

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

FAKULTA CHEMICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Využití termofilních mikroorganismů při biodegradaci lignocelulosových
materiálů**

Brno 2007

Lenka Klašková

Abstrakt

Buněčná stěna rostlin je tvořena několika vrstvami: celulosou, hemicelulosou, ligninem a pektinem. Tyto biopolymery jsou degradovány mnoha mikroorganismy. K biodegradaci pomocí mikroorganismů dochází za pomoci extracelulárních enzymů.

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium vlivu podmínek kultivace na produkci extracelulárních enzymů na karboxymethylcelulase a pektínu při použití směsné termofilní kultury, která obsahuje mikroorganismy rodu *Bacillus* a *Thermus*. Kultivace byla prováděná v baňkách na třepačce s rychlostí třepání 99 min^{-1} při teplotě $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Byla sledována celulolytická a polygalakturonásová aktivita, koncentrace bílkovin pomocí Biuretovi metody, koncentrace redukujících látek pomocí metody Somogyiho a Nelsona a teplotní optimum.

Abstract

The plant cell wall consists of several layers: cellulose, hemicellulose, lignin and pectin. These biopolymers are degraded by many microorganisms. Extracellular enzymes are used for biodegradation by microorganisms.

This thesis was focused on studying the impact of cultivation conditions on the production of extracellular enzymes at carboxymethyl cellulase and pectin when a mixed thermophilic culture containing *Bacillus* and *Thermus* microorganisms is used. The cultivation was carried out in flasks on a shaking machine with a shaking speed of 99 min^{-1} at a temperature of 60°C .

The monitoring covered cellulolytic and polygalacturonase activities, protein concentration by the Biuret method, concentration of reducing substances by the Somogyi and Nelson methods, and the temperature optimum.

KLAŠKOVÁ, L. *Využití termofilních mikroorganismů při biodegradaci lignocelulosových materiálů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 55 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Libor Babák, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Děkuji paní Doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. a panu Ing. Liboru Babákovi, Ph.D. za odborné připomínky a za pomoc při zpracování diplomové práce.

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Cíl práce.....	8
3 Současný stav řešené problematiky.....	9
3.1 Rostlinná buněčná stěna.....	9
3.1.1 Celulosa.....	9
3.1.2 Lignin.....	10
3.1.3 Hemicelulosa.....	12
3.1.4 Pektin.....	12
3.2 Termofilní mikroorganismy.....	12
3.3 Bakterie.....	13
3.3.1 Rod Bacillus.....	15
3.3.2 Rod Thermus.....	16
3.4 Enzymy.....	16
3.4.1 Celulolytické enzymy.....	18
3.4.2 Endo- a exo- polygalakturonasy.....	18
3.4.3 Ligninasy.....	19
3.4.4 Hemicelulasy.....	19
3.5 Submerzní kultivace.....	20
4 Experimentální část.....	21
4.1 Použité chemikálie a přístroje.....	21
4.1.1 Použité chemikálie.....	21
4.1.2 Použité přístroje.....	21
4.2 Použitý software.....	22
4.3 Kultura a její uchování.....	22
4.4 Použitý substrát.....	22
4.5 Příprava roztoků.....	22
4.5.1 Příprava Somogyiho činidel.....	22
4.5.2 Příprava Nelsonova roztoku III.....	23
4.5.3 Příprava substrátu karboxymethylcelulosity.....	23
4.5.4 Příprava substrátu pektanu sodného.....	23
4.5.5 Příprava kultivačního laktosového média.....	23
4.5.6 Příprava kultivačního glukosového média.....	23
4.5.7 Příprava kultivačního 1% CMC média.....	23
4.5.8 Příprava kultivačního média – pektín.....	24
4.6 Pracovní postupy jednotlivých metod.....	24
4.6.1 Stanovení redukujících látek podle Somogyiho a Nelsona.....	24
4.6.2 Stanovení rozpustných bílkovin – Biuretovou metodou.....	24
4.6.3 Stanovení specifické celulolytické aktivity.....	24
4.6.4 Stanovení specifické aktivity polygalakturonás.....	25
4.6.5 Stanovení teplotního optima.....	26
4.6.6 Stanovení kalibrační křivky glukosy.....	27
4.6.7 Stanovení kalibrační křivky albuminu – Biuretovou metodou.....	27
4.6.8 Stanovení kalibrační křivky kyseliny D-galaktopyranuronové.....	28
5 Výsledky a diskuze.....	30

5.1 Submerzní kultivace na pektínu.....	30
5.1.1 Výsledky produkce redukujících látek.....	30
5.1.2 Výsledky produkce rozpustných bílkovin.....	30
5.1.3 Výsledky produkce enzymu polygalakturonázy.....	31
5.2 Submerzní kultivace na karboxymethylcelulose (1% CMC).....	35
5.2.1 Výsledky produkce redukujících látek.....	35
5.2.2 Výsledky produkce rozpustných bílkovin.....	35
5.2.3 Výsledky produkce celulolytické aktivity.....	35
5.3 Vliv koncentrace inokula na produkci sledovaných enzymů.....	39
5.3.1 Výsledky polygalakturonásové a celulolytické aktivity.....	39
5.3.2 Výsledky produkce rozpustných bílkovin.....	41
5.3.3 Výsledky produkce redukujících látek.....	43
5.4 Stanovení teplotního optima polygalakturonázy.....	45
5.5 Výsledky změny pH během kultivace.....	46
6 Závěr.....	48
7 Seznam použité literatury.....	49
8 Seznam použitých zkratk a symbolů.....	51
9 Přílohy.....	52

1 Úvod

Mikroorganismy jsou rozšířené v celé biosféře: nacházíme je na celém zemském povrchu, v půdě, ve vodě a v ovzduší.¹ Hrají v přírodě i v životě člověka obrovskou roli, neboť jsou jedním z hlavních činitelů ovlivňujících tvorbu a zachování životního prostředí na naší planetě. Společenství různých druhů mikroorganismů jsou totiž schopna rozložit veškeré přirozené organické látky až k jejich úplné mineralizaci. Tím vracejí chemické prvky, které jsou nezbytnou složkou buněčné hmoty, do koloběhů prvků v přírodě. Rozkladná činnost mikroorganismů probíhá nejen v půdě, ale i ve vodních tocích, stojatých vodách a mořích. Je hlavní složkou tzv. „samočištění“ vodních toků a v průmyslovém měřítku se jí využívá v čistírnách městských a průmyslových odpadních vod.⁴

Pro růst mikrobů a pro získávání žádaných produktů tvoří hlavní složku živných půd zdroj uhlíku. Je proto snaha používat laciné vedlejší a odpadní průmyslové produkty, obsahující využitelné zdroje uhlíku (syrovátka, melasa, sulfítové výluhy apod.). Nejčastěji používaným zdrojem uhlíku a případně i energie jsou sacharidy.¹ V poslední době se velká pozornost věnuje využití celulosy jako zdroje uhlíku, protože celulóza je nejrozšířenější organickou látkou v přírodě a její zásoby se neustále obnovují.⁹ Lignocelulóza je nejrozšířenějším biopolymerem v přírodě. Degradace lignocelulosového materiálu na monomerní sacharidy za spoluúčasti celulytických enzymů má velký význam od té doby, co se začal používat jako surovina pro biotechnologické procesy.¹⁹

Použití termofilních mikroorganismů v průmyslu neustále vzrůstá. Biotechnologické aplikace se zabývají produkcí široké škály extracelulárních enzymů nebo velmi významným zpracováním či odbouráváním odpadů a zneškodňování vedlejších produktů vznikajících při různých průmyslových procesech.¹³

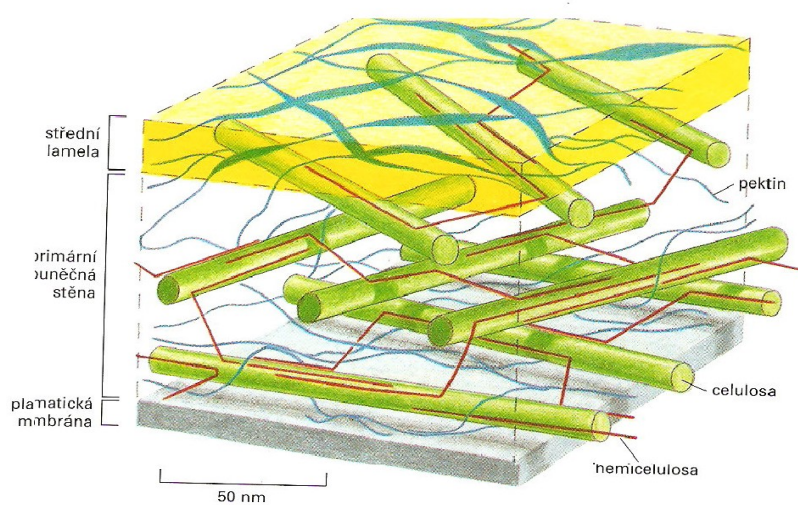
2 Cíl práce

1. Ověření produkce pektináz
2. Ověření produkce celulás
3. Vliv koncentrace inokula na produkci sledovaných enzymů
4. Stanovení teplotního optima polygalakturonázy
5. Sledování změn pH v průběhu kultivace

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Rostlinná buněčná stěna

Buněčná stěna rostlin je tvořena několika vrstvami. Podpůrný skelet tvoří vlákna celulosy (asi 40 lineárních řetězců délky 1 až 7 nm o relativní molekulové hmotnosti přes 10^6 , propojených vodíkovými můstky tvoří elementární fibrilu). Pojivo tvoří hemicelulosa a pektiny. Součástí celulosového podpůrného skeletu je lignin. Pojivo mezi nimi tvoří hemicelulosa a pektin. Součástí buněčných stěn rostlinných buněk jsou také strukturální bílkoviny a řada enzymů.¹



Obr. 3.1: Rostlinná buněčná stěna²

3.1.1 Celulosa

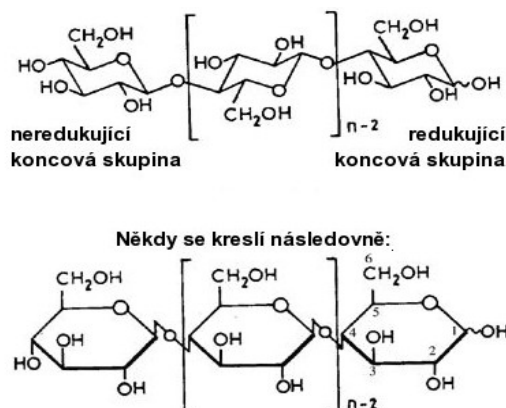
Celulosa je nejrozšířenější organickou sloučeninou biosféry. Je polysacharidem glukosy. Glukan celulosy tvoří podstatnou část stěn rostlin a některých bakterií a je hlavní součástí podpůrných tkání rostlin.

Je tvořena vláknitými molekulami, které vznikají spojováním 1400 až 10 000 zbytků D-glukosy $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidovými vazbami.

Při částečné hydrolyze celulosy vzniká převážně celobiosa, která je považována za stavební jednotku polysacharidů.

Stavební materiál rostlin vzniká spojením několika paralelně uspořádaných celulosových řetězců stabilizovaných vodíkovými vazbami a tmel mezi nimi vytvářejí další polysacharidy (např. hemicelulosa).¹

Celulosa je syntetizována na vnějším povrchu buňky enzymovými komplexy, které jsou zanořeny do plazmatické membrány. Tyto komplexy transportují sacharidové monomery přes membrány a začleňují je do sady rostoucích polymerových řetězců v místě, kde jsou přichyceny k membráně. Každá sada řetězců vytváří celulosovou mikrofibrilu. Jak se enzymové komplexy za současného syntetizování pohybují membránou, zůstávají za nimi orientované celulosové fibrily. Dráhy, po kterých se enzymové komplexy pohybují, určují směr, ve kterém je celulosa uložena v buněčné stěně.²



Obr. 3.2: Vzorec celulosy¹

V potravinách tvoří značný podíl neškrobových polysacharidů a to tzv. nerozpustné vlákniny. V ovoci a zelenině bývá podle druhů přítomno kolem 1-2 % celulosy, v obilovinách a luštěninách 2-4 %, v pšeničné mouce 0,2-3 % (podle stupně vymletí), ale v otrubách 30-35 %. Celulosa tvoří také 40-50 % dřevní hmoty, 80 % lněných a 90 % bavlněných vláken.

Jednotlivé makromolekuly celulosy interagují prostřednictvím vodíkových vazeb vzájemně a tvoří ve stěnách buněk třírozměrné struktury, které se nazývají celulosavá vlákna nebo celulosové mikrofibrily. Mají tloušťku přibližně 10 až 20 nm, délku několik μm a obsahují 30 až 100 makromolekul celulosy.³

Celulosu dovedou štěpit jen některé mikroorganismy (některé houby a bakterie) pomocí enzymového komplexu celulas. Celulosa je odbourávána až na glukosu extracelulárním enzymovým komplexem celulas.¹

3.1.2 Lignin

Lignin je polymer vyztužující a zpevňující buněčné stěny rostlinných buněk. Chemicky jej nelze přesně definovat. Chemické složení ligninu se různí podle rostlinného druhu. Primární

prekurzory ligninu se tvoří z 4-hydroxyskořicové kyseliny, vznikající z fenylalaninu nebo tyrozinu.¹

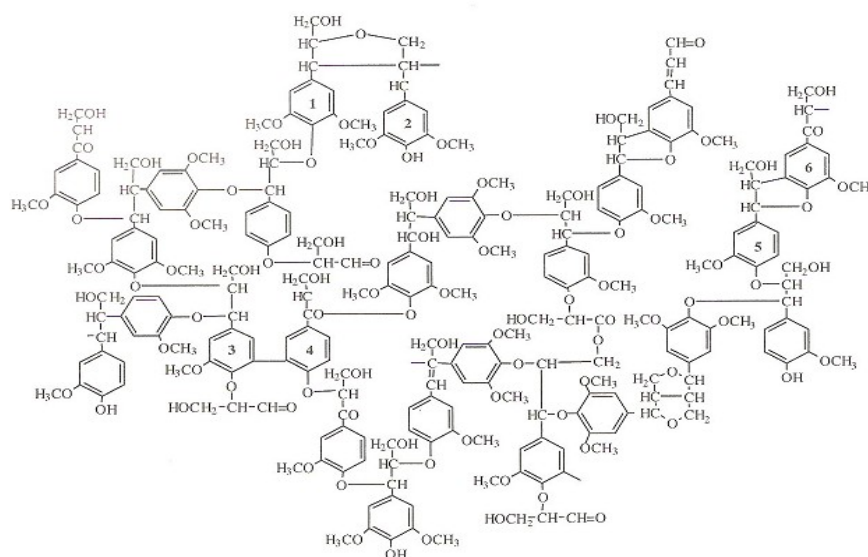
Lignin je kovalentně vázán na polysacharidy buď přímo prostřednictvím cukerných zbytků, nebo nepřímo prostřednictvím ferulové kyseliny, kterou jsou některé polysacharidy esterifikovány.

Je jednou z hlavních komponent dřevní hmoty, kde tvoří asi 25 % biomasy. Podobné složení mají také skořápky ořechů. V menším množství je lignin součástí vlákniny ovoce, zeleniny a obilovin. Stěny primárních buněk lignin prakticky neobsahují. Velký obsah je ve stěnách lignifikovaných sekundárních buněk, jako jsou buňky obilovin (otruby), které obsahují kolem 8 % ligninu.³

V dřevině jehličnanů je obsaženo až 50 % ligninu. Pro jeho uvolnění z dřeviny, použití k výrobě celulosy a papíru, se používá natriumbisulfit (vzniká odpad sulfidové výluhy). Tvoří až 20 % celkových znečištění vodních toků.¹

Vyskytuje se také v malém množství v lihovinách zrajících v dubových sudech, kam se dostává výluhem ze dřeva.

V zaživacím traktu nedochází k rozkladu ligninu, štěpí se pouze vazby mezi ligninem a ostatními polymery.³



Obr. 3.3: Základní struktura ligninu³

3.1.3 Hemicelulosa

Hemicelulosa je polysacharid, který tvoří tmel mezi celulosovými řetězci.¹

U ovoce, většiny zelenin, okopanin a luštěnin jsou důležitými hemicelulasami xyloglukany, u obilovin arabinoxylany a tzv. β -glukany, u některých luštěnin galaktomannany.³

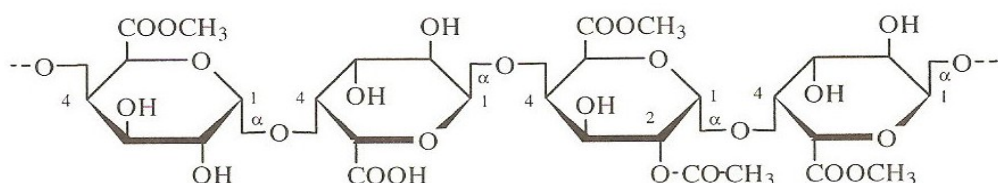
3.1.4 Pektin

Nachází se v pletivech vyšších rostlin jako součást stěn primárních buněk a mezibuněčných prostor. Vzniká a ukládá se hlavně v ranných stádiích růstu, kdy se zvětšuje plocha buněčných stěn.³

Pektiny plní stavební funkci v rostlinách a některých mikroorganismech.¹ Jsou rozpustné ve vodě a nerozpustné ve většině organických rozpouštědel.³ Jsou to částečně methylované poly-D-galakturonové kyseliny s vazbami $\alpha(1\rightarrow4)$. Tvoří komplexy s celulosou (pektocelulosa) i s jinými polysacharidy (arabinany, galaktany).¹

Pektiny jsou přítomny ve všech druzích ovoce a zeleniny. Jejich obsah není vysoký, v ovocné dužině klesá okolo 1 %. Ze zeleniny nejvíce pektinu obsahují rajčata a mrkev.³

Pektinové látky se používají v konzervářském průmyslu k přípravě např. džemů nebo marmelád. Vyrábějí se extrakcí vhodného materiálu, tzv. jablečný nebo citrusový pektin. V současné době se pektiny uplatňují i v prevenci cévních onemocnění.¹



Obr. 3.4: Základní struktura pektinu³

3.2 Termofilní mikroorganismy

Termofilní mikroorganismy jsou mikroorganismy, které mají optimální teplotu růstu 45 °C nebo vyšší. Ale většina mikroorganismů z této skupiny má optimální teplotu růstu 50 až 60 °C. Některé mohou růst i při teplotě 80 °C (např. některé kmeny druhu *Bacillus stearothermophilus*).⁴

Termofilní bakterie se vyskytují v půdě, horkých vřídlech, kompostech, seně, obilí atd. a mohou způsobovat vznícení těchto materiálů.¹ Termofilní bakterie mají své zástupce mezi

rody *Bacillus* (např. *B. stearothermophilus*), *Clostridium* (*C. thermosaccharolyticum*), *Lactobacillus* (*L. delbrucekii subsp. delbrueckii*, *L. delbrucekii subsp. bulgaricus*), mezi aktinomycetami (např. rody *Thermoactinomyces* a *Thermomonospora*). Vyznačují se mimořádně vysokou metabolickou aktivitou a rychlostí růstu za optimální teploty. Vysoká metabolická aktivita při těchto teplotách je výsledkem odlišného složení bílkovinných složek jejich enzymů.⁴

Základní metabolické rysy termofilů jsou kompletní cyklus trikarboxylových kyselin, včetně glyoxylátového cyklu, Embden-Meyerhoffova dráha u většiny druhů a často modifikovaný dýchací řetězec.¹⁶

Využití termofilních mikroorganismů v průmyslu v posledních letech značně vzrůstá. Biotechnologické aplikace se zabývají produkcí široké škály extracelulárních enzymů nebo velmi významným zpracováním či odbouráváním odpadů a zneškodňování vedlejších produktů vznikajících při různých průmyslových procesech.¹³ Používají se také k termofilnímu aerobnímu biologickému čištění odpadních vod, výhodou této metody je rychlá biodegradace vazby, nízký výnos kalu a výborná stabilita procesu.¹⁸

Extrémofilní mikroorganismy jsou mikroorganismy schopné přežít a růst v podmínkách nepříznivých pro ostatní mikroorganismy. Jejich nejvýznamnějšími zástupci jsou: termofilní mikroorganismy (extrémní teploty), osmofilní mikroorganismy (extrémní pH), halofilní mikroorganismy (extrémní koncentrace iontů) a barofilní mikroorganismy (extrémní tlak). Extrémní mikroorganismy jsou zajímavé zejména proto, že v důsledku adaptace na extrémní prostředí často obsahují unikátní sekvence aminokyselin, bylo z nich izolováno množství zajímavých enzymů a často tvoří i speciální metabolity. Nejzajímavější skupinou extrémofilů tvoří termofilní mikroorganismy, které jsou schopné růst při teplotách převyšující teploty považované za normální pro běžný biologický systém. Hlavními zástupci termofilních mikroorganismů jsou bakterie rodu *Bacillus* a *Thermus*.¹⁷

3.3 Bakterie

Bakterie jsou prokariotické buňky.⁶ Tvar buněk bakterií je nejčastěji tyčinkovitý, méně často kulovitý.⁴ Rozměry buněk se udávají v μm . Jejich průměr je v rozmezí 0,5 až 1 μm . Tyčinkovité bakterie mají tloušťku 3 μm a délka dosahuje 10 až 50 μm .⁶

Pevnost a neohebnost buněčné stěny je dána přítomností peptidoglykanů (neboli mukopeptidy nebo také mureiny). Obsahují polysacharidová vlákna tvořená molekulami N-

acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny. Řetězce polysacharidů jsou vzájemně spojeny peptidovou vazbou přes karboxylovou skupinu muramové kyseliny. Další složky buněčné stěny jsou rozdílné u gramnegativních a grampozitivních bakterií.

U grampozitivních bakterií je silná peptidoglykanová vrstva vyplněna teichoovou kyselinou. Teichoová kyselina je vázána kovalentní vazbou na muramovou kyselinu. Gramnegativní bakterie teichoovou kyselinu neobsahují, mají poměrně tenkou vrstvu peptidoglykanu. Na peptidoglykan grampozitivních bakterií jsou ještě vázány polysacharidy (glukosy, galaktosy, mannosy). Složení těchto sacharidů je specifické pro jednotlivé skupiny bakterií a je zodpovědné za imunochemické reakce.

Cytoplazmatická membrána bakterií je složena z fosfolipidů a proteinů. Je sídlem dýchacích enzymů, systému oxidační fosforylace, enzymů syntézy a hydrolýzy fosfolipidů a konečné fáze syntézy složek buněčné stěny a pouzdrových obalů. V cytoplazmatické membráně jsou také přítomny bílkovinné přenašeče.

Většina bakterií se rozmnožuje dělením. Při dělení, ve střední části buňky začne z cytoplazmatické membrány vyrůstat prstencová vychlípenina, až se vytvoří přepážka rozdělující buňku na dvě stejně velké části. Přepážka se pokryje buněčnou stěnou a z původní jedné buňky vzniknou dvě, které se od sebe buď oddělí nebo zůstanou spojeny v řetízku. Jenom několik druhů bakterií se rozmnožuje pučením. Při pučení má dceřiná buňka (pupen) zpočátku velmi malé rozměry a postupně dorůstá. S mateřskou buňkou je přitom stále spojena úzkým krčkem (u některých druhů je velmi dlouhý).

Před rozdělením bakteriální buňky dochází k replikaci chromozomální DNA.

Celková doba od vzniku dceřiné buňky k jejímu dalšímu rozdělení se nazývá generační doba. Je to doba, za kterou dojde ke zdvojnásobení počtu buněk a také ke zdvojnásobení buněčné hmoty. Generační doba většiny bakterií je 15 až 30 minut.

Většina bakterií roste v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí. Při příliš nízkém pH se přestávají rozmnožovat a ustává jejich hlavní metabolická činnost. U bakteriálních spor rodu *Bacillus*, *Clostridium* a *Desulfotomaculum* zabraňuje kyselé pH klíčení spor a jejich přeměně ve vegetativní formu.

Voda představuje 75 až 90 % hmotnosti mikrobiálních těl. Molekuly vody mohou volně difundovat cytoplazmatickou membránou mikroorganismů. Dostatečné množství vody musí být také obsaženo ve vnějším prostředí, aby buňka neztratila vnitrobuněčnou vodu a možnost metabolismu. Bakterie jsou schopny se rozmnožovat v živných prostředích o vodní aktivitě

v rozmezí 0,99 až 0,93. Některé bakterie se však rozmnožují pouze za nízkých vodních aktivit 0,65 až 0,63 (tyto bakterie se nazývají halofilní).⁴

Aerobní, termofilní bakterie se nachází v kompostech v teplotním rozmezí 65 až 82 °C. Optimum růstu je 65 až 75 °C.¹⁰

3.3.1 Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* je velmi rozsáhlý a v přírodě velmi rozšířený.⁴ Jsou to sporulující grampozitivní, gramlabilní až gramnegativní sporulující aerobní nebo fakultativně anaerobní tyčinky a koky.⁶ Mají bohaté enzymové vybavení, takže mohou rozkládat nejrůznější organické sloučeniny. Většina druhů má velmi aktivní amylolytické enzymy, které štěpí rostlinné pektiny a většina druhů má také velmi aktivní proteolytické enzymy, takže se uplatňují při anaerobním a aerobním rozkladu bílkovin.⁴

Vyskytují se v půdě, v potravinách, v tepelně upravených a nedostatečně chlazených jídlech.⁶

Spory těchto rodů snášejí i několikahodinový var. Některé kmeny rodu *Bacillus* nejsou schopny sporulace, a to v důsledku poškození některého genu nutného pro průběh tohoto procesu. U rodu *Bacillus* bylo zjištěno kolem 50 genů, které musí být všechny nepoškozené, aby sporulace proběhla až ke zralé a dokonalé spoře. Za růstových podmínek je projev těchto genů v buňce potlačen. Geny jsou roztroušeny na různých místech bakteriálního chromozomu.

Endospory se vyznačují řadou vlastností, které umožňují přežívání spor za nepříznivých podmínek. V potravinářství a kvasné technologii mají tyto vlastnosti (termorezistence spor, zvýšená odolnost k jedovatým látkám, mírně zvýšená radiorezistence, zvýšená rezistence k vysychání, hladovění a jiným nepříznivým podmínkám) velmi negativní význam.

Spory rodu *Bacillus* jsou usmrceny při teplotě 120 °C nebo vyšší během 10 až 15 minut. Při teplotě 100 °C by bylo k jejich usmrcení zapotřebí 4 až 20 hodin.

Kyselé pH zabraňuje klíčení spor a jejich přeměně ve vegetativní formu.

Příslušníci rodu *Bacillus* tvoří amylasy, které štěpí škrob. Amylasy se průmyslově připravují nejčastěji pomocí *Bacillus subtilis*. Uplatňují se v pivovarství a v textilním průmyslu. Rody *Bacillus* jsou také vhodným zdrojem proteas. Z potravinářského hlediska je důležitá také mikrobiální produkce některých nukleotidů, především inosin-5-monofosfátu, který se používá jako ochucovadlo, neboť zdůrazňuje masovou chuť.

Některé druhy tvoří slizová pouzdra polysacharidové povahy, což způsobuje nežádoucí nitkovitost pečiva a pšeničného chleba. *Bacillus cereus* produkuje toxiny, které mohou být příčinou otrav, k otravám dochází při pomnožení této bakterie v potravíně na koncentraci buněk 10^7 g^{-1} potraviny (u dětí stačí koncentrace 10^5 g^{-1}), otrava se projevuje 12 až 13 hodin po použití potraviny. Onemocnění u lidí a zvířat je nazýváno antraxem nebo-li snětí slezinou. Význam těchto bakterií: rozklad potravin, otravy, průmyslové využití, patogenní a koloběh prvků v přírodě.⁴

3.3.2 Rod *Thermus*

Jsou to gramnegativní tyčinkovité nepohyblivé buňky, které nevytvářejí spóry.⁷ Buňky jsou 0,5 až 0,8 mm široké, dlouhá vlákna mohou být také stočená.²²

Tento rod je výhradně izolován z termálních přírodních oblastí, jako jsou např. horká vřídla. Ale byl i nalezen v kompostu a v domácích ohřívacích vody.

K růstu na jednoduchém uhlíkatém substrátu s anorganickými solemi vyžadují doplňkové vitamíny. Je však velmi citlivý na nízké a vysoké koncentrace substrátu. Při vystavení slunečnímu záření mají zástupci rodu *Thermus* schopnost tvořit pigmenty (žluté, oranžové a červené).⁷

Thermus thermophilus snáší extrémně vysoké teploty. Tento rod byl izolován z přirozeného prostředí v Japonsku. Jeho optimální teplota růstu je 85 °C. *Thermus thermophilus* se stal model organismu v strukturní biologii a některé z jeho enzymů se využívají v biotechnologii.⁸

T. aquaticus byl izolován ve vřídlech, ve vodovodu s horkou vodou. Jsou to gram negativní, nesporotvorné a nepohyblivé tyčinky, které mají často tvar dlouhých vláken. Všechny izolované rody mají potlačený růst při nízké koncentraci cycloserinu, streptomycinu, penicilinu, novobiocinu a chromfenikolu. vyžadují při růstu vitamíny nebo aminokyseliny. Jako uhlíkový zdroj slouží sacharidy a organické kyseliny a jako zdroj dusíku slouží NH_4^+ glutamát. PH optimum 7,5 až 7,8, optimální teplota růstu je 70 °C, max. 79 °C a minimum asi 40 °C. Doba k rozdělení buňky je asi 50 minut.¹¹

3.4 Enzymy

Enzymy nacházíme ve všech živých systémech a předpokládá se, že i nejjednodušší buňky obsahují přes 3000 enzymů. Patří mezi globulární bílkoviny a mají většinou (60 až 70 %)

povahu složených bílkovin.

Enzymy patří mezi biologické katalyzátory, které řídí řadu biologických reakcí. Enzymy působí za mírných reakčních podmínek, a jejich katalytické schopnosti jsou regulovány koncentrací jiných sloučenin než je substrát.

Jsou to látky různé chemické povahy, kdy jejich molekuly obsahují většinou heterocyklus. Reakce probíhá v malé oblasti enzymové molekuly, v tzv. aktivní centru nebo-li aktivním místě.

Na činnost enzymů má vliv pH prostředí a teplota. Většina enzymů je citlivá na změny pH. Což je dáno tím, že velkou část molekuly tvoří bílkovina s terciární strukturou, která obsahuje především vodíkové vazby. Hodnota pH, při které aktivita enzymů dosahuje maxima se nazývá pH-optimum. U většiny enzymů je pH-optimum mezi 5 až 7. Se vzrůstající teplotou roste energie molekul, roste počet jejich srážek a dochází k urychlení chemické reakce. Vliv teploty na molekulu je od 10 do 40 °C, kdy po překročení kritické teploty aktivita enzymů rychle klesá. Při nízkých nebo vysokých teplotách je aktivita enzymů silně potlačena.¹

Mikrobiální enzymy můžeme rozdělit do čtyř skupin:⁴

1. Konstitutivní enzymy, které jsou přítomny v buňce za jakýchkoliv vnějších podmínek.
2. Indukovatelné enzymy, které jsou v buňce syntetizovány jen tehdy, je-li v živném prostředí sloučenina, tzv. induktor, jejíž přeměnu tyto enzymy uskutečňují.
3. Reprimovatelné enzymy, které jsou v buňce syntetizovány jen tehdy, není-li ve vnějším prostředí přítomna sloučenina produkovaná metabolickým řetězcem, jehož součástí jsou tyto enzymy.
4. Indukovatelné enzymy, které podléhají ještě represi.⁴

Podle místa působení můžeme enzymy rozdělit na intracelulární a extracelulární.

Intracelulární enzymy, kterých je většina, zůstávají uvnitř buňky, ve které vznikly, a tam vykonávají své specifické funkce. Fungují buď v rozpuštěné formě, nebo vázané v různých biologických strukturách a tvoří většinou organisované funkční komplexy, multienzymové jednotky nebo multifunkční enzymy.¹

Extracelulární enzymy produkují hlavně bakterie a jsou obecně lokalizovány vně cytoplazmatické membrány.¹² V menší míře mohou také vzniknout z autolytických procesů a dalších organismů.²³ Jsou buňkami, které je vyrobily, vylučovány a nacházíme je tedy v četných tkáňových kapalinách, např. u živočichů v trávicích šťávách, krvi, mozkomíšním moku. Některé mikroorganismy uvolňují do kultivačního prostředí extracelulární enzymy,

kteře katalyzují hydrolasu živin.¹ Extracelulární enzymy musí být k dispozici pro bakteriální růst a výživové cykly. Živné půdy pro hydrolyzu jsou obecně protein, sacharidy, tuky a organický fosfor.¹²

3.4.1 Celulolytické enzymy

Celulasy jsou komplexem enzymů s rozdílnou specifitou hydrolyzovat glykosidické vazby.¹⁹ Enzymatická hydrolyza celulasy je uskutečňována celulasy, které jsou vysoce specifické. Produktem hydrolyzy jsou obvykle redukující cukry jako je glukosa.²⁰

Bakteriální celulasy jsou enzymy konstitutivní, produkované bakteriemi např. *Clostridium thermocellum* a *Pseudomonas fluorescens var. cellulasa*.²¹

Celulolytické mikroorganismy produkují celulolytické systémy, které se skládají z různých druhů celulasy, které jsou rozdílné pro různé druhy.²⁴ Četnost a rozmanitost enzymů vylučovaných mikroorganismy odráží komplexní chemické složení z polysacharidů obklopující celulosová vlákna v rostlinné buněčné stěně. Celý celulosový enzymový komplex je nutný pro degradaci buněčné stěny.¹⁶

Do aplikace celulolytických enzymů se vkládají velké naděje, protože celulosové suroviny (dřevo a dřevní odpady, sláma, bagasa, odpadní papír, odpad při zpracování bavlny aj.) nejsou dosud plně využívány jako suroviny pro biotechnologie a navíc patří mezi obnovitelné zdroje.¹⁴

3.4.2 Endo- a exo- polygalakturonasy

Tyto enzymy jsou součástí enzymových systémů, které se podílejí na metabolismu pektinových látek, což jsou komplikované strukturní heteropolysacharidy, které jsou obsaženy ve všech buňkách vyšších rostlin (zejména ve střední lamelle a buněčné stěně). Pektinové látky, ačkoli se vyskytují v poměrně malém množství (okolo 1 %), hrají významnou úlohu v konzistenci ovoce a zeleniny i jiných rostlinných materiálů. V technologii hrají úlohu pozitivní (např. při výrobě džemů) i negativní (např. při filtraci ovocných šťáv). Vzhledem ke komplikované struktuře pektinových látek se na jejich odbourávání podílejí tři skupiny enzymů (řazené podle enzymové klasifikace do dvou tříd), a to hydrolasy glykosidasy a esterasy a lyasy.

Z technologického hlediska se dělí pektolytické enzymy na deesterifikační enzymy (tj. pektinesterasy) a depolymerasy (tj. enzymy štěpící polysacharidový řetězec). Polysacharidový řetězec může být štěpen jednak hydrolysou glykosidových vazeb nebo β -eliminací (lyasy).

Depolymerační glykosidasy bývají děleny na:

- a) polymethylgalakturonasy (PMG, tj. enzym působící především na pektín)
- b) polygalakturonasy (PG, tj. enzymy působící především na pektinovou kyselinu čili deesterifikovaný pektin).

Daleko významnější a zcela opodstatněné je dělení na endo- a exo-ty, přičemž výskyt endopolygalakturonas je četnější. "Endo-ty (pektindepolymerasa či polygalakturonasa) je zařazen pod nomenklaturním číslem EC 3.2.1.15 (poly 1,4- α -D-galakturonid-galakturonohydrolasa). Polygalakturonasy se vyskytují u vyšších rostlin, mikroorganismů, protozoí i u hmyzu.

Z rostlinných materiálů byly charakterisovány polygalakturonasy především u rajčat a avocada (endo-ty) a karotky (exo-ty).

Rychlost hydrolysy substrátu je značně závislá na stupni esterifikace a polymerace (tj. velikosti molekuly).

U některých mikroorganismů (*Bacillus sp.*) byly prokázány enzymy, které štěpí oligogalakturonasy na monomerní jednotky (tj. galakturonové kyseliny). Mají charakter exoenzymů, štěpí substráty od redukujícího i od neredukujícího konce, ale s vysokou preferencí pro krátké řetězce.¹⁴

3.4.3 Ligninasy

Ligninasa je jméno pro skupinu izoenzymů, které katalyzují oxidační depolymerizaci ligninu. Ligninasy jsou extracelulární a jsou vyprodukované během sekundárního metabolismu.¹¹

Molekula ligninu je oxidována a degradována ligninásovým systémem, který je složen ze tří enzymů: lignin peroxidasa, manganese dependent peroxidasa a laccasa. Lignin peroxidasa, mangan peroxidasa a laccasa jsou nejdůležitější enzymy měnící molekulu ligninu.¹⁵

Všechny ligninasy jsou citlivé na inaktivaci peroxidem vodíku.²³

3.4.4 Hemicelulasy

Jedná se o enzymy hydrolyzující glykosidické vazby (tzv. glykosidické hydrolázy) a enzymy hydrolyzující esterové vazby acetátu a ferulové kyseliny (tzv. uhlovodíkové estery).²⁵

3.5 Submerzní kultivace

Při submerzní (hloubkové, hlubinné) kultivaci rostou mikroorganismy v kapalném médiu. Submerzní technikou se provádějí všechny významné průmyslové velkoobjemové procesy (např. výroba biomasy a bílkovin, různé fermentační výroby, produkce antibiotik a enzymů a zpracování odpadů).

Můžeme ji realizovat buď kontinuálně nebo diskontinuálně (statický, vsádkový způsob). Při vsádkovém způsobu se bioreaktor naplní a zaočkuje mikrobiální kulturou. Buňky se množí a současně se spotřebovávají živiny v médiu. Podmínky kultivace se plynule mění s časem a po určité době se namnožená kultura vypustí a zpracuje. Používá se při výrobě antibiotik, dalších sekundárních metabolitů a aminokyselin.

Při kontinuální kultivaci se mikroorganismy plynule doplňují s novým médiem a staré médium se suspendovanými mikroorganismy se odstraňují odtokem, který může být kontinuálně zpracováván. Pracuje se s otevřeným systémem, který směřuje k ustálenému stavu. Systém je stabilizován limitací jednoho základního (růstového) substrátu. Buňky rostou za konstantních podmínek okolí. Jsou dva typy kontinuální kultivace 1, homokontinuální kultivace (kultura je v celém objemu v důsledku intenzivního míchání homogenní, kultivace může být jednostupňová nebo vícestupňová). A 2, heterogenní kultivace (složení kultury je prostorově různorodé). Používá se pro výrobu, kdy žádaným produktem jsou samostatné buňky (pekařské droždí, krmná biomasa) nebo metabolity, které se tvoří plynule při růstu buněk (fermentační produkty).¹

4 Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a přístroje

4.1.1 Použité chemikálie

- karboxymethylcelulosa – CMC, Feinbiochemica-Heidelberg, Germany
- D-galakturonová kyselina, Fluka AG, Chemische Fabrik, CH-9470 Buchs SG
- glukosa – $C_6H_{12}O_6$, Spofa
- kvasničný extrakt, HiMedia Lab. Limited, Mumbai – 40086, India

Všechny ostatní chemikálie byly použity od výrobce: Lachema, Brno:

- laktosa
- pepton
- kyselina octová - CH_3COOH
- octan sodný - CH_3COONa
- kyselina sírová - H_2SO_4
- dihydrogenfosforečnan draselný - KH_2PO_4
- hydrogenfosforečnan draselný - K_2HPO_4
- síran hořečnatý – $MgSO_4$
- hepta hydrát síranu hořečnatého - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- síran amonný – $(NH_4)_2SO_4$
- uhličitan sodný – Na_2CO_3
- hydrogenuhličitan sodný - $NaHCO_3$
- chlorid sodný - $NaCl$
- síran sodný - Na_2SO_4
- síran měďnatý – $CuSO_4$
- hydrogenarzeničnan sodný p.a. - Na_2HAsO_4
- molybdenan amonný p.a. - $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$

4.1.2 Použité přístroje

- pH metr MH 171
- spektrofotometr UV/VIS HELIOS DELTA – Thermospectronic, England

- sušárna Memmert, model 100-800 - Schwabach
- třepačka Heidolph – Fischer Scientific, Germany
- ultracentrifuga Eppendorf centrifuge 5417R
- váhy Scaltec, SAS 50 - USA
- vodní lázeň, polystat cc1

4.2 Použitý software

- Microsoft Word XP
- Microsoft Excel XP

4.3 Kultura a její uchování

- ke stanovení byla použita směsná kultura rodu *Thermus a Bacillus*. Kultura byla izolována z odpadních vod Bystřice pod Hostýnem (V & K Kroměříž a.s.). Odstředěná a promytá biomasa se uchovává v mrazicím boxu při teplotě -30 °C v Eppendorfových kyvetách s glycerolem v poměru 1:2.

4.4 Použitý substrát

- karboxymethylcelulosa
- pektín
- polygalakturonasa
- D-glukosa

4.5 Příprava roztoků

4.5.1 Příprava Somogyiho činidel

Somogyi I

12 g $C_2H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$, 16 g $NaHCO_3$ a 18 g $NaCO_3$ bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody. 144 g Na_2SO_4 byl pomalu přidáván do 600 ml teplé destilované vody. Po rozpuštění všech látek byly oba roztoky následně smíchány.

Somogyi II

4 g $CuSO_4$, 36 g Na_2SO_4 byly rozpuštěny ve 200 ml destilované vody.

4.5.2 Příprava Nelsonova roztoku III

25 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno ve 460 ml destilované vody, 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ byly rozpuštěny ve 25 ml destilované vody a pomalu bylo přidáno 21 ml konc. H_2SO_4 , oba roztoky byly smíchány. Takto připravený roztok byl temperován 48 hodin v termostatu při teplotě 38 °C.

4.5.3 Příprava substrátu karboxymethylcelulosity

Pro přípravu 1% roztoku CMC v octanovém pufru o pH 5,4 bylo ke 40 ml destilované vody postupně přidáván 1 g CMC za intenzivního míchání. Poté bylo přidáno 41,2 ml základního roztoku octanu sodného a pH bylo upraveno kyselinou octovou na 5,4. Roztok byl následně doplněn destilovanou vodou v odměrné baňce o objemu 100 ml.

4.5.4 Příprava substrátu pektanu sodného

Pro přípravu 0,5% roztoku pektanu sodného v octanovém pufru o pH 4,2 bylo k 50 ml destilované vody postupně přisypáno 0,5 g polygalakturonázy za intenzivního míchání. Poté bylo přidáno 13,2 ml základního roztoku octanu sodného a pH bylo upraveno kyselinou octovou na 4,2. Roztok byl následně doplněn v odměrné baňce destilovanou vodou na 100 ml.

4.5.5 Příprava kultivačního laktosového média

1 g laktózy, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g KH_2PO_4 - čistý, 0,5 g kvasničného extraktu a 1,5 g peptonu. Roztok byl rozpuštěn a doplněn destilovanou vodou na objem 250 ml.

4.5.6 Příprava kultivačního glukosového média

1,6 g D-glukózy, 0,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,16 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,4 g KH_2PO_4 - čistý, 0,8 g kvasničného extraktu a 2,4 g peptonu. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 400 ml.

4.5.7 Příprava kultivačního 1% CMC média

4 g 1% CMC, 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g K_2HPO_4 -primární, 0,2 g MgSO_4 , na špičku nože kvasničného extraktu. Roztok byl doplněn na objem 400 ml a pH roztoku bylo upraveno nasyceným roztokem Na_2CO_3 na hodnotu 6,5.

4.5.8 Příprava kultivačního média – pektín

2 g pektínu, 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g K_2HPO_4 -primární, 0,2 g MgSO_4 , na špičku nože kvasničného extraktu. Roztok byl doplněn na objem 400 ml a pH roztoku bylo upraveno nasyceným roztokem Na_2CO_3 na hodnotu 6,5.

4.6 Pracovní postupy jednotlivých metod

4.6.1 Stanovení redukujících látek podle Somogyiho a Nelsona

Do zkumavek bylo napipetováno 0,5 ml Somogyiho činidla (I + II v poměru 4:1) a bylo přidáno 0,5 ml supernatantu. Zkumavka s blankem obsahovala místo kultivačního média 0,5 ml destilované vody. Zkumavky byly 10 minut provařeny ve vodní lázