku. Pri thalickom type vzniká z vytvorenej hýfy, ktorá sa rozdelí priehradkami a rozpadne sa, alebo blastický typ, pri ktorom konídie vznikajú zväčšovaním konečnej časti hýfy a po zväčšení dôjde k následnému oddeleniu od hýfy. Tento dej sa nazýva pučanie a vznikajú tak blastokonídie (blastospóry)

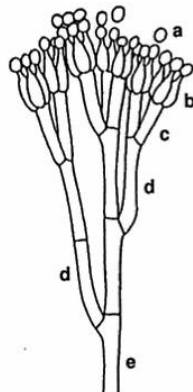
Pri pohlavnom rozmnožovaní dochádza k splývaniu obsahu plazmatických buniek (tzv. plazmogamii), k splývaniu jadier (karyogamii) a k meióze.

Prvým typom spór pri pohlavnom rozmnožovaní sú zygospóry. Vznikajú dotknutím hýf po gametangiogamii. Pri klíčení zygospóry dochádza k mitóze, 3 haploidné jadrá zaniknú, štvrté sa delí mitózou a zo zygospóry vyrastie sporangiofór.

Druhým typom sú askospóry a bazídiospóry. Tie sa tvoria z dotyku dvoch dvojjadrových hýf, následuje delenie diploidného jadra meiózou, čím vznikajú 4 haploidné karyogamie. Následne nastane mitotické delenie jadier a vznikne tak 8 askospór. Tie sa tvoria v tzv. asku (vrečku) [2,3, 4].

2.1.3 Rod *Penicillium*

Rod *Penicillium* sa radí do ríše Fungi (huby), oddelenia Ascomycota. Názov je odvodený z latinského slova *penicillus*, čo v preklade znamená štetec alebo kartáč. Dôvodom je tvorba štetičiek na konci konidiofóru. Tie sú usporiadané vo zväzkoch (metuloch), na ktorých sa tvoria taktiež zväzkovite usporiadané fialidy. Mycélium je septovné.



Obrázok 2: Morfológia plesne rodu *Penicillium* a) konídie, b) fialidy, c) metuly, d)vetvy, e)konidiofóry [3]

Tento rod obsahuje okolo 150 druhov, pričom najznámejšie sú *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium aurantiogriseum* a iné.

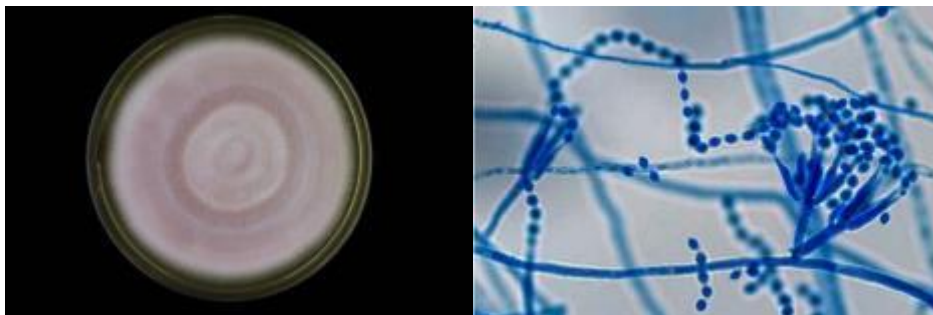
Produkujú zdraviu nebezpečné toxíny. Jedná sa hlavne o mykotoxíny patulin, citrinin, kyselinu penicilovú, či kyselinu mykofenolovú. Sú pôvodcami infekcii a alergických reakcií.

Vyskytujú sa v pôde, vo vode, na povrchu živých aj odumretých organizmov a na rôznych substrátoch s minimálnymi požiadavkami na živiny.

Plesne rodu *Penicillium* môžu produkovať enzým β -1,3-glukomanázu, enzým štiepiaci chemickú väzbu glukomannánov, ktoré tvoria hlavnú zložku bunkovej steny červených kvasiniek rodu *Rhodotorula* a *Rhodospordium* [5, 6]

2.1.4 Plesň *Penicillium lilacinum*

Jeden z najznámejších producentov enzýmov slúžiacich k rozbíjaniu bunkovej steny z rodu *Penicillium* je mikroorganizmus *Penicillium lilacinum*. Je to bunkový organizmus radiaci sa do oddelenia húb vreckovýtrusných (Ascomycota). Jeho alternatívne systematické názvy sú *Paecilomyces lilacinus*, *Purpureocillium lilacinum* a starší názov je *Penicillium amethystinum*. Kolónie na agare sú rýchlo rastúce a to až 25–35 mm za 7 dní pri 25 °C. Kolónie majú rôzne odtiene fialovej farby v dôsledku sporulácie. Z mycélia vyrastajú konidiofóry nesúce fialidy, na konci ktorých sa nachádzajú spóry uložené v retiazkach. Je študovaná najmä vďaka enzymatickej produkcii proteáz a chitináz. Je to všadeprítomná, vláknitá huba, bežne izolovaná z pôdy. Sú známe prípady infekcie u človeka. Najčastejším prejavom infekcie je keratitída. Môže kolonizovať lekárske materiály, či kontaminovať antiseptické krémy a pleťové vody [8,9].



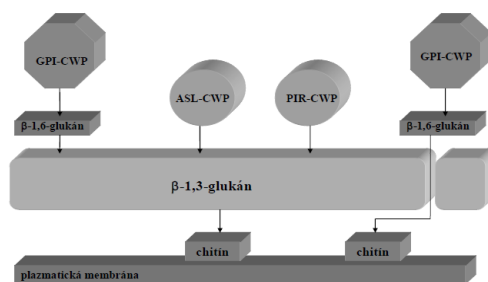
Obrázok 3: Makrohabitus a mikrohabitus plesne *Paecilomyces lilacinus* [7]

2.2 Karotenogénne kvasinky

Karotenoidné kvasinky produkujú karotenogénne pigmenty, ktoré sú priemyslovo využiteľné. *Rhodotorula glutinis* dokáže za určitých podmienok vyprodukovať 6-10 mg β -karoténu na 1 g sušiny buniek. Pigmenty tvoria na konci rastovej fáze. Sú taktiež lipidotvorné, čo úzko súvisí s produkciou lipáz. Majú striktno aeróbnny metabolizmus, nie sú schopné kvasných pochodov. Vyznačujú sa veľmi silnou bunkovou stenou, obsahujúcu glukomanány, ktorá znemožňuje izoláciu karotenoidov ani DNA [6].

2.2.1 Bunková stena kvasiniek

Natívna bunková sena je zložitý heterogénny polymér. Medzi základné zložky patrí glukán, manán, či lipidy. Niektoré zložky sú rozmiestnené nepravidelne a v závislosti od druhu kvasiniek sa vyskytujú v rôznych množstvách (napr. chitín sa vyskytuje najmä v oblasti jazvy po pučaní). Hrúbka závisí od rastových podmienok a genetického vybavenia bunky. Vnútoraná vrstva zabezpečuje najmä mechanickú odolnosť bunkovej steny. Je tvorená najmä β -1,3-glukánovej siete a chitínu. Glykolyzované manoproteíny sú lokalizované na vonkajšej strane bunkovej steny, kde zohrávajú úlohu pri rozpoznávaní buniek inou bunkou a obmedzuje priepustnosť cudzích degradačných enzýmov [10].



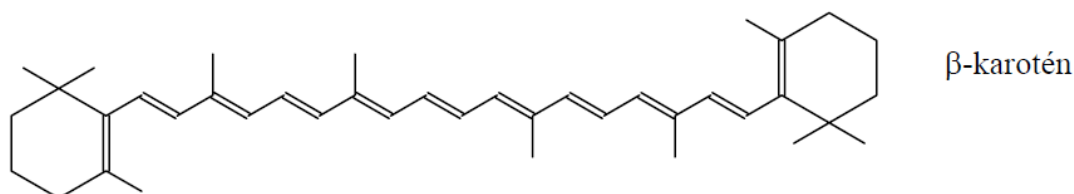
Obrázok 4: Schématické znázornenie bunkovej steny kvasiniek [10]

2.2.2 Významné metabolity

Medzi hlavné metabolity karotenogénnych kvasiniek patrí β -karotén a lipidy. Karotenoidy sú žlté a oranžové pigmenty baktérií, rias a rastlín s rôznym priemyselným využitím. Vykazujú radu pozitívnych aktivít založených na antioxidačných a antimutagénnych účinkoch a v procese videnia. Hrajú dôležitú fyziologickú funkciu. Pohlcujú krátke vlnové dĺžky škodlivého ultrafialového žiarenia, či inaktivujú reaktívnu formu kyslíka, čím pôsobia ako ochrana proti zhubným účinkom svetla.

Po chemickej stránke sú karotenoidy tetraterpény s ôsmimi izoprénovými jednotkami. Systém konjugovaných dvojitych väzieb je zodpovedný za farebnosť pigmentov. Karotenoidy sú odolné proti zmene pH, pôsobení redukčných činidiel. Vykazujú citlivosť k oxidácii a voči svetlu. Pri intenzívnejšom svetelnom žiarení sa rozkladajú.

Karotenogénne kvasinky oproti bežným kvasinkám obsahujú až 60% tuku v sušine. Lokalizované sú v cytoplazmatickej membráne. Pomocou vhodných rozpúšťadiel (petroléter) sú ľahko extrahované [6,12].



Obrázok 5: Štruktúra β -karoténu [11]

2.2.3 *Rhodotorula glutinis*

Rhodotorula sa radí medzi červené kvasinkové mikroorganizmy. Sú guľovitého alebo vajcovitého tvaru. Z hľadiska rozmnožovania ich radíme medzi bazidiomycéty. Rozmnožujú sa vegetatívne multilaterálnym alebo polárnym pučaním, môžu vytvárať pravé mycélium aj pseudomycélium. Tento druh obsahuje 24 rodov, produkuje kolónie, ktoré majú ružovú až červenú farbu v dôsledku prítomných karotenoidných farbív v agare. Karotenoidy sú lokalizované na vnútornej strane cytoplazmatickej membrány. Predstavujú vzdušnú kontamináciu vďaka prítomnosti týchto farbív, pretože ich chránia pred smrtiacim vplyvom UV slnečného žiarenia. Karotenoidy vznikajú zložitým biochemickým mechanizmom. Na svoj vznik potrebujú najmä svetlo a kyslík, tma pôsobí na vznik karotenoidov inhibične. Nefermentujú sacharidy a produkujú enzým ureázu. Sú lipidotvorné, s tým súvisí schopnosť produkovať lipázy. *Rhodotorula glutinis* obsahujú cca. 84 % neutrálnych lipidov, 13 % glykolipidov a 3 % fosfolipidov.

Mastné kyseliny neutrálnych lipidov zahŕňajú kyselinu olejovú, linolovú, stearovú, palmitovú, linolenovú, arachidonovú, behenóu, alinocerovú. Biomasa po extrakcii lipidov je zdrojom cenných proteínov a aminokyselín. Vytvárajú aj koenzýmy Q-10 a Q-9. Sú modelom na skúmanie transportu látok, a to predovšetkým pentóz cez cytoplazmatickú membránu. Kolónie tvoria mäkké, lesklé, hladké, vlhké až mukoidné. Vyznačujú sa rýchlym rastom na médiách a nie sú náročné na životné podmienky. Ľahko sa rozmnožujú aj v pôde bez prítomnosti dusíka. Sú tolerantné voči vysokému osmotickému tlaku, odolné voči kyslému prostrediu, nie sú však odolné voči vysokým teplotám, preto k devitalizácii vegetatívnych buniek kvasiniek dochádza už po krátkom zahriatí na 56 °C. Spóry sú o niečo rezistentnejšie. Rozmnožovanie väčšiny kvasiniek je úplne potlačené pri teplote 38 °C. Blastokonídiá sú jednobunkové, guľovitého tvaru, bez prítomnosti hýf. [13,14].



Obrázok 6: Náter rodu *Rhodotorula* [15]

2.2.4 *Sporobolomyces roseus*

Radí sa k červeným druhom kvasiniek v dôsledku tvorby karotenoidov. Tvar buniek je elipsoidný až pretiahnutý s rozmermi 3 až 8 x 5 až 18 μm . Kolónie sú drsné a zvrásnené, náter na agare je ružový až korálovočervený, v závislosti od zloženia živnej pôdy. V kvapaline sedimentujú a vytvárajú prstence. Patria do čeľade *Basidiomycetes* a vytvárajú balistokonídié na jednoduchých stopkách-sterigmách [15,16].



Obr.č. 1: Náter rodu *Sporobolomyces* [17]

2.3 Spôsoby kultivácie

Medzi najznámejšie druhy kultivácie patrí statická kultivácia, submerzná a kontinuálna.

Statická kultivácia prebieha v pokoji. Mikroorganizmy sú naočkované na povrch tuhého média, alebo do určitého objemu tekutého média, pričom postupne za statických podmienok dochádza k vyčerpaniu živín v priebehu rastu a hromadia sa splodiny metabolizmu, ktoré majú inhibičný vplyv.

Naopak, submerzná kultivácia prebieha za neustáleho pretrepávania živného média. Rast prebieha rýchlejšie a médium je prevzdušňované.

Pri kontinuálnej kultivácii dochádza k pritekaniu živín a otekaniu rovnakého objemu média s vyrastenými mikroorganizmami. Zvolením vhodnej rýchlosti prítoku možno dosiahnuť rovnovážny stav, keď v celom objeme živného média je udržiavaný konštantný počet buniek.

Z hľadiska nárokov mikroorganizmov na vzdušný kyslík rozdeľujeme kultivácie a aeróbne a anaeróbne.

Pri aeróbnej kultivácii mikroorganizmy využívajú vzdušný kyslík, ktorý sa dostáva do nádoby prirodzene. Závisí však od tvaru nádoby, či veľkosti styčnej plochy medzi povrchom nádoby a vzduchom.

Pri anaeróbnej kultivácii vzdušný kyslík pôsobí inhibične a je nutné tento kyslík z nádoby odstrániť a zamedziť jeho ďalší prísun (napr. odčerpaním vzduchu, vzduchotesným uzavretím)[18].

2.4 Enzýmy

Enzýmy sú látky bielkovinovej povahy s katalytickou funkciou. Nachádzajú sa vo všetkých živých systémoch. Aj najjednoduchšia bunka obsahuje okolo 3000 enzýmov, čo svedčí o ich špecificke, čo znamená, že každý enzým premieňa len určité látky. Okrem bielkovinovej časti môžu obsahovať aj nebielkovinovú časť označujúcu sa ako kofaktor. Ich hlavná funkcia tkvie v prenose atómov, ich skupín alebo elektrónov pri biochemických reakciách. Pevne viazaný kofaktor vytvára s bielkovinovou zložkou stabilnú súčasť molekuly a nazýva prostetická skupina. Ak je kofaktor viazaný slabými väzbami a ľahko sa oddelí, takýto kofaktor nazývame koenzým, pričom bielkovinová časť sa nazýva apoenzým.

Komplex koenzýmu a apoenzýmu sa označuje ako holoenzým. Enzýmová reakcia prebieha v určitej oblasti enzymatickej molekuly nazývanej aktívne centrum, majúca svojím tvarom a zložením afinitu k určitému substrátu. Substrát sa viaže van der Waalsovými silami, vodíkovými väzbami alebo hydrofóbnymi interakciami. Katalyzovaná reakcia môže prebiehať rôznou rýchlosťou. Závisí od koncentrácie substrátu, množstva enzýmu, prítomnosti efektorov, od fyzikálnych a chemických vlastností prostredia a to najmä pH a teploty. S rastúcou teplotou rastie aj rýchlosť katalyzovanej reakcie, dôjde ale k inaktivácii enzýmu v dôsledku denaturácie bielkovinovej časti a k prípadnému odštiepeniu kofaktoru.

Väčšina enzýmov pracuje len v určitej optimálnej oblasti pH. Na účinku sa podieľajú aj efektoři. Ak zvyšujú aktivity enzýmu, tieto látky označujeme ako aktivátory (ióny niektorých kovov, organické látky), naopak, ak znižujú účinok enzýmu, označujú sa ako inhibítory (ióny ťažkých kovov, organické a anorganické látky nízkomolekulovej povahy) [19,20].

2.4.1 Klasifikácia enzýmov

Podľa miesta pôsobenia ich môžeme rozdeliť na intracelulárne a extracelulárne. Intracelulárne vykonávajú svoje špecifické funkcie v mieste vzniku. Môžu sa nachádzať rozpustené, alebo ako funkčné komplexy, multienzymové jednotky a multifunkčné enzýmy.

Extracelulárne sú vyučované bunkami, ktoré ich vyrobili. Nájdeme ich v tkanivových kvapalinách, v krvi, v mozgovo miešnom moku. Mikroorganizmy ich vylučujú do kultivačného prostredia, kde katalyzujú hydrolýzu živín. Enzýmy môžeme rozdeliť do šiestich tried podľa reakcie, ktorú katalyzujú.

Oxidoreduktázy tvoria prvú a zároveň najpočetnejšiu triedu. Sú povahy zložených bielkovín. Redoxné deje sa realizujú prenosom atómov vodíka, elektrónov alebo včleňovaním atómov kyslíka do substrátu. Transferázy sa podieľajú na prenose skupín atómov v aktivovanej forme zo zlúčeniny, ktorá je ich donorom na akceptor. Hydrolázy štiepia hydrolytické väzby, ktoré vznikli kondenzáciou. Štvrtú triedu tvoria lyázy. Katalyzujú nehydrolytické štiepenie väzieb odštepovaním alebo vkladáním malých molekúl. Predposlednú triedu tvoria izomerázy. Zložené sú z jednoduchých bielkovín a funkcia spočíva vo vnútromolekulovom presune atómov a ich skupín. Poslednú triedu tvoria ligázy. Katalyzujú vznik energeticky náročných väzieb za súčasného rozkladu látky [19,20].

2.4.2 Použitie enzýmov v praxi

Výroba a spotreba enzýmov každoročne rastie. Medzi najvýznamnejšie a priemyselne najpoužívanejšie enzýmy patria proteázy, amylázy, celulózy či lipázy. Sú produkované celou radou plesní, baktérií a kvasiniek. Komerčné enzymové preparáty majú širokú škálu využitia. Takmer všetky vyššie vymenované enzýmy sa vo veľkom množstve spotrebúvajú pri výrobe biodetergentov, čo sú čistiace a pracie prostriedky. Ďalšími spotrebiteľmi sú potravinársky (pri výrobe piva, vína, syrov, atď.), textilný aj farmaceutický priemysel. Xylanázy sa využívajú v priemysle k beleniu dreva v papierenskom priemysle, pekárskom priemysle na zlepšenie textúry pečiva, či pri fermentačnom kompostovaní. Ďalej sa využívajú v potravinárstve ako prídavné látky pre extrakciu rastlinných olejov, kávy a škrobov. Manázy s amylázami sú používané predovšetkým ako prísady do krmív obsahujúcich sóju a kukuricu, pričom cieľom je zlepšenie príjmu živín a príbytok na váhe [21,22].

2.4.3 Použitie enzýmov pri rozrušení bunkovej steny kvasiniek

K rozrušeniu bunkovej steny kvasiniek sa najčastejšie používajú hydrolytické enzýmy amylázy, celulózy, xylanázy, proteázy, lipázy či manázy.

2.5 Vybrané hydrolytické enzýmy

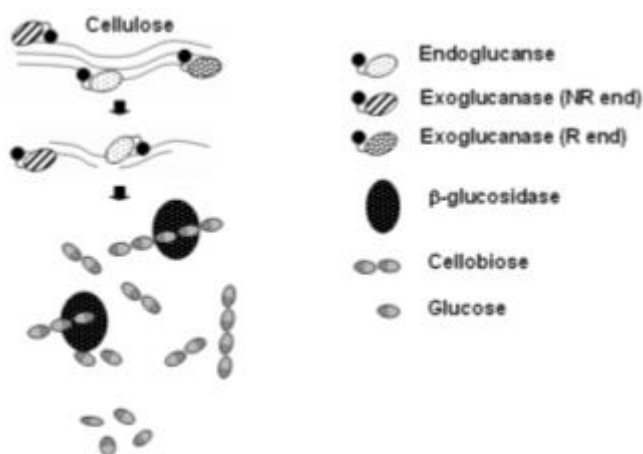
Hydrolytické enzýmy štiepenia hydrolytické väzby, ktoré vznikli kondenzáciou. Na podtriedy sa delia podľa typu štiepených väzieb. Sú najpočetnejšou skupinou enzýmov. Medzi hlavné podtriedy patria proteázy, glykozidázy (amylázy, celulózy, hemicelulózy...) a esterázy (pektinázy, lipázy...) [22].

2.5.1 Celulázy

Celulóza je štiepená komplexom extracelulárnych celulolytických enzýmov, zložených z endo-1,4- β -D-glukanázy, exo-1,4- β -D-glukanáz a β -glukozidázy, ktoré pôsobia synergicky. Celulolytické enzýmy patria do hydrolytického enzymatického systému. Tento hydrolytický systém produkuje enzýmy hydrolázy, ktoré sú zodpovedné za degradáciu celulózy a hemicelulózy[14].

Endo-1,4- β -D-glukanáza náhodne hydrolyzujú vnútorné β -(1 \rightarrow 4)-D-glykozidové väzby celulózoového reťazca. Týmto štiepením vznikajú glukooligosacharidy a celobióza. Medzi exo-1,4- β -D-glukanázy patria dva exogénne enzýmy: celobiohydroláza štiepiaca voľné konce molekúl celulózy, čím degraduje väzby β -(1 \rightarrow 4) od redukujúceho alebo neredukujúceho konca reťazca a exoglukanáza (glukohydroláza), ktorá odštiepuje glukózové jednotky z neredukujúceho konca reťazca.

Posledným celulolytickým enzýmom je β -D-glukozidáza (celobiáza), ktorá odštiepuje z parciálne hydrolyzovanej celulózy celobiózu a vyššie oligosacharidy hydrolyzuje na β -D-glukózu [24, 25, 26].



Obrázok 7: Mechanizmus celulázovej aktivity [23]

2.5.2 Amylázy

Skupina enzýmov štiepiacich škroby sa nazýva amyláza. V závislosti na type amylázy môžu byť tieto polysacharidy redukované až na jednoduché cukry ako je glukóza alebo fruktóza, prípadne na zložitejšie oligosacharidy ako je maltóza či osobitné formy škrobu, akým sú dextríny.

Existujú teda typy amylázy a to α , β a glukoamylázy. Alfa-amyláza je endocelulárny enzým, ktorý náhodne štiepi 1,4- α -D-glykosidové väzby vo vnútri molekuly, zatiaľ čo β -amyláza (β -1,4-glukan maltohydroláza) je exocelulárny enzým a pôsobí na vonkajšie reťazce z ktorých odštiepuje maltózu od neredukujúceho konca.

Glukoamyláza je exocelulárny hydrolytický enzým, ktorý štiepi postupne glukózové jednotky od neredukujúceho konca. Štiepi taktiež väzby 1,6- α -D vo vetvených polysacharidoch amylopektínu a glykogénu [22, 27, 28].

2.5.3 Xylanázy

Sú skupinou enzýmov, ktoré degradujú lineárny polysacharid β -1,4-xylán na xylózu, čím poškodia štruktúru hemicelulózy, jednej z hlavných zložiek rastlinných bunecných stien. Ako také hrajú významnú úlohu v mikroorganizmoch slúžiacich k degradácii rastlinnej hmoty. Xylanázy sú produkované širokým spektrom organizmov, ako sú napríklad kvasinky, hlavný komerčný zdroj sú však vláknité huby.

Na degradáciu xylánu sa vyžaduje kooperácia niekoľkých hydrolytických enzýmov a to: endo-(1 \rightarrow 4)- β -xylán 4-xylanohydroláza, endo-1,4-xylanáza, endo-1,4- β -xylanáza, β -1,4-xylanáza, endo-1,4- β -D-xylanáza, 1,4- β -xylán xylanohydroláza, β -xylanáza, β -1,4-xylán xylanohydroláza, β -D-xylanáza [29, 30,31].

2.5.4 Proteázy

Hlavnou úlohou týchto enzýmov je katalyzovať hydrolýzu peptidovej väzby bielkovinových substrátov. Katalyzujú hydrolýzu proteínov na peptidy a oligopeptidov na aminokyseliny. Enzymatická degradácia proteínov sa uskutočňuje na vonkajšej strane bunky, v dôsledku vysokej molekulovej hmotnosti proteínov. Zlúčeniny s nízkou molekulovou hmotnosťou (napr. aminokyseliny) môžu byť transportované špecifickými transportnými mechanizmami dovnútra buniek a tu môžu byť následne spracované. Proteázy môžeme rozdeliť do niekoľkých skupín. Exopeptidázy odštiepujú aminokyseliny z koncov proteínových reťazcov, endopeptidázy štiepia peptidické väzby vnútri proteínu.

Mikrobiálne protézy môžeme rozdeliť na bakteriálne a plesňové. Ďalej ich môžeme klasifikovať na základe aminokyseliny ktorú vyžadujú pre katalytickú funkciu, na základe optimálneho pH prostredia, na lokalizácii miesta štiepenia a iné. Vykazujú aj ďalšie aktivity ako je esterová, koagulačná, či transpeptidázová. Líšia sa však lokalizácií, fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami, špecifitou, mechanizmom pôsobenia i fyziologickými funkciami [22, 30,31].

2.5.5 Lipázy

Lipolytické enzýmy sú definované ako karboxylesterázy hydrolyzujúce acylglyceroly. Tie enzýmy, ktoré hydrolyzujú acylglyceroly s uhlíkatým reťazcom mastných kyselín kratším ako 10 uhlíkov, sú považované za esterázy alebo karboxylázy. Enzýmy, ktoré hydrolyzujú acylglyceroly s uhlíkatým reťazcom mastných kyselín s viac ako je 10 uhlíkov, sú označované ako lipázy alebo triacylglycerolacylhydrolázy. Produkcia lipáz je ovplyvnená množstvom faktorov, ako je teplota, pH, zdroj dusíku, uhlíku a lipidov, stres, a koncentrácia rozpusteného kyslíku a anorganických solí. Lipolytické enzýmy môžeme rozdeliť do troch skupín:

Prvá skupina sa označuje ako nešpecifická. Enzýmy uvoľňujú mastné kyseliny z každej z troch pozícií acylglycerolu a kompletne hydrolyzujú triacylglyceroly na mastné kyseliny a glycerol.

Druhá skupina lipolytických enzýmov je 1,3-špecifická. Mastné kyseliny sú uvoľnené z vonkajšej pozície triacylglycerolu a vznikajú tak 1,2-diacylglyceroly, 2,3-diacylglyceroly a 2- monoacylglyceroly za uvoľnenia mastných kyselín. Dlhou inkubáciou triacylglycerolu s 1,3-špecifickými lipázami dochádza k úplnej hydrolýze triacylglycerolov na mastné kyseliny a glycerol.

Tretiu skupinu tvoria lipolytické enzýmy, ktoré preferujú len určité mastné kyseliny [22, 30]

2.5.6 Manázy

Manán je druhá najpočetnejšia zložka hemicelulózy. Skladá sa z lineárneho reťazca

D-manózových zvyškov (lineárny manán) z kombinácie D-manózových a D-glukózových zvyškov spojených β -1,4 väzbami sa skladajú glukomanány. U väčšiny druhov rastlín môže byť reťazec manánu takisto tvorený α -1,6-D-galaktózovými zvyškami a tvoriť tak tzv. galaktomanán alebo galaktoglukomanán. Pričom galaktoglukomanán je hlavnou zložkou mäkkého dreva ihličnatých stromov. Hydrolýza galaktomanánu však vyžaduje kooperáciu niekoľkých glykozidových hydroláz, Tieto enzýmy sú rozdelené do rodín na základe sekvencie aminokyselín, štruktúrálnej a mechanickej podobnosti.

Medzi nimi, prvá endo- β -1,4-D-mannanáza je enzým, ktorý hrá kľúčovú úlohu v degradácii. Náhodne štiepi β -1,4-D väzby manánu, galaktomanánu i glukomanánu na krátke β -1,4-mannán-oligoméry. Druhým enzýmom štiepacím manán je 1,2-(1,3)- α -mannozidáza. Tento enzým štiepi (1 \rightarrow 2) a (1 \rightarrow 3) väzby v kvasinkových manánoch, za uvoľnenia manózy. Poslednou triedou enzýmu napomáhajúcou k hydrolýze sú 1,6- α -D-galaktozid galaktohydrolázy (α -galaktozidázy). Sú to enzýmy, ktorý štiepia väzby medzi manózou z galaktózou na postrannom reťazci, ktorý obsahuje predovšetkým oligoméry a polyméry [32,33, 34].

2.6 Izolácia a purifikácia enzýmov

Izolácia enzýmov sa uskutočňuje pri teplotách okolo 0-4°C. Pri vyšších teplotách hrozí nestabilita enzýmov. Čistením enzýmov sú odstránené nečistoty z proteínov, akými sú lipidy, sacharidy, nukleové kyseliny. Existuje niekoľko rôznych spôsobov čistenia. Medzi hlavné metódy patria elektroforetické metódy [35].

2.6.1 Membránové separačné procesy

Delenie zmesí prebieha na základe rozdielneho pohybu jednotlivých zložiek pri transporte rozhraním, ktorým je selektívne priepustná membrána. Hnacou silou je gradient chemických potenciálov. Membrány sú zhotovované z organických polymérov (celulóza a jej estery, polyamidy, teflón, methakrylát, polyuretán a iné). Medzi membránové procesy radíme dialýzu a elektrodialýzu, reverznú osmózu (hyperfiltrácia), ultrafiltráciu a mikrofiltráciu [35].

2.6.1.1 Ultrafiltrácia

Od klasickej filtrácie sa líši veľkosťou častíc, ktoré separujeme. Používa sa pre častice veľkosti 2 až 1000 nm (1 000 000 Da). Slúži k oddeľovaniu makromolekulárnych látok a koloidov z roztoku. Molekuly rozpúšťadla sú vplyvom zvýšeného tlaku tlačene cez membránu. Častice väčšie ako sú póry membránou neprechádzajú.

Ultrafiltrčné membrány sa skladajú z dvoch vrstiev. Z hornej veľmi úzkej vrstvy s pórnymi presne definovanými rozmermi a širšej spodnej vrstvy, ktorá má hubovitú štruktúru a má podpornú funkciu. Takto skonštruovaná membrána sa nazýva anizotropná membrána.

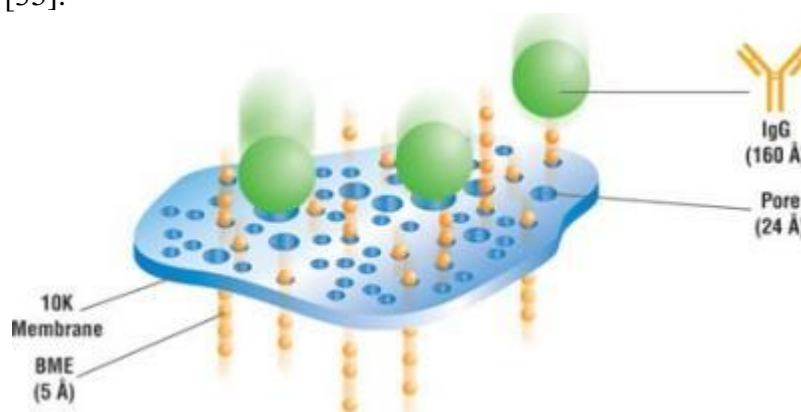
Membrány sú kategorizované podľa molekulovej hmotnosti molekúl, ktoré už membránou neprejdú.

Vyrábajú sa membrány polyamidové, polysulfónové , ktoré majú širokú oblasť pH. Dôvodom bol prevládajúcim materiálom acetát celulózy, ale jeho nevýhodou je nízka teplotná stabilita [35].

2.6.1.2 Dialýza

Dialýza je separačná technika, ktorá umožňuje odstránenie malých molekúl z roztoku makromolekúl (napr. odsolovanie). K deleniu dochádza na základe gradientu, ktorý je výsledkom náhodného tepelného pohybu molekúl, čo vedie k pohybu molekúl z oblasti vyššej koncentrácie, do oblasti nižšej koncentrácie, až do dosiahnutia rovnováhy. Separčné rozmedzie závisí na veľkosti pórov, či použitej membrány. Nízkomolekulárne látky prechádzajú cez semipermeabilnú membránu do dialyzátu, zatiaľ čo veľké molekuly ostávajú zachytené.

Rýchlosť prechodu molekúl membránou (z pôvodného roztoku do dialyzátu), je priamo úmerná koncentrácií a nepriamo úmerná molekulovej hmotnosti prechádzajúcich molekúl. V okamihu vyrovnania koncentrácie molekúl na oboch stranách, dochádza k zastaveniu prechodu membránou. Ako dialyzát je odporúčané použiť tlmivý roztok o nízkej iónovej sile s definovaným pH [35].



Obrázok 8: Princíp dialýzy [36]

Dialýza sa v laboratórnych podmienkach uskutočňuje v trubiciach, ktoré sa naplnia dialyzovaným roztokom a vložia do nádoby s premývacím roztokom, tzv. dialyzátom. Dialýza sa uskutočňuje väčšinou cez noc [35].

2.6.2 Elektromigračné techniky

Princípom separácie zložiek je migrácia nabitých častíc v jednosmernom elektrickom poli, ktoré sa vytvára vkladáním konštantného jednosmerného napätia medzi elektródy. Migrácia nabitých častíc je rozdielna, pretože častice rôznych zložiek sa v určitom prostredí líšia elektroforetickou pohyblivosťou. Vplyvom odlišnej rýchlosti sa vytvárajú oddelené zóny jednotlivých zložiek. Pri gélovej elektroforéze veľké molekuly ťažšie prechádzajú gélom oproti malým molekulám.

2.6.2.1 Elektroforéza PAGE-SDS

Nosičom PAGE-SDS chromatografie je polyakrylamidový gél. Vzniká polymerizáciou akrylamidu a N,N'-methylbisakrylamidu (BIS). Polymerizácia začína vznikom radikálov

z rozkladu persíranu amónneho, prípadne rozkladom riboflavínu pôsobením svetla za prítomnosti malého množstva kyslíku. Ako stabilizátor voľných radikálov sa pridáva TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamín).

Takto vzniknutý gél je inertný a mechanicky pevný. U týchto gélov je možné ovplyvniť veľkosť ich pórov, hustotu zasieťovania či gradient hustoty gélu.

Usporiadanie gélu môže byť v trubičkách, alebo medzi dvomi sklenenými doskami (v tzv. tenkej vrstve) [38, 40].

2.7 Uchovávanie a stabilizácia enzýmov

Zvýšenie stability enzýmov možno dosiahnuť rôznymi spôsobmi, napr. pridaním nízko- alebo vysokomolekulárnych látok do prostredia (najmä anorganických iónov), chemickou modifikáciou, vytvorením priečných väzieb pomocou funkčných činidiel, väzbou na polymérny nosič, či denaturáciou a spätným zvinutím molekuly.

Enzýmové preparáty sa uchovávajú pri nízkych teplotách. Zmrazovanie môže viesť k znehodnoteniu ich aktivity. Ďalšou možnou metódou pre uchovávanie enzýmových preparátov je ich sušenie, ktoré sa uskutočňuje na rozprašovacích sušiarňach pri teplotách, ktorých nedochádza k inaktivácii enzýmov. Najpoužívanejšia sušiacia metóda je v dnešnej dobe lyofilizácia [41].

2.7.1 Lyofilizácia

Jedná sa o finálnu úpravu enzýmových a bielkovinových preparátov, pričom dochádza k zakoncentrovaniu roztokov biologicky aktívnych látok, ktoré sú náchylné na vyššie teploty a nemôžu byť zakoncentrované klasickým spôsobom (napr. destiláciou). Pre odstránenie vody sa používa tzv. mrazová sublimácia. Roztok je zmrazený v tenkej vrstve a je vystavený hlbokému vákuu (1-3kPA). Dôjde k sublimácii vody a preparát ostane vo forme hygroskopického prášku. Pred zmrazením je nutné preparát zbaviť nečistôt, akými sú organické rozpúšťadla či soli, pretože znižujú teplotu tuhnutia vody a zvyšujú riziko roztopenia vzorky behom lyofilizácie a môže tak nastať denaturácia natívneho proteínu a tým strata enzýmovej aktivity [38].

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce je charakterizácia extracelulárnych hydroláz produkovaných plesňou *Paecilomyces lilacinus* (*Penicillium lilacinum*) a ich testovanie ako lytických činidiel k rozrušeniu bunkovej steny vybraných druhov kvasiniek. V práci boli riešené tieto čiastkové ciele:

- Rešerš zameraná na charakterizáciu bunkovej steny kvasiniek a prehľad vybraných extracelulárnych plesňových hydroláz.
- Zavedenie a optimalizácia metód kultivácie kvasiniek a plesne *Paecilomyces lilacinus*, stanovenie aktivity vybraných hydroláz.
- Experimentálne štúdie - aplikácia hydroláz z *P. lilacinus* pri rozrušení bunkovej steny kvasiniek.
- Vyhodnotenie výsledkov a diskusia

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Mikrobiálne kmene, chemikálie a prístrojové vybavenie

4.1.1 Použité mikroorganizmy

- Pleseň *Pencillium lilacinum* kmeň F-552 z Českej sbírky mikroorganizmů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.
- *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26, (CCY - Culture Collection of Yeasts, Chemický ústav SAV Bratislava, SR)
- *Sporobolomyces roseus* CCY 19-6-4

4.1.2 Použité chemikálie

Akrylamid, Lach-Ner (ČR)
Albumín, Sigma Aldrich (SRN)
Azokazein, Sigma Aldrich (SRN)
Bromfenolová modrá, Sigma Aldrich (SRN)
 β -merkaptóethanol, Sigma Aldrich (SRN)
Citronan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner (ČR)
Dodecylsírán sodný, (SDS), Lach-Ner (ČR)
Dusičnan sodný, Lach-Ner (ČR)
Ethanol (96%) p.a., Lach-Ner (ČR)
Folin-Ciocaltauovo činidlo, Lach-Ner (ČR)
Galaktomannan, Sigma Aldrich (SRN)
Glycerol, Sigma Aldrich (SRN)
Glycin, Sigma Aldrich (SRN)
Glukóza p.a., Lach-Ner (ČR)
Hydrogenuhlíčan sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Chlorid draselný p.a., Lach-Ner (ČR)
Jantaran sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Karboxymethylcelulóza, Sigma Aldrich (SRN)
Kyselina citrónová p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina chlorovodíková (35%) p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina octová p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina sírová (96%) p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina trichloroctová p.a., Sigma Aldrich (SRN)
Kvasničný autolyzát, Sigma Aldrich (SRN)
Methanol p.a., Sigma Aldrich (SRN)
Molybdenan amonný tetrahydrát p.a., Sigma Aldrich (SRN)
N,N'-metylenbisakrylamid (BIS), Sigma Aldrich (SRN)
N,N'-tetrametylendiamin (TEMED), Sigma Aldrich (SRN)

Octan amonný p.a., Lach-Ner (ČR)
p-nitrofenol, Sigma Aldrich (SRN)
p-nitrofenyl palmitát, Sigma Aldrich (SRN)
Persíran amonný (APS,) Sigma Aldrich (SRN)
Protein Dual Color BIORAD (USA)
Sacharóza, Lach-Ner (ČR)
Síran amonný p.a., Lach-Ner (ČR)
Síran horečnatý heptahydrát p.a. , Lach-Ner (ČR)
Síran med'natý pentahydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Síran sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Síran zinočnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Síran železnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Sorbitol p.a., Lach-Ner (ČR)
Škrob p.a., Lach-Ner (ČR)
Thiosíran sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Tris((Hydroxymethyl)aminomethan), Lach-Ner (ČR)
Triton X-100, Lach-Ner (ČR)
Uhličitan sodný, Lach-Ner (ČR)
Vínan sodno-draselný p.a., Lach-Ner (ČR)
Xylán p.a., Serva (SRN)
Xylóza p.a., Sigma Aldrich (SRN)

4.1.3 Prístroje a pomôcky

Spektrofotometer VIS, Helios δ (Unicam, UK)
Očkovací box Aura mini (Bioair Instruments, UK)
Vodná lázeň EL-20D Kavalier (ČR)
Ultrazvuková vaňa PS02000 (ČR)
Vortex, Ika Vortex genius 3 (SRN)
Analytické váhy BOECO (SRN)
Mikrocentrifúga Mikro 200 Hettich Zentrifugen (SRN)
Centrifúga U-32R Boeco (Germany)
Centrifúga Sigma Laborzentrifugen (SRN)
Termostatovaná trepačka, Heidolph Unimax 1010, Labicom s.r.o. (ČR)
Trepáčka Yellow line, (SRN)
Elektroforetická aparátúra, Mini-PROTEAN, BioRad (USA)
Elektroforetický zdroj
Termostat- Memmert INB 400 (SRN)
Lyofylizátor, Bench Top 4K ZL, VirTis
ELISA Reader BioTek ELx808
Bežné laboratórne sklo

4.2 Kultivácia

4.2.1 Kultivácia plesne *Penicillium lilacinum*

Doba kultivácie plesne *Penicillium lilacinum* bola stanovená z rastovej krivky na základe gravimetrického merania. Plesň bola kultivovaná na sacharózovom médiu a na médiu, kde sú použité karotenogénne kvasinky ako substrát. Kultivácia prebiehala pri 28 °C, v 50 ml média v Erlenmeyerovej banke o objeme 100 ml.

4.2.1.1 Substráty použité k produkcii enzýmov pomocou plesne *Penicillium lilacinum*

Plesň bola kultivovaná na minerálnom médiu, súčasne bola adaptovaná na substrát z kvasiniek SR a RG. Plesň na minerálnom médiu i obe adaptované formy boli ďalej použité na produkciu enzýmu, pri kultivácii na substrátoch z *Sporobolomyces roseus* a *Rhodotorula glutinis*. Pre kontrolu bola sledovaná aj plesň na minerálnom médiu.

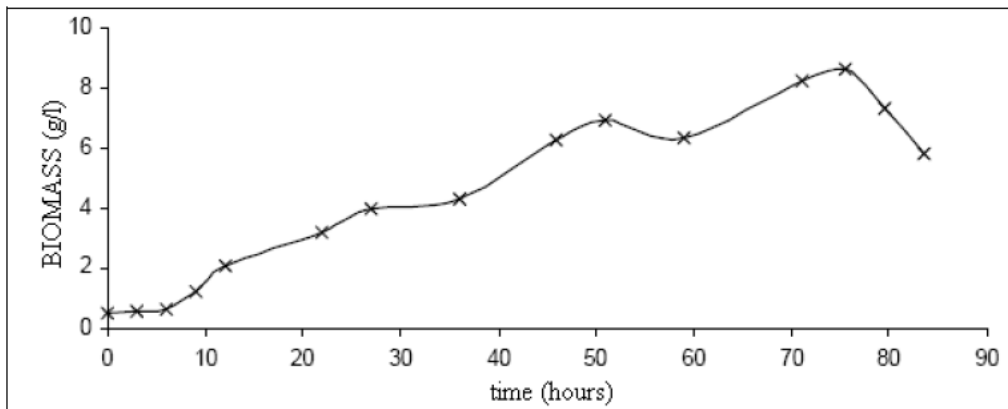
Tabuľka č. 1: Spôsob kultivácie plesne *Penicillium lilacinum* na substrátoch (SR – *Sporobolomyces roseus*, RG – *Rhodotorula glutinis*)

Inokulum	Zloženie použitého produkčných médií		
	1	2	3
Plesň na minerálnom médiu (MM)	MM	SR	RG
Plesň kultivovaná na RG	-	SR	RG
Plesň kultivovaná na SR	-	SR	RG

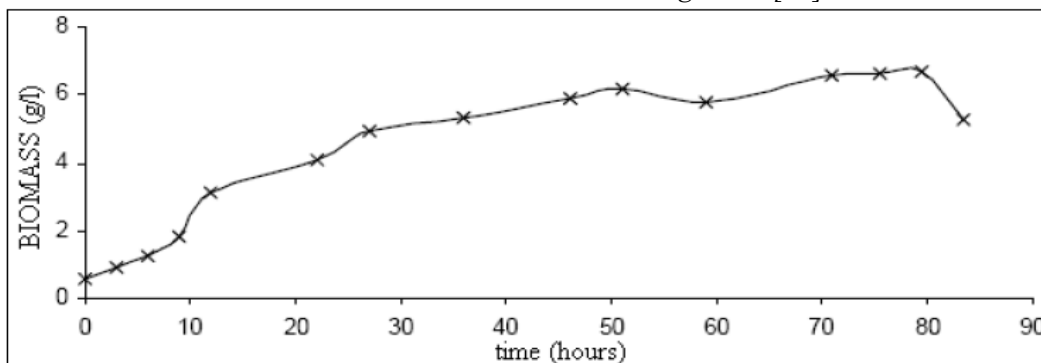
Tabuľka č. 2: Zloženie minerálneho média

Zložka	Množstvo
NaNO ₃	2 g
KCl	0,5 g
Fe SO ₄	0,01 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,5 g
Sacharóza	30 g
Voda	1000

Ako substrát pre produkciu enzýmu boli použité bunky kvasiniek RG a SR z 80. hodiny kultivácie na konci exponenciálnej fáze. Po skončení kultivácie boli bunky scentrifugované pri 5000 ot/ min po dobu 10 min a dvakrát premyté destilovanou vodou. Takto pripravené bunky boli použité ako substrát do produkčného média. Zloženie produkčného média bolo zhodné so zložením minerálneho média (Tabuľka č.4), ale z obsahom sacharózy 15 g/l a zvyšné množstvo sacharózy bolo nahradené v prípade RG 28 g/l buniek a v prípade SR 50 g/l buniek.



Obrázok 9: Rastová krivka *Rhodotorula glutinis* [42]



Obrázok 10: Rastová krivka *Sporobolomyces roseus* [42]

4.2.2 Kultivácia karotenogénnych kvasiniek

Karotenogénne kvasinky sa radia medzi mezofilné aeróbne mikroorganizmy, ktoré majú väčšinou podobné nároky na životné podmienky. Kmene kvasiniek *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* boli kultivované pri teplote 28 °C v tekutom médiu pri stálom svetle a trepaní. Média boli sterilizované v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút. Kultivácia týchto kmeňov prebiehala na glukózovom médiu.

Pre každý druh kvasiniek bolo pripravené jedno inokulum I o zložení uvedenom v tabuľke č.1. Vysterilované inokulum bolo zaočkované tromi očkami zásobnej kultúry uchovávané na Petriho miskách.

Pre každé inokulum I bolo pripravené kontrolné médium inokulum II. Médium č.2 bolo používané ako produkčné. Pasterizácia prebiehala v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 30 minút. Kultivácia na produkčnom médiu prebiehala po dobu 90 hodín.

Tabuľka č. 3: Zloženie inokula

zložka	množstvo
Glukóza	40 g
(NH ₄) ₂ SO ₂	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,696 g
Kvasničný autolyzát	7 g
Voda	1000 ml

Tabuľka č. 4: Zloženie produkčného média

zložka	množstvo
Glukóza	30 g
(NH ₄) ₂ SO ₂	4 g
KH ₂ PO ₄	4 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,696 g
Voda	1000 ml

4.3 Postupy pri stanovení enzýmových aktivít

Pri kultivácii plesne *Paecilomyces lilacinum* bola sledovaná enzýmová aktivita xylanázy, amylázy, proteázy, lipázy, celulózy a manázy v závislosti na dobe kultivácie.

Kultúry boli po kultivácii centrifugované a supernatant bol následne použitý k stanoveniu enzýmových aktivít.

4.3.1 Stanovenie proteolytickej aktivity

Pre stanovenie proteázovej aktivity bol ako substrát použitý roztok azokazeínu (5 mg/ml). Azokazeín je chemicky modifikovaný mliečny proteín kazeín s naviazanou oranžovou sulfanilamidovou skupinou. Enzymatickou hydrolýzou (50°C, 60 min) sa uvoľňujú farebné peptidy rozpustné v trichloroctovej kyseline, ktoré sú následne detegované pri 440 nm. Jednotka aktivity je definovaná ako množstvo enzýmu katalyzujúceho premenu substrátu do prevádzanú nárastom absorbancie o 0,001 za 1 minútu za podmienok testu.

4.3.2 Stanovenie lipolytickej aktivity

Stanovenie lipolytickej aktivity s využitím p-nitrofenylpalmitátu je založené na schopnosti lipolytických enzýmov štiepiť tento substrát za vzniku žltého sfarbeného produktu p-nitrofenolu, ktorý je stanovený spektrofotometricky pri 405 nm.

4.3.2.1 Stanovenie kalibračnej krivky p-nitrofenolu

Pre nameranie a zostrojenie kalibračnej krivky bol použitý základný roztok p-nitrofenolu o koncentracii 0,5 mmol/l. z tohto roztoku bola pripravená kalibračná rada p-nitrofenolu nariadením základného roztoku 0,1 M Tris-HCl pufrum pH 8,2 na koncentracie v rozmedzí 0,005 až 0,05 mmol/l. Skúmavky boli centrifugované 2 minúty a na spektrofotometri ELISA reader bola zmeraná absorbancia proti pufru pri $\lambda = 405$ nm.

4.3.2.2 Príprava substrátu

0,00675g p-nitrofenylpalmitátu spolu s 0,0085 g SDS a 0,5 g triton-X-100 bolo navážených do odmernej banky a na 50 ml doplnených destilovanou vodou. Roztok bol uchovávaný pri teplote 4°C najviac však 3 dni.

4.3.2.3 Stanovenie aktivity lipáz

Do plastových mikroskúmaviek bolo napipetovaných 83 μ l pufru pH 8,2, 83 μ l substrátu a 34 μ l supernatantu. Bol zmeraná nárast absorbancie pri 405 nm na zariadení ELISA reader

pri teplote 37°C po dobu 30 minút. Jednotka aktivity bola definovaná ako množstvo enzýmu katalyzujúce premenu substrátu za jednotku času.

4.3.3 Stanovenie celulózy

Aktivita celuláz bola stanovená metódou podľa Somogyiho a Nelsona. Ako substrát bol použitý prúžok papiera o veľkosti 0,5x1 cm. K substrátu bolo pridaných 50 µl vody, 50 µl supernatantu. Vzorky boli inkubované pri teplote 40°C po dobu 1 hodiny. Následne bolo pridaných 50 µl roztoku I a 50 µl roztoku II. Takto pripravené skúmavky boli ponorené do horúcej vodnej lázne po dobu 10 minút. Po 10 minútach bolo k ochladeným skúmavkám pridaných 50 µl ml roztoku III, obsah bol premiešaný do rozpustenia zrazeniny. K obsahu bolo pridaných 750 µl vody (celkový objem bol 1 ml) a následne bola zmeraná absorbanca pri 720 nm proti blanku, ktorý bol pripravený rovnako ako vzorky, ale supernatant bol nahradený 50 µl destilovanej vody. Aby mohlo byť odčítané množstvo glukózy uvoľnené zo substrátu od celkového množstva redukujúcich cukrov v supernatante, bolo prevedené paralelné meranie (tzv. referenčná vzorka), u ktorého neboli vzorky inkubované. Jednotka aktivity bola definovaná ako množstvo enzýmu katalyzujúce rozklad substrátu za jednotku času.

4.3.3.1 Príprava činidiel

Roztok I pozostával z 24 g bezvodého Na₂CO₃, 16 g NaHCO₃, 144 g bezvodého Na₂SO₄, 12 g vlnanu sodno-draselného a 800 ml destilovanej vody.

Roztok II pozostával zo 4 g CuSO₄ .5H₂O, 24 g bezvodého Na₂SO₄ a 200 ml destilovanej vody.

Roztok III pozostával z 25 g molybdenanu amonného rozpusteného v 450 ml destilovanej vody, 21 ml koncentrovanej H₂SO₄ a 3 g Na₂HASO₄.7H₂O rozpusteného v 25 ml destilovanej vody. Tento roztok musel 48 hodín stáť pri laboratórnej teplote bez prístupu svetla.

4.3.3.2 Stanovenie kalibračnej krivky glukózy

Pre zostrojenie kalibračnej krivky glukózy bol použitý základný roztok glukózy o koncentrácií 0,1 g/l. Z tohto roztoku bola pripravená kalibračná rada o koncentrácií 0,01 až 0,1 g/l. Do každej skúmavky bolo k 50 µl roztoku glukózy pridaných po 50 µl Somogyiho činidla I a II. Skúmavky boli 10 minút povarené a ochladené na laboratórnu teplotu. Následne bolo pridaných 50 µl Nelsonova činidla. Obsah skúmaviek bol doplnený 750 µl destilovanej vody na celkový objem 1 ml, premiešaný a následne bola na spektrofotometri zmeraná absorbanca pri vlnovej dĺžke 720 nm proti blanku (blank obsahoval namiesto vzorky 50 µl destilovanej vody).

4.3.4 Stanovenie amylázy

Aktivita amyláz bola stanovená metódou podľa Somogyiho a Nelsona. Postup je rovnaký ako stanovenie celulózy (kap. 3.3.3), ale namiesto papiera a 50 µl vody bol použitý 1% roztok škrobu. Roztok škrobu bol pred použitím povarený.

4.3.5 Stanovenie xylanázy

Aktivita xylanáz bola stanovená metódou podľa Somogyiho a Nelsona. Postup je rovnaký ako stanovenie celulózy (kap. 3.3.3), ale namiesto papiera a 50 μ l vody bol použitý 1% roztokom xylánu. Roztok xylánu bol pred použitím povarený.

4.3.5.1 Stanovenie kalibračnej krivky xylózy

Pre zostrojene kalibračnej krivky bol použitý základný roztok xylózy o koncentrácií 0,1 g/l. Z tohto roztoku bola pripravená kalibračná rada o koncentrácií 0,01 až 0,1 g/l. Ďalší postup je zhodný s prípravou kalibračnej krivky glukózy (kap. 3.3.3.2).

4.3.6 Stanovenie manázy

Pre stanovenie manázovej aktivity bol ako substrát použitý značený galaktomanan. Na každých 30 monomérov pripadá jedna molekula farbiva Remazol Brilliant Blue R. V 80 ml horúcej destilovanej vody (85-90°C) boli rozpustené 2 g substrátu. Po ochladení roztoku na laboratórnu teplotu, bolo pridaných 10 ml 2 M acetátového pufru (pH 4) a objem bol doplnený na 100 ml. Takto pripravený roztok bol skladovaný pri 4 °C.

Enzymatickou hydrolýzou dochádza k depolymerizácii galaktomananu za uvoľňovania farebných nízkomolekulárnych značených fragmentov rozpustných v acetátovom pufre.

Do skúmaviek bolo napipetovaných 250 μ l galaktomananu, 250 μ l supernatantu. Hydrolýza prebiehala po dobu 10 min pri 40 °C. Po uplynutí doby bolo pridaných 1,3 ml etanolu a skúmavky stáli 10 minút pri laboratórnej teplote. Následne boli scentrifugované pri 7200 ot/min po dobu 10 minút. Aktivita enzýmu bola detegovaná meraním absorbancie pri 590 nm.

V prípade blanku bol ethanol pridaný spolu so substrátom a galaktomananom pred inkubáciou.

Jednotka aktivity bola definovaná nárastom absorbancie v čase.

4.4 Stanovenie extracelulárnych bielkovín

Stanovenie koncentrácie proteínov metódou podľa Hartree-Lowryho je kolorimetrické, založené na dvojjložkovom činidle. Prvou zložkou je biuretové činidlo, druhú zložku tvorí Folinovo činidlo na fenoly. Princípom je redukcia fosfomolybdénanov hydroxyfenolovou skupinou tyrozínu na molybdenovú modrú [43].

4.4.1 Zloženie činidiel

Roztok a (na 100 ml): 1g vlnan sodno-draselný . 4 H₂O, 10 g Na₂CO₃, 50 ml 1M NaOH, destilovaná voda.

Roztok B (na 100ml) : 2g vlnan sodno-draselný . 4 H₂O, 1g CuSO₄ . 5 H₂O, 10 ml 1M NaOH

Roztok C: Folin-Ciocalteauvo činidlo: destilovaná voda (1:16)

4.4.2 Stanovenie kalibračnej krivky

Pre zostrojenie kalibračnej krivky bol použitý roztok albumínu, z ktorého bola pripravená kalibračná rada o koncentrácií 0,05 až 0,3 mg/ml.

Do každej skúmavky bolo k 1 ml vzorky pridaných 0,9 ml HL činidla A, roztok bol premiešaný a následne inkubovaný vo vodnej lázni pri 50 °C po dobu 10 minút. Potom bol

roztok ochladený na laboratórnu teplotu a bolo pridaných 0,1 ml HL činidla B. Roztok bol opäť premiešaný a stál 10 minút pri laboratórnej teplote. Nakoniec boli pridané 3 ml HL činidla C, roztok bol premiešaný a inkubovaný 10 minút pri 50 °C.

Spektrofotometrické stanovenie sa uskutočňuje pri vlnovej dĺžke $\lambda = 650$ nm oproti slepej vzorke, ktorú tvorila destilovaná voda.

4.4.3 Stanovenie koncentrácie bielkovín

Koncentrácia extracelulárnych bielkovín bola stanovená metódou podľa Hartree-Lowryho. Do skúmavky bolo k 1 ml supernatantu pridaných 0,9 ml roztoku A, skúmavky boli temperované po dobu 10 minút pri 50°C vo vodnej lázni. Následne boli skúmavky ochladené a bolo pridaných 0,1 ml roztoku B a nasledovala inkubácia pri laboratórnej teplote 10 minút. Po uplynutí času boli pridané 3 ml roztoku C a skúmavky opäť boli temperované po dobu 10 minút vo vodnej lázni pri 50°C. Nakoniec bola zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 650 nm proti blanku, kde bol supernatant nahradený destilovanou vodou [38].

4.5 Izolácia a purifikácia enzýmov

4.5.1 Ultrafiltrácia

K ultrifiltrácií bol použitý supernatant plesne kultivovanej na minerálnom médiu, odobratý 12. deň kultivácie. Bol filtrovaný cez ultrafiltračnú membránu o veľkosti pórov 10 kDa. Roztok bol desaťkrát zakoncentrovaný. Boli stanovené koncentrácie enzýmov v pôvodnom roztoku, po ultrafiltrácií a vo filtráte, ktorý prešiel cez membránu.

4.5.2 Vertikálna PAGE SDS elektroforéza

K vertikálnej elektroforetickej separácii proteínov bola použitá aparatúra od firmy BIORAD. Ako nosič bol použitý polyakrylamidový gél.

4.5.2.1 Roztoky

Elektródový pufo – 3 g Tris + 14,4 g glycin + 1 g SDS do 1 l redestilovanej vody

Iniciačné činidlo – 100 mg APS (persíran amónny) do 1 ml redestilovanej vody (vždy čerstvý)

Separáčny (deliaci) pufo pH 8,8 – 18,2 g Tris + 2,8 ml 32% HCl do 100 ml redestilovanej vody

Vzorkovací pufo – 5 ml glycerolu + 1 g SDS + 2,56 ml β -merkaptóetanolu + 2,13 ml zaostrovacieho pufru + cca 1 mg brómfenolovej modrej doplniť na objem 10 ml redestilovanou vodou

Zaostrovací pufo – 6,1 g Tris + 2,5 ml 32% HCl do 100 ml redestilovanej vody

Zásobný roztok AA/BIS (29:1) – 40% AA : 3,3% BIS

4.5.2.2 Príprava polyakrylamidového gélu

Pre elektroforézu enzýmových vzoriek bol použitý 14% gél. Do kadičky (na 10 ml) bolo napipetovaných 4,7 ml zásobného roztoku AA/BIS, 2,5 ml separačného pufru 2,7 ml redestilovanej vody a 0,1 ml 10% SDS, 8 μ l TEMED a 100 μ l APS. Zmes na gél bola opatrne zamiešaná a napipetovaná do priestoru medzi dve skla v nalievacom stojane. Medzi sklá bol

vložený plastový hrebeň pre vytvorenie jamiek pre nanášanie vzoriek. Gél bol ponechaný polymerizovať po dobu jednej hodiny.

4.5.2.3 Príprava vzoriek

Vzorky boli zmiešané so vzorkovacím pufrom v pomere 1 : 1 a povarené po dobu 4 minút na vodnej lázni. Po nanesení do jamiek gélu boli vzorky uchované pre ďalšie použitie pri – 20°C.

4.5.2.4 Prevedenie elektroforézy

Po stuhnutí gélu bol odstránený plastový hrebeň a skla s gélom boli upevnené do aparatury tak, aby nevytekal elektródový pufor z elektródového priestoru. Následne bol naliaty elektródový pufor. Vzorky spolu so štandardom boli nanesené do jamiek v množstve 25 µl. Ako štandard pre odčítanie veľkosti bol použitý štandard Protein Dual Color od firmy BIORAD. Aparatúra bola prikrytá priehľadným krytom, utesnená a pripojená ku zdroji napätia, prúd 300 mA, napätie 140 V podobu 2 hodín. Farbenie bolo vykonané pomocou Coomassie Brilliant Blue G250.

4.6 Príprava protoplastov

Na prípravu protoplastov bol použitý pripravený preparát po ultrafiltrácii, ktorý ako jediný vykazoval manázovú aktivitu.

Na prípravu protoplastov bola použitá 24 hodinová kultúra kvasiniek *Rhodotorula glutinis* a *Sporobolomyces roseus*. Kvasinky boli centrifugované pri 5000 ot/min po dobu 10 minút a dva krát premyté destilovanou vodou.

Bol pripravený TE pufor: do 200 ml odmernej banky bolo navážených 0,744 g EDTA a 2,423 g TRIS a banka bola po značku doplnená destilovanou vodou.

Do 100 ml TE pufu bolo navážených 18,217 g sorbitolu a pridaná kultúra scentrifugovaných kvasiniek.

K 1 ml takto pripravenej suspenzii kvasiniek bolo napipetovaných 0,5 ml enzýmu po ultrafiltrácii a bola sledovaná zmena absorbancie proti blanku (destilovanej vode) pri 630 nm každých 5 minút. Bola pripravená aj referenčná vzorka s prídavkom čistej vody namiesto enzýmu. Súčasne s meraním zmeny absorbancie bola sledovaná kvasinková kultúra priamo pod mikroskopom.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Stanovenie enzýmových aktivít

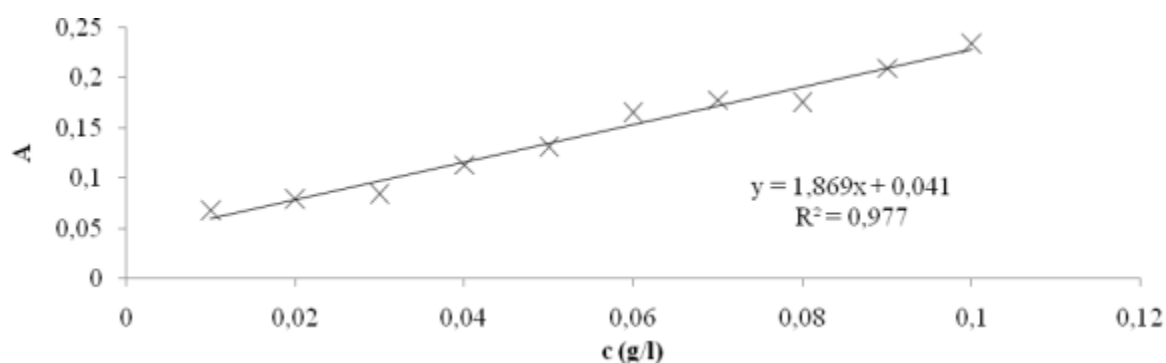
Stanovenie enzýmových aktivít bolo prevedené podľa uvedených postupov v kapitole 4.3 u plesne *Penicillium lilacinum*. Stanovenie enzýmových aktivít v médiu bolo prevedené 3., 5., 8., 10. a 12. deň kultivácie. V tabuľke sú uvedené priemerné hodnoty z troch meraní.

5.1.1 Stanovenie aktivity celulózy

Pre stanovenie celulózovej aktivity bolo treba zostaviť kalibračnú závislosť pre stanovenie redukujúcich cukrov podľa Somogyi-Nelsona (tabuľka 12, graf 1). Závislosť bola stanovená pre glukózu, aby mohlo byť odčítané množstvo glukózy v médiu od celkového množstva redukujúcich cukrov a tým prevedená korekcia na množstvo glukózy uvoľneného zo substrátu. Ako substráty pre stanovenie celulózovej aktivity bol použitý filtračný papier (ako modelový nerozpustný substrát).

Tabuľka č. 5: Kalibračná krivka redukujúcich sacharidov na glukóze podľa Somogyi-Nelsona

Koncentrácia (g/l)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1
Absorbancia (720 nm)	0,068	0,079	0,085	0,113	0,131	0,165	0,177	0,176	0,209	0,328



Graf č. 1: Kalibračná krivka redukujúcich sacharidov na glukóze podľa Somogyi-Nelsona

5.1.1.1 Stanovenie celulózovej aktivity na filtračnom papieri

Aktivita celulózy bola vyjadrená ako množstvo glukózy, ktoré sa uvoľnilo z celulózového substrátu pôsobením enzýmu, vzťahnuté na čas a množstvo supernatantu [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$]. Ako substrát pre stanovenie aktivity bol použitý prúžok filtračného papiera o veľkosti 0,5x1 cm.

Celulózová aktivita plesne *Penicillium lilacinum* sa bola uskutočnená vo dvoch etapách. Plesň bola kultivovaná na minerálnom médiu ako kontrola, na médiu obsahujúcom SR alebo RG a potom boli prevedené krížové adaptačné experimenty – adaptácia RG na prítomnosť SR alebo SR a adaptácia SR na prítomnosť SR alebo RG. Plesň na minerálnom médiu, na RG a na RG s adaptáciou na substrát RG dosiahla najvyššiu hodnotu celulózovej aktivity 5. deň

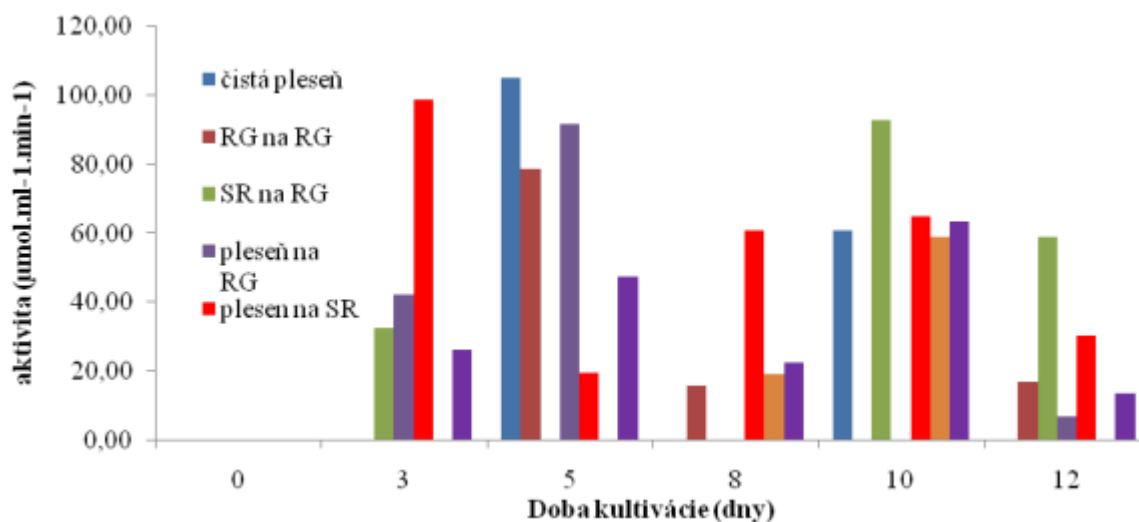
kultivácie a následne spotreba cukrov postupne klesala. Plesň kultivovaná na SR dosiahla svoje maximum 3. deň kultivácie, druhý vrchol dosiahla 10. deň kultivácie.

Najvyššia produkcia extracelulárnych celuláz tak bola u väčšiny kultúr nameraná v prvých fázach kultivácie, potom enzymatická aktivita celuláz významne poklesla. Plesň kultivovaná na SR adaptovanom na RG dosiahla však maximum až 10. deň kultivácie, rovnako ako plesň kultivovaná na RG adaptovaná na SR a SR adaptovaná SR.

Je pozoruhodné, že najvyššia hodnota celulázovej aktivity u *Penicillium lilacinum* bola nameraná aj pri kultivácii na minerálnom médiu bez prídavku kvasiniek ako substrátu.

Tabuľka č. 6: Závislosť aktivity celulázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* (filtračný papier) na dobe a spôsobe kultivácie

Aktivita celulázy ($\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{min}$)						
adaptácia	doba kultivácie (dni)					
	0	3	5	8	10	12
čistá plesň	0,00	0,00	104,97	0,00	60,75	0,00
RG na RG	0,00	0,00	78,76	15,54	0,00	16,78
SR na RG	0,00	32,44	0,00	0,00	92,76	58,93
plesň na RG	0,00	42,00	91,53	0,00	0,00	6,72
plesň na SR	0,00	98,68	19,24	60,76	64,82	30,34
RG na SR	0,00	0,00	0,00	18,87	58,84	0,00
SR na SR	0,00	25,93	47,21	22,51	63,25	13,51



Graf č. 2: Závislosť aktivity celulázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* (filtračný papier) na dobe a spôsobe kultivácie

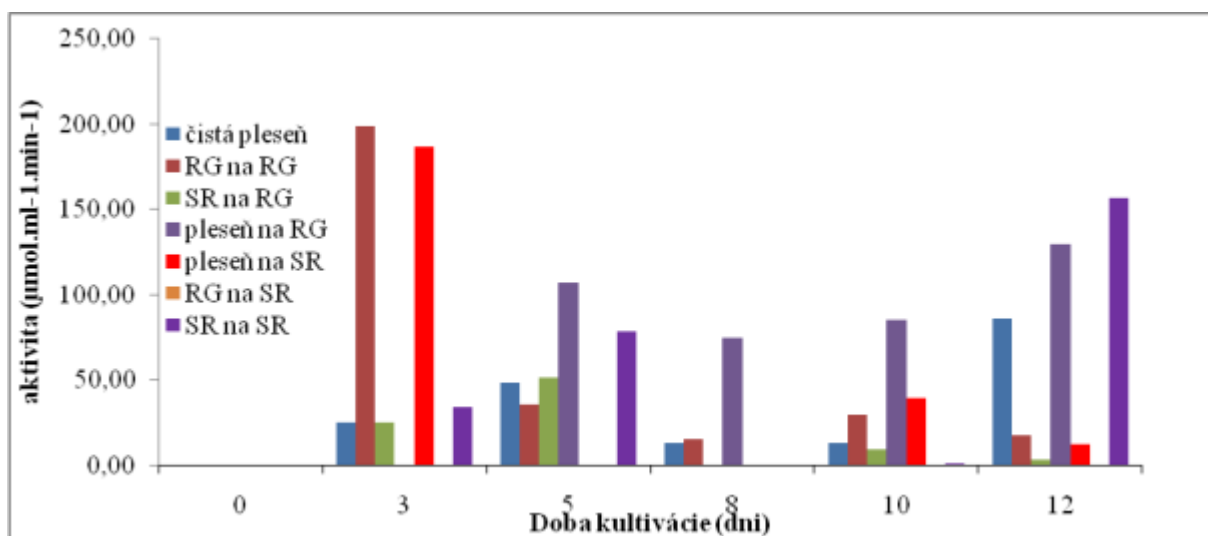
5.1.2 Stanovenie aktivity amylázy

Podľa kalibračnej závislosti (Graf č. 1) bola vypočítaná hodnota koncentrácie redukujúcich cukrov. Aktivita amylázy bola vyjadrená ako množstvo glukózy (redukujúceho cukru), ktoré sa uvoľnilo zo škrobového substrátu pôsobením enzýmu vzťahnuté na čas a množstvo

supernatantu [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$]. Ako substrát pre stanovenie amylázovej aktivity bol použitý 1% roztok škrobu.

Tabuľka č. 7: Závislosť aktivity amylázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobe a spôsobe kultivácie

Aktivita amylázy ($\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{min}$)						
	doba kultivácie (dni)					
	0	3	5	8	10	12
čistá pleseň	0,00	24,92	48,11	12,58	12,58	86,10
RG na RG	0,00	199,06	35,71	15,05	29,30	17,15
SR na RG	0,00	24,55	51,07	0,00	8,82	3,33
pleseň na RG	0,00	0,00	107,07	74,26	85,36	129,27
pleseň na SR	0,00	186,88	0,00	0,00	39,10	11,90
RG na SR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
SR na SR	0,00	33,80	77,97	0,00	0,93	156,72



Graf č. 3: Závislosť aktivity amylázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobe a spôsobe kultivácie

Najvyššiu aktivitu preukázala pleseň kultivovaná na SR a na kvasinke RG adaptovanej na RG. Pri kultivácii *Penicillium lilacinum* na minerálnom médiu bola najvyššia aktivita amylázy nameraná v posledný deň kultivácie, rovnako ako u plesne kultivovanej na RG a kultivovanej na SR s adaptáciou na SR. Najnižšia detekcia aktivity bola 8. a 10. deň kultivácie, práve v dňoch, kedy výrazne vzrastá proteázová aktivita.

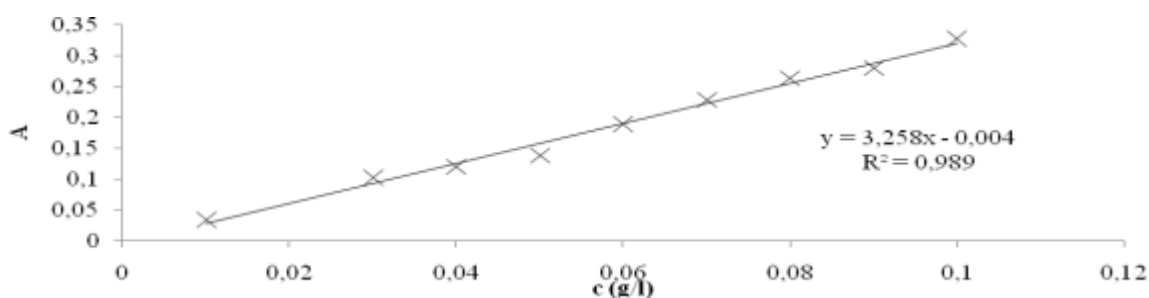
5.1.3 Stanovení aktivity xylanázy

Na stanovení aktivity xylanázy bolo treba zostaviť kalibračnú závislosť pre stanovenie redukujúcich cukrov podľa Somogyi-Nelsona (tabuľka 16, graf 11). Závislosť bola stanovená pre xylózu, aby mohlo byť odčítané množstvo xylózy uvoľnenej zo substrátu od celkového

množstva redukujúcich cukrov v médiu. Aktivita xylanázy bola vyjadrená ako množstvo xylózy ktoré sa uvoľnilo za substrátu pôsobením enzýmu, vzťahnuté na čas a množstvo supernatantu [$\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$]. Ako substrát bol použitý 1% roztok xylánu.

Tabuľka č. 8: Kalibračná krivka redukujúcich sacharidov na xylóze podľa Somogyi-Nelsona

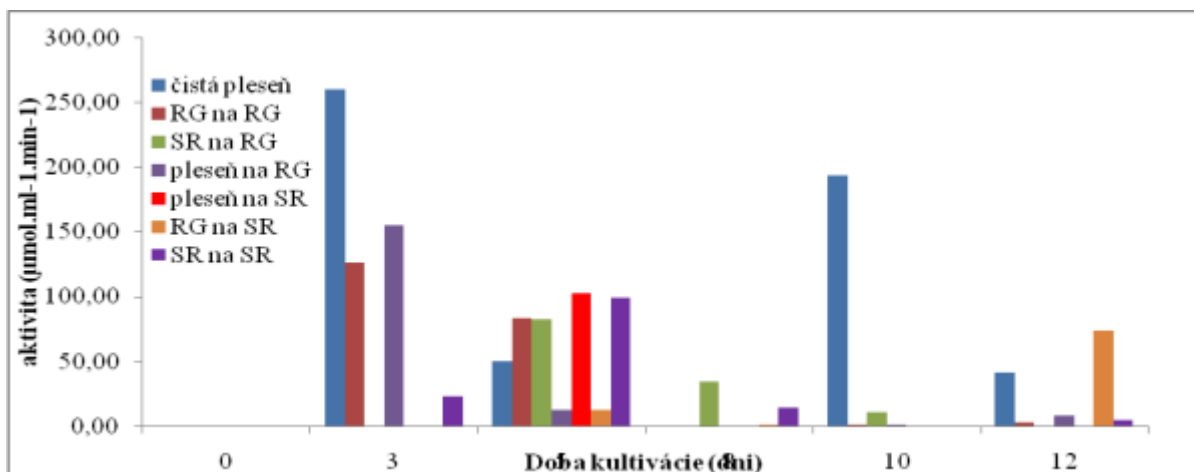
koncentrácia (g/l)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1
Absorbancia (720 nm)	0,033	0,128	0,102	0,120	0,138	0,189	0,228	0,264	0,280	0,328



Graf č. 4: Kalibračná krivka redukujúcich sacharidov na xylóze podľa Somogyi-Nelsona

Tabuľka č. 9: Závislosť aktivity xylanázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobe a spôsobe kultivácie

	Aktivita xylanázy ($\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{min}$)					
	doba kultivácie (dni)					
	0	3	5	8	10	12
čistá plesň	0,00	259,34	49,96	0,00	193,41	40,71
RG na RG	0,00	125,63	82,77	0,00	0,74	2,41
SR na RG	0,00	0,00	81,90	34,29	10,67	0,00
plesň na RG	0,00	154,93	11,84	0,00	0,74	7,52
plesň na SR	0,00	0,00	102,74	0,00	0,00	0,00
RG na SR	0,00	0,00	11,84	0,93	0,00	73,89
SR na SR	0,00	23,31	99,67	14,74	0,62	4,75



Graf č. 5: Závislosť aktivity xylanázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobu a spôsobe kultivácie

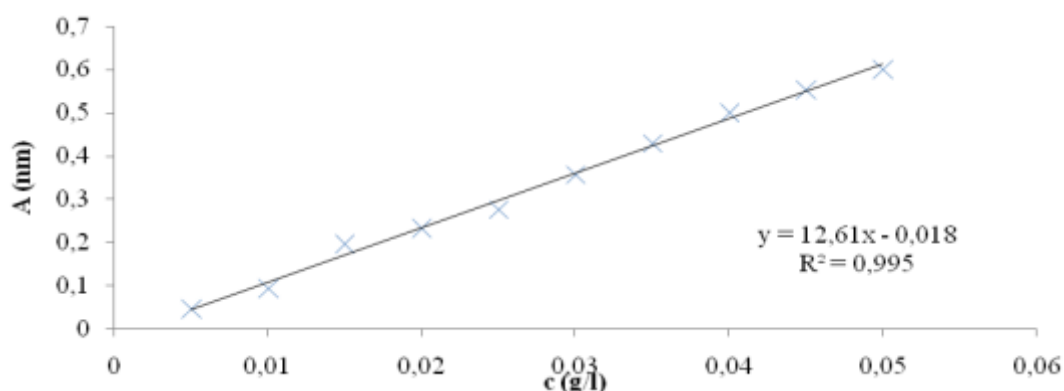
Pri väčšine substrátov bola aktivita detegovaná 3. a 5. deň kultivácie a následne klesla. Ako najlepší producent xylanázy sa javí pleseň kultivovaná na čistom minerálnom médiu. U niektorých substrátov nebola aktivita detegovaná vôbec.

5.1.4 Stanovenie aktivity lipázy

Pre stanovenie aktivity lipázy bolo treba zostaviť kalibračnú krivku (tabuľka 21, graf 24). Závislosť bola stanovená pre p-nitrofenol. Aktivita lipázy bola vyjadrená ako množstvo p-nitrofenolu, ktoré sa uvoľnilo z p-nitrofenylpalmitátu pôsobením enzýmu, vztiahnuté na čas a množstvo supernatantu [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$].

Tabuľka č. 10: Kalibračná krivka lipázy

koncentrácia (g/l)	0,005	0,010	0,015	0,020	0,025	0,030	0,035	0,040	0,045	0,050
Absorbancia (410 nm)	0,044	0,112	0,196	0,265	0,349	0,405	0,476	0,548	0,617	0,696



Graf č. 6: Kalibračná krivka lipázy

V grafe č. 6 je uvedená závislosť aktivity lipázy produkovanej plesňou *Penicillium lilacinum* v závislosti na dobe kultivácie na rôznych substrátoch.

Vo všetkých stanovovaných meraniach bola hodnota lipázovej aktivity nízka, v radoch nm/(ml·min).

Tabuľka č. 11: Závislosť aktivity lipázy produkovanej pomocou *Penicillium lilacinum* na dobe a spôsobe kultivácie

Aktivita lipázy (nmol/ml.min)						
	doba kultivácie (dny)					
	0	3	5	8	10	12
čistá pleseň	0,00	2,16	2,38	11,74	16,88	24,93
RG na RG	0,00	2,31	4,43	15,91	37,56	2,09
SR na RG	0,00	2,09	2,01	46,13	62,60	60,73
pleseň na RG	0,00	2,68	2,76	10,84	8,35	13,00
pleseň na SR	0,00	2,12	2,76	8,53	10,21	9,31
RG na SR	0,00	2,01	2,01	15,65	36,48	25,86
SR na SR	0,00	2,01	2,16	5,59	32,15	26,45



Graf č. 7: Závislosť aktivity lipázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobe a spôsobe kultivácie

Najvyššiu aktivitu lipáz preukazuje plesseň kultivovaná na SR adaptovanej na RG. Lipázová aktivita narastá postupne s dobou kultivácie. Pomerne nízke aktivity lipáz preukazuje plesseň kultivovaná na SR a RG bez adaptácie, pričom aktivita významne narastá u plesne kultivovanej na kmeňoch kvasiniek s adaptáciou. Najvyššie aktivity sú dosiahnuté 10. deň kultivácie, niektoré aktivity sú zachované aj v posledný deň kultivácie.

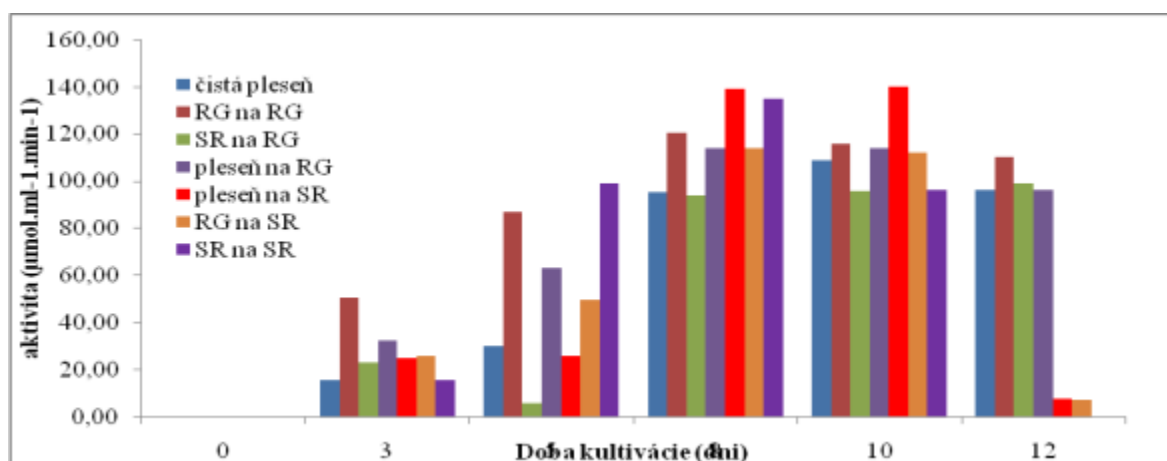
5.1.5 Stanovenie aktivity proteázy

Aktivita proteázy bola vyjadrená ako nárast absorbancie pri rozklade substrátu. Ako substrát bol použitý roztok azokazeínu. Výsledná aktivita bola vyjadrená ako množstvo substrátu rozloženého pôsobením enzýmu vzťahnuté na čas a množstvo supernatantu [nmol·min⁻¹·ml⁻¹].

V grafe č. 8 je uvedená závislosť aktivity proteáz produkovaných plesňou *Penicillium lilacinum* na dobe kultivácie a použitom kultivačnom substráte.

Tabuľka č. 12: Závislosť aktivity proteázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobe a spôsobe kultivácie

Aktivita proteázy ($\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{min}$)						
	doba kultivácie (dni)					
	0	3	5	8	10	12
čistá pleseň	0,00	15,33	30,00	95,06	108,67	96,17
RG na RG	0,00	50,56	86,67	120,39	115,56	110,28
SR na RG	0,00	23,00	5,50	93,94	95,50	98,83
pleseň na RG	0,00	32,11	63,00	113,83	113,83	96,00
pleseň na SR	0,00	24,56	25,67	138,83	139,78	7,39
RG na SR	0,00	25,78	49,28	113,67	111,89	6,83
SR na SR	0,00	15,83	99,11	134,94	96,06	0,33



Graf č. 8: Závislosť aktivity proteázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobe a spôsobe kultivácie

Podobne ako u lipáz – kultúra produkovala proteolytické enzýmy i pri kultivácii na minerálnom médiu, avšak prítomnosť kvasiniek ako substrátu v médiu navýšila proteázovú aktivitu. Proteázová aktivita je o rád vyššia v porovnaní so stanovením lipázovej aktivity. Pleseň vykazuje podobnú aktivitu ako na substráte bez adaptácie, tak na substráte s adaptáciou na jednotlivé kmene kvasiniek. Aktivita lipáz dosahuje svoje maximum najmä 8. a 10. deň kultivácie, u niektorých je pomerne vysoká ešte 12. deň kultivácie. V prvých dňoch kultivácie pleseň čerpala ako substrát cukry. S postupným klesaním aktivity lipáz pleseň znova začína využívať cukry.

5.1.6 Stanovenie aktivity manázy

Aktivita manázy bola vyjadrená ako množstvo manázy ktoré sa uvoľnilo zo substrátu pôsobením enzýmu, vzťahnuté na čas a množstvo supernatantu [$\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{ml})$]. Ako substrát bol použitý roztok galaktomanánu.

V grafe č. je uvedená závislosť absorbancie manázovej aktivity produkovanej plesňou *Penicillium lilacinum* v závislosti na dobe kultivácie a použitom kultivačnom substráte.

Produkcia manázovej aktivity bola minimálna, u niektorých substrátov nebola zaznamenaná žiadna odozva.

Tabuľka č. 13: Závislosť aktivity manázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobe a spôsobe kultivácie

Aktivita manázy ($\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$)						
	doba kultivácie (dni)					
	0	3	5	8	10	12
čistá pleseň	0,00	0,00	0,00	0,067	0,00	0,480
RG na RG	0,00	0,00	0,00	0,040	0,00	0,167
SR na RG	0,00	0,00	0,00	0,074	0,00	0,167
pleseň na RG	0,00	0,00	0,00	0,099	0,00	0,155
pleseň na SR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,013
RG na SR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SR na SR	0,005	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00



Graf č. 9: Závislosť aktivity manázy produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobe kultivácie a spôsobe kultivácie

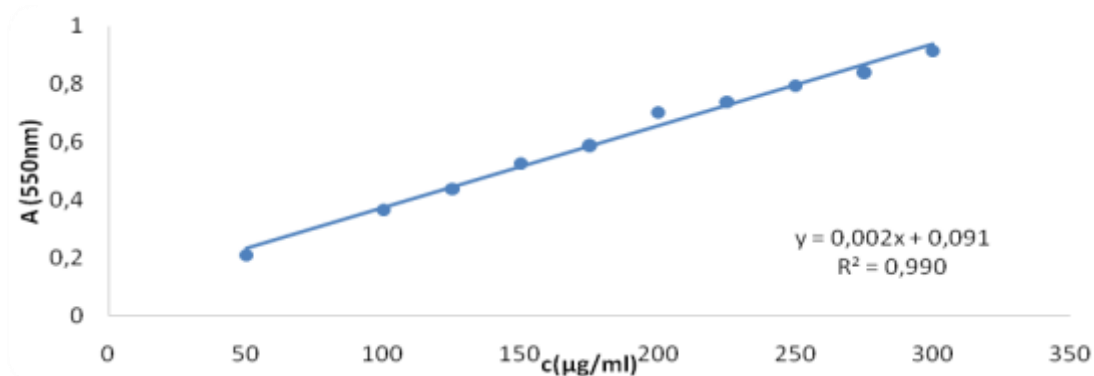
Manázová aktivita bola zaznamenaná 8. a 12. deň kultivácie, pričom najvyššia aktivita bola nameraná u plesne kultivovanej na minerálnom médiu 12. deň kultivácie. z vybraných kvasinkových substrátov bola najlepšia produkcia v prípade kultivácie na RG adaptovanej na RG, SR adaptovanej na RG v oboch prípadoch 12. deň kultivácie. U 8. dňa kultivácie bola najvyššia aktivita manázy detegovaná u SR adaptovanej na SR.

5.2 Stanovenie koncentrácie extracelulárnych bielkovín

V priebehu kultivácie bola taktiež sledovaná celková produkcia extracelulárnych proteínov. Závislosť zmeny koncentrácie extracelulárnych bielkovín bola vzťahovaná na mililiter supernatantu ($\mu\text{g/ml}$). Pre stanovenie koncentrácie proteínov bolo treba zostaviť kalibračnú závislosť pre stanovenie podľa Hartree-Lowryho (tabuľka 24, graf 10). Závislosť bola stanovená pre albumín.

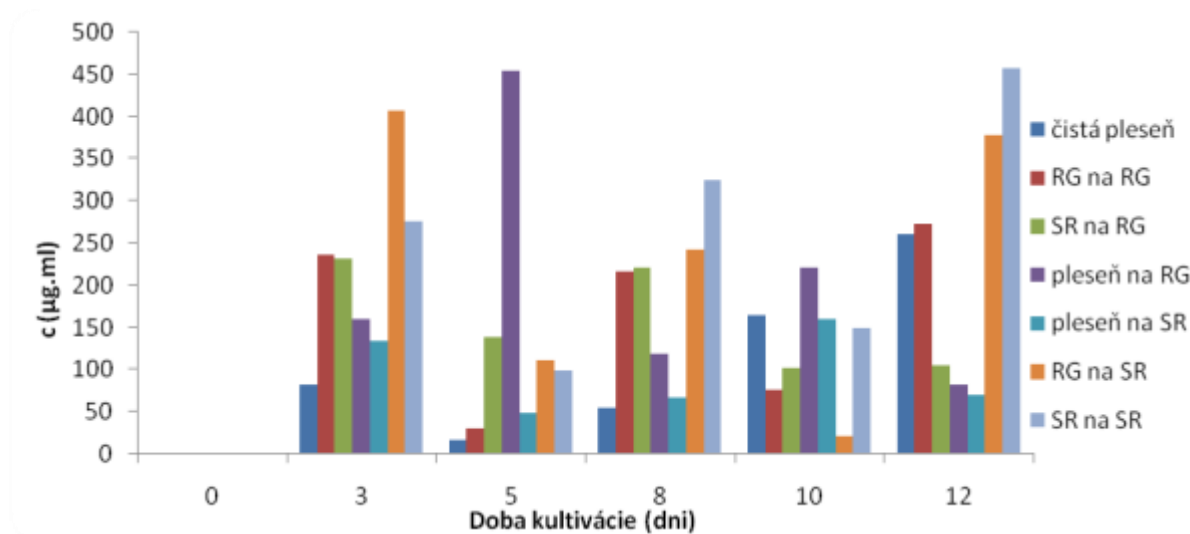
Tabuľka 14: Kalibračná krivka albumínu

koncentrácia (µg/ml)	50	100	125	150	175	200	225	250	275	300
Absorbance (550 nm)	0,211	0,367	0,439	0,527	0,589	0,705	0,740	0,796	0,843	0,916



Graf č. 10: Kalibračná krivka albumínu

V grafe č. 11 je uvedená závislosť produkcie extracelulárnych bielkovín plesňou *Penicillium lilacinum* v závislosti na dobe kultivácie a použitom substráte. Produkcia bielkovín bola preukázaná u všetkých použitých substrátov.



Graf č. 11: Závislosť koncentrácie extracelulárnych bielkovín produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobe a spôsobe kultivácie

Tabuľka 15: Závislosť koncentrácie extracelulárnych bielkovín produkovanej pomocou plesne *Penicillium lilacinum* na dobe a spôsobe kultivácie na rôznych substrátoch

Extracelulárne proteíny (µg/ml)						
	doba kultivácie (dni)					
	0	3	5	8	10	12
čistá pleseň	0,00	81,74	16,81	55,55	163,95	260,07
RG na RG	0,00	235,55	30,14	216,14	75,86	272,93
SR na RG	0,00	232,21	138,71	221,26	101,57	105,79
pleseň na RG	0,00	160,55	454,53	119,36	220,62	82,45
pleseň na SR	0,00	133,88	48,71	67,21	160,62	69,36
RG na SR	0,00	406,74	111,57	241,98	21,1	378,17
SR na SR	0,00	276,50	99,67	325,31	150,14	457,93

Pri kultivácii *Penicillium lilacinum* na RG adaptovanej na SR bola najvyššia produkcia extracelulárnych bielkovín nameraná 3. deň kultivácie a takmer rovnako vysoká hodnota bola nameraná aj posledný deň kultivácie. U plesne kultivovanej na SR ako substráte bola najvyššia aktivita zaznamenaná v 5. deň kultivácie. Vysoká hodnota koncentrácie bielkovín u plesne kultivovanej na substráte SR adaptovanej na SR bola nameraná 3., 5., a 12. deň kultivácie. U ostatných substrátov bola koncentrácia bielkovín takmer rovnomerná.

Koncentrácia bielkovín mohla okrem stanovovaných enzýmov zahrňovať aj ďalšie enzýmy, ktoré kultúra produkuje.

Z tabuľky č. 16 pre plesne kultivovaných na minerálnom médiu vyplýva, že je najvyšším producentom xylanáz a celuláz, zatiaľ čo enzymatická aktivita ostatných enzýmov je nižšia. So znižovaním obsahu cukrov postupne narastá aktivita proteázy, pričom maximum dosahuje 10. deň. V porovnaní s plesňou kultivovanou na RG a na SR sa výrazne nelíši v hodnote stanovených aktivít.

Pleseň kultivovaná na RG ako substráte je najvyšším producentom xylanázovej aktivity a plesne kultivovaná na SR je najvyšším producentom proteázovej aktivity. Aktivita proteáz dosahuje u väčšiny substrátov maximum okolo 8. a 10. dňa kultivácie.

Najvyššia hodnota amylázovej aktivity bola stanovená na plesni kultivovanej na RG s adaptáciou na RG. Pleseň kultivovaná na RG s adaptáciou na SR má v porovnaní s adaptáciou na RG veľmi nízke hodnoty amylázovej aktivity, spomedzi všetkých substrátov dosahuje však najvyššiu hodnotu lipázovej aktivity, ktorá ja počas počiatočných dní kultivácie a tiež vo všetkých ostatných kultiváciách veľmi nízka.

V porovnaní so všetkými substrátmi, plesne kultivovaná na RG a SR s adaptáciou na SR nedosahuje žiadne vysoké enzymové aktivity.

Pleseň kultivovaná bez adaptácie dokonca v niektorých prípadoch vykazuje vyššie aktivity v porovnaní s plesňou kultivovanou s adaptáciou na rôzne substráty.

Tabuľka 16: Zrovnanie enzýmových aktivít u jednotlivých substrátov

	Pleseň na RG adaptovaná na RG					Pleseň na RG adaptovaná na SR				
doba kultivácie (dni)	3	5	8	10	12	3	5	8	10	12
proteázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	50,6	86,7	120,4	115,6	110,3	25,8	49,3	113,7	111,9	6,8
lipázy (nmol/ml.min)	2,3	4,4	15,9	37,6	2,1	2,0	2,0	15,7	36,5	25,9
amylázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	199,1	35,7	15,1	29,3	17,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
xylanázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	125,6	82,8	0,0	0,7	2,4	0,0	11,8	0,9	0,0	73,9
celuázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	0,0	78,8	15,5	0,0	16,8	0,0	0,0	18,9	58,8	0,0
manázy (A/min)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Pleseň na SR adaptovaná na SR					Pleseň na SR adaptovaná na RG				
doba kultivácie (dni)	3	5	8	10	12	3	5	8	10	12
proteázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	15,8	99,1	134,9	96,1	0,3	23,0	5,5	93,9	95,5	98,8
lipázy (nmol/ml.min)	2,0	2,2	5,6	32,2	26,5	2,1	2,0	46,1	62,6	60,7
amylázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	33,8	78,0	0,0	0,9	156,7	24,6	51,1	0,0	8,8	3,3
xylanázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	23,3	99,7	14,7	0,6	4,8	0,0	81,9	34,3	10,7	0,0
celuázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	25,9	47,2	22,5	63,3	13,5	32,4	0,0	0,0	92,8	58,9
manázy (A/min)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Pleseň na RG					Pleseň SR				
doba kultivácie (dni)	3	5	8	10	12	3	5	8	10	12
proteázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	32,1	63,0	113,8	113,8	96,0	24,6	25,7	138,8	139,8	7,4
lipázy (nmol/ml.min)	2,7	2,8	10,8	8,4	13,0	2,1	2,8	8,5	10,2	9,3
amylázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	0,0	107,1	74,3	85,4	129,3	186,9	0,0	0,0	39,1	11,9
xylanázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	154,9	11,8	0,0	0,7	7,5	0,0	102,7	0,0	0,0	0,0
celuázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	42,0	91,5	0,0	0,0	6,7	98,7	19,2	60,8	64,8	30,3
manázy (A/min)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Pleseň na minerálnom médiu									
doba kultivácie (dni)	3	5	8	10	12					
proteázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	15,3	30,0	95,1	108,7	96,2					
lipázy (nmol/ml.min)	2,2	2,4	11,7	16,9	24,9					
amylázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	24,9	48,1	12,6	12,6	86,1					
xylanázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	259,3	50,0	0,0	193,4	40,7					
celuázy ($\mu\text{mol/ml.min}$)	0,0	105,0	0,0	60,8	0,0					
manázy (A/min)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0					

5.3 Uchovávanie a stabilizácia enzýmov

Bola premeraná možná zmena enzýmovej aktivity medzi vzorkami pred zmrazením. Po zmrazení a následnej lyofilizáciou boli porovnané rozdiely medzi enzýmami v práškovej a tekutej forme. Pre lyofilizáciu boli vybrané dve vzorky s najvyššou hodnotou proteázovej, manázovej a lipázovej aktivity.

5.3.1 Zmena aktivity enzýmov pri lyofilizácií

K analýze a manipulácií s enzýmovým preparátom boli použité vzorky supernatantu plesne *Penicillium lilacinum* kultivované na médiu, kde ako substrát boli použité kvasinky RG odobraté 5. deň kultivácie a na médiu, kde substrátom bolo SR adaptované na RG odobraté 12. deň kultivácie. Vzorky boli najskôr zmrazené a následne lyofilizované. Supernatanty boli vybrané na základe preukázaných aktivít pred zmrazením a lyofilizáciou.

Po premeraní aktivít a obsahu extracelulárnych bielkovín bolo overené, že obsah proteínov sa výrazne nemení v porovnaní so vzorkami pred lyofilizáciou.

Pred lyofilizáciou bola zaznamenaná minimálna manázová aktivita u plesne kultivovanej na SR s adaptáciou na RG, pričom po lyofilizácií nebola detekovaná žiadna manázová aktivita. U plesne kultivovanej na RG nebola manázová aktivita stanovená pred ani po lyofilizácií.

Proteázová aktivita klesla u plesne kultivovanej na RG z hodnoty 63 $\mu\text{mol}/(\text{ml}\cdot\text{min})$ na 35,4 $\mu\text{mol}/(\text{ml}\cdot\text{min})$ a u plesne kultivovanej na SR s adaptáciou na RG klesla z pôvodnej hodnoty 98,8 $\mu\text{mol}/(\text{ml}\cdot\text{min})$ na 80,6 $\mu\text{mol}/(\text{ml}\cdot\text{min})$.

Lipázová aktivita plesne kultivovanej na RG po lyofilizácií nebola detegovaná. Plesne kultivovaná na SR s adaptáciou na RG vykazuje hodnotu aktivity 6,558 $\text{nm}/(\text{ml}\cdot\text{min})$, pričom pôvodná aktivita bola 60,73 $\text{nm}/(\text{ml}\cdot\text{min})$.

U oboch vzoriek došlo k strate amylázovej, xylanázovej i celulázovej aktivity.

5.4 Purifikácia a identifikácia enzýmov

Pre purifikáciu bola vybraná jedna vzorka s najvyššou hodnotou manázovej, lipázovej a proteázovej aktivity. a bola sledovaná stabilizácia pomocou ultrafiltrácie. Nakoniec bola prevedená elektroforéza na zistenie veľkosti jednotlivých enzýmov po lyofilizácii a ultrafiltrácii.

5.4.1 Ultrafiltrácia

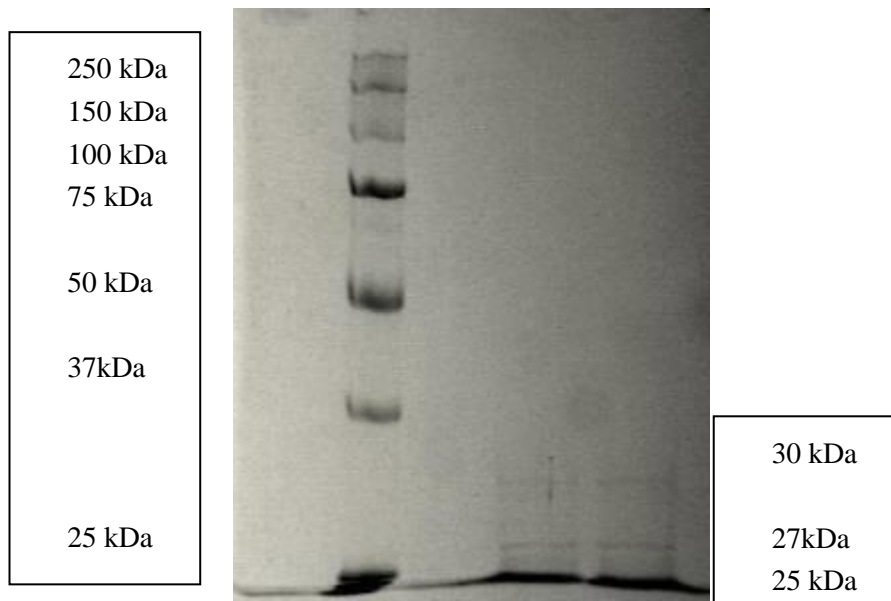
K analýze a manipulácií s enzýmovým preparátom bola použitá vzorka supernatantu plesne *Penicillium lilacinum* kultivovanej na minerálnom médiu, odobratá 12. deň kultivácie. Vzorky boli najskôr zmrazené a po následnom rozmrazení bola vzorka použitá k ultrafiltrácii, kde bola desaťkrát zakoncentrovaná a následne bola premeraná enzýmová aktivita

Výsledky poukazujú na to, že rovnako ako pri lyofilizácii tak aj pri ultrafiltrácii došlo ku strate amylázovej, xylanázovej i celulázovej aktivity.

V zakoncentrovanej vzorke bola proteázová aktivita stanovená na 163,1 $\mu\text{mol}/\text{ml}\cdot\text{min}$. Lipázová aktivita vykazuje hodnotu 6,82 $\text{nm}/(\text{ml}\cdot\text{min})$ pri zakoncentrovaní, pričom pôvodná hodnota aktivity bola 26,45 $\text{nm}/(\text{ml}\cdot\text{min})$.

5.4.2 Elektroforéza PAGE-SDS

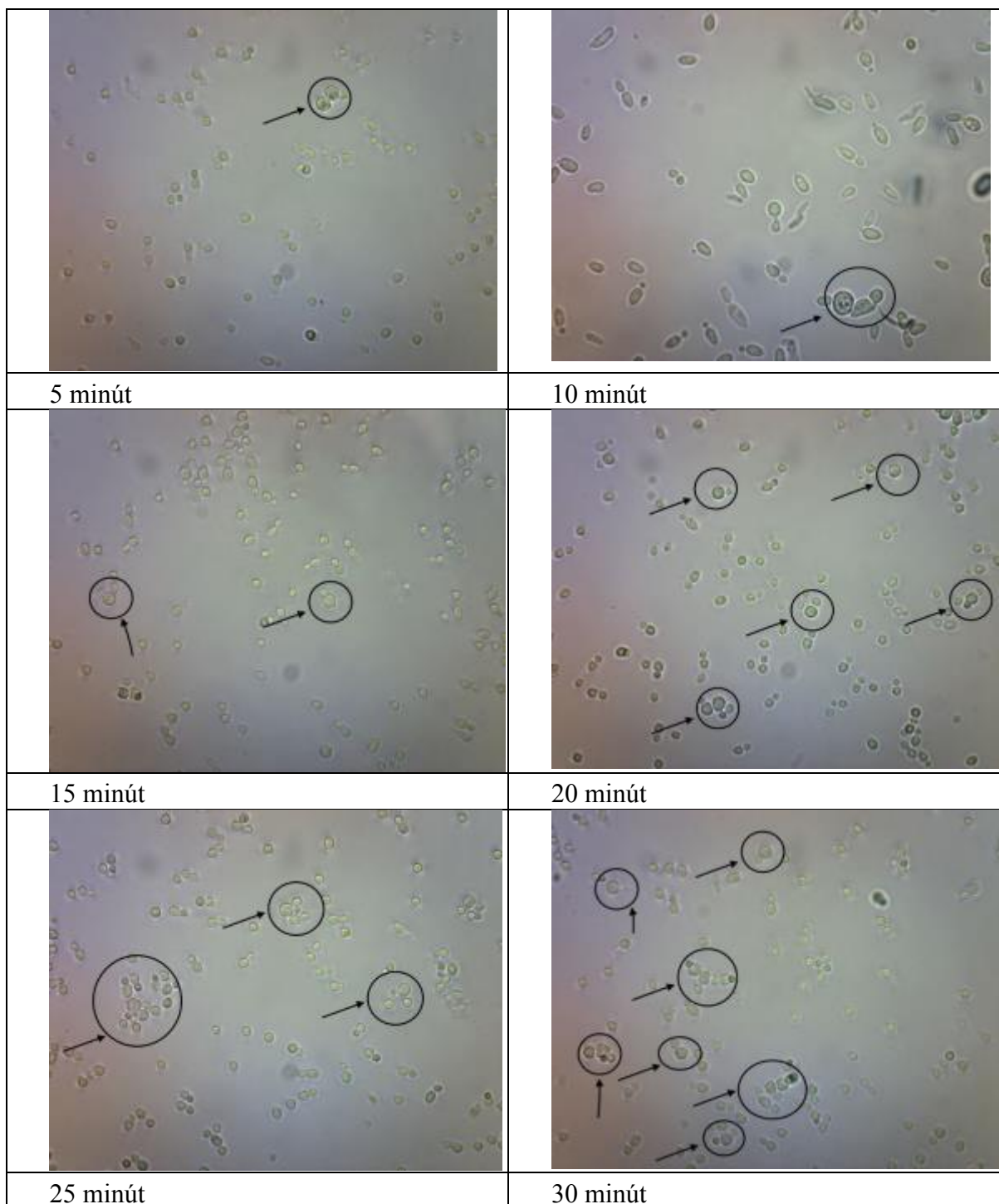
U vzorky po ultrafiltrácii boli z 14% gélu odčítané veľkosti proteínov 30 kDa, 27 kDa, 25 kDa, 23 kDa a 18 kDa. U vzorky plesne kultivovanej na RG po lyofilizácii nebola na žiadnom z gélov viditeľná zóna. U plesne kultivovanej na SR s adaptáciou na RG boli detegované zóny o veľkosti 23 kDa, 21 kDa a 18 kDa na 14% géle a na 12% géle 30 kDa, 27 kDa, 25 kDa.



Obrázok 11: Príklad PAGE-SDS vzorka z lyofilizácie- 12% gél

5.5 Príprava protoplastov použitím enzýmového preparátu

Pre prípravu protoplastov bol použitý pripravený preparát po ultrafiltrácii, ktorý ako jediný vykazoval manázovú aktivitu. Presný postup prípravy protoplastov je uvedený v kapitole 3.5. Po niekoľkých minútach bolo pod mikroskopom pozorované malé množstvo protoplastov. Hodnota absorbancie sa behom merania postupne znižovala, čo potvrdzuje aktivitu enzýmu pri narušení bunkovej steny a príprave protoplastov. Pripravený enzýmový preparát je teda vhodný v danej koncentrácii s lipázovou, proteázovou a manázovou aktivitou na prípravu protoplastov a ďalšie aplikácie pri narušení bunkovej steny karotenogénnych kvasiniek.



Obrázok 12: Príprava protoplastov kvasinky RG

6 ZÁVERY

Cieľom predloženej práce bolo štúdium extracelulárnych hydrolytických enzýmov. Na produkciu bola použitá plesň *Penicillium lilacinum*. Ako substrát boli použité bunky kultúry kvasiniek *Rhodotorula glutinis* a *Sporobolomyces roseus*.

Všetky vzorky plesne boli kultivované za rovnakých podmienok statickou kultiváciou pri 28 °C. Enzýmové aktivity boli premerané v 3., 5., 8., 10., a 12. deň kultivácie. Sledovaná bola produkcia proteáz, lipáz, manáz, celuláz, amyláz a xylanáz.

Plesň produkovala prvé dni najmä amylázové, celulázové a xylanázové enzýmy na narušenie bunkovej steny kvasiniek a zrejme po dostatočnom narušení steny začala produkovať lipázy a proteázy. Najvyššia aktivita proteáz bola zaznamenaná 10. deň kultivácie, u plesne kultivovanej na SR a vykazovala hodnotu 139,78 $\mu\text{mol}/(\text{ml}\cdot\text{min})$. Najvyššia hodnota lipázovej aktivity bola stanovená u plesne kultivovanej na SR s adaptáciou na RG 12. deň kultivácie s hodnotou aktivity 62,60 $\text{nmol}/(\text{ml}\cdot\text{min})$.

Po ustálení alebo poklese proteázovej a lipázovej aktivity nastal opätovný nárast xylanázovej, amylázovej a celulázovej aktivity.

Manázová aktivita nebola takmer vôbec detegovaná. Len u niektorých substrátov bola predovšetkým 12. deň kultivácie pozorovaná čiastočná aktivita, kde najvyššia aktivita bola detegovaná u plesne kultivovanej na minerálnom médiu. Možnou príčinou je typ usporiadania kultivácie - statická kultivácia, pri ktorej plesň nemala dostatok dostupného substrátu. Počas kultivácie plesň rástla na povrchu média (striktne aeróbnny organizmus), zatiaľ čo ťažšie kvasinky klesli na dno.

Tri najlepšie vzorky s najvyššou hodnotou enzýmových aktivít boli ďalej použité k testovaniu lyofilizácie a k purifikácii pomocou ultrafiltrácie. Dva vybrané enzýmové preparáty, a to plesň kultivovaná na RG a plesň kultivovaná na SR s adaptáciou na RG boli lyofilizované. V oboch prípadoch možno konštatovať že v tomto prípade lyofilizácia nie je vhodnou formou prípravy enzymového preparátu, došlo ku strate väčšiny pôvodnej aktivity. Zachovaná ostala čiastočne iba lipázová a proteázová aktivita. Najvyššiu stabilitu vykazovala práve proteázová aktivita.

Na ultrafiltráciu bola použitá plesň kultivovaná na minerálnom médiu. Podobne ako u lyofilizácie, tak aj pri ultrafiltrácii došlo k poklesu aktivity enzýmov vo veľkej miere. Zachované boli čiastočne proteázy, lipázy a manázy. Môžeme predpokladať, že k významnej strate aktivity došlo pri zmrazení a následnom rozmrazení vzoriek.

Zároveň bola u všetkých troch vzoriek sledovaná veľkosť enzýmov pomocou PAGE-SDS elektroforézy. U vzorky po ultrafiltrácii boli detegované enzýmy o veľkosti 30 kDa, 27 kDa, 25 kDa, 23 kDa a 18 kDa. U vzorky plesne kultivovanej na RG po lyofilizácii nebola na žiadnom z gélov viditeľná zóna proteínu. U plesne kultivovanej na SR s adaptáciou na RG boli detegované enzýmy o veľkosti 23 kDa, 21 kDa a 18 kDa na 14% géle a na 12% géle 30 kDa, 27 kDa, 25 kDa.

Vzorky po zakoncentrovaní ultrafiltráciou boli úspešne použité k príprave protoplastov. Pripravený plesňový enzýmový preparát je teda vhodný na prípravu protoplastov a ďalšie aplikácie pri narušení bunkovej steny najmä u karotenogénnych kvasiniek.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] HUDECOVÁ, Daniela a Martin ŠIMKOVIČ. *Mikrobiológia*. Bratislava: STU, 2009. ISBN 978-80-227-3194-2
- [2] VÁŇA, J. *Systém a vývoj hub a houbových organizmů*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1996. ISBN 80-7184-175-7.
- [3] MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ. *Vláknité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3
- [4] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6
- [5] YANG, Fan, Sufang ZHANG, Guojie JIN, Xinping LIN a Zongbao K. ZHAO. 2011. Purification and characterization of a β -1,3-glucomannanase expressed in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. **49**(2): 223-228 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2011.04.005. ISSN 01410229. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022911000639>
- [6] VELÍŠEK, Jan. 2002. *Chemie potravin 3*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 331 s. ISBN 80-866-5903-8
- [7] Organic soil technologies: *Paecilomyces lilacinus*. WORDPRESS. [online]. [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: <http://organicsoiltechnology.com/paecilomyces-lilacinus.html>
- [8] KHAN, Alamgir, WILLIAMS a Helena K.M. NEVALAINEN. 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles: fejetony, které vycházely od roku 1997 na internetu na adrese <http://svet.namodro.cz>. *Biological Control* [online]. **31**(3): 346-352 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2004.07.011. ISSN 10499644. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964404001409>
- [9] LUANGSA-ARD, Jennifer, Jos HOUBRAKEN, Tineke VAN DOORN, Seung-Beom HONG, Andrew M. BORMAN, Nigel L. HYWEL-JONES a Robert A. SAMSON. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **321**(2): 141-149 [cit. 2015-05-06]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <http://femsle.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x>
- [10] MAZÁŇ, Marián; MAZÁŇOVÁ, Katarína; FARKAŠ, Vladimír. Bunková stena húb –výchova pre výskum nových antimykotík. *Chem. Listy*, 2006. ISSN 1213-7103. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_06_433-439.pdf
- [11] HÁRONIKOVÁ, A. Regulácia produkcie obohatenej biomasy a lipidových látok u karotenoénnych kvasinek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 58 s
- [12] MASÁK, Jan, Jana PELECHOVÁ a Jiří PLACHÝ. 1992. *Speciální mikrobiální technologie*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 300 s. ISBN 80-708-0142-5

- [13] Kocková-Kratochvílová, Anna. *Atlas kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*, Alfa Bratislava, 1990.
- [14] AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004, 244 s. ISBN 80-7080-534-x
- [15] KURTZMAN, C a Jack W FELL. 2000. *The yeasts: a taxonomic study*. 4th ed. New York: Elsevier, xviii, 1055 p. ISBN 04-448-1312-8
- [16] KURTZMAN, Cletus. 2011. *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, xxii, 289, 48, 178 s. ISBN 978-012-3847-089.
- [17] HÁRONIKOVÁ, A. *Mikrobiální produkce karotenoidních pigmentů s využitím odpadních substrátů*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010. 92 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická
- [18] Veselá M.: *Praktikum z obecné mikrobiologie*, Brno: FCH VUT, 2004. 3. vyd. 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
- [19] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. Čtvrté inovované vydání. Brno, 290 s. Díl I. Molekulární biologie prokaryotické buňky. Brno: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc., 2006. ISBN 80-902562-5-2
- [20] MURRAY, Robert K. *Harperova biochemie*. 23. vyd. Jinočany: H H, 2002, ix, [3], 872 s. ISBN 80-731-9013-3
- [21] MCKEE, Trudy; MCKEE, James R. *Biochemistry*. York Graphic Services. United States of America : York Production Services, 1996. 638 s. ISBN 0-697-21159-2.
- [22] VODRÁŽKA, Zdeněk; RAUCH, Pavel; KÁŠ, Jan. *Enzymologie*. Vysoká škola chemickotechnologická v Praze, třetí přepracované. Praha : FIRMA - JK, 1998. 171 s. ISBN 80-7080-330-4.
- [23] GYNCI, Marina Mathew; RAJEEV, K Sukumaran; REETA, Rani Singhanian. Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2008, vol. 67, pp. 898-907.
- [24] PERCIVAL ZHANG, Y.-H., Michael E. HIMMEL a Jonathan R. MIELENZ. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* [online]. **24**(5): 452-481 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.003. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975006000413>
- [25] BHAT, M.K., S. BHAT a Jonathan R. MIELENZ. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* [online]. **15**(3-4): 583-620 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1016/S0734-9750(97)00006-2. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975097000062>
- [26] JAYANI, Ranveer Singh, Shivalika SAXENA a Reena GUPTA. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry* [online]. **40**(9): 2931-2944 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.03.026. ISSN 13595113. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511305001765>

- [27] MIKUŠ, Ľubomír, Ladislav DODOK, Mária KOVÁČOVÁ, Ladislav STARUCH a Václav KOMAN. 2012. Bakery enzymes in cereal technologies. *Potravinárstvo* [online]. **6**(3) [cit. 2015-05-05]. DOI: 0.5219/ 193. ISSN 1337 - 0960. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/viewFile/193/pd>
- [28] SINGH, Shalini, Sanamdeep SINGH, Vrinda BALI, Lovleen SHARMA a Jyoti MANGLA. 2014. Production of Fungal Amylases Using Cheap, Readily Available Agriresidues, for Potential Application in Textile Industry. *BioMed Research International* [online]. **2014**: 1-9 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1155/2014/215748. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/215748/>
- [29] POLIZELI, M. L. T. M., A. C. S. RIZZATTI, R. MONTI, H. F. TERENCEZI, J. A. JORGE a D. S. AMORIM. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **67**(5): 577-591 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1007/s00253-005-1904-7. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-1904-7>
- [30] VODRÁŽKA, Zdeněk. 2002. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, Přer. str. ISBN 80-200-0600-1
- [31] MAHESHWARI, R., G. BHARADWAJ a M. K. BHAT. 2000. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. **64**(3): 461-488 [cit. 2015-05-05]. DOI: 10.1128/MMBR.64.3.461-488.2000. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.64.3.461-488.2000>
- [32] MALGAS, Samkelo, Susan J VAN DYK a Brett I. PLETSCHEKE. B-Mannanase (Man26A) and α -galactosidase (Aga27A) synergism – a key factor for the hydrolysis of galactomannan substrates. *Enzyme and Microbial Technology*. 2015, roč. 70. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022914002178>
- [33] WYMAN, Charles, Stephen DECKER, Michael HIMMEL, John BRADY, Catherine SKOPEC a Liisa VIIKARI. 2004. Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. *Polysaccharides* [online]. CRC Press [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1201/9781420030822.ch43. ISBN 978-0-8247-5480-8. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420030822.ch43>
- [34] PANDEY, Ashok. 2006. *Enzyme technology*. New Delhi: Asiatech Publishers, xviii, 742 p. ISBN 978-038-7292-946
- [35] GALUSZKA, Petr a Lenka LUHOVÁ. *Laboratorní technika pro biochemiky*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2005. ISBN 80-244-0640-3.
- [36] COOPER, Geoffrey M. 2000. *The cell: a molecular approach*. 2nd ed. Washington (DC): ASM Press. ISBN 08-789-3106-6
- [37] PEČ, Pavel. *Laboratorní cvičení z biochemie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2008. ISBN 8024409127.
- [38] MATOUŠKOVÁ, P. Produkce a charakterizace extracelulárních hydroláz z vybraných druhů plísní. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011

- [39] ČARNECKÁ, M. Molecular study of intracellular changes as response of microorganisms to Environ Chemistry, Institute of Chemistry and Technology of Environmental Protection.
- [40] MIKKELSEN, S., CORTON, E. *Bioanalytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc. 2004. ISBN 0-471-54447-7.

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK a SYMBOLOV

AA	akrylamid
APS	persíran amonný
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
c	koncentrace
CCM	Czech Collection of Microorganisms
CMC	Karboxymetylcelulosa
MM	Minerálne médium
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
RG	<i>Rhodotorula glutinis</i>
SDS	dodecylsíran sodný
SR	<i>Sporobolomyces roseus</i>
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	záření v ultrafialové oblasti spektra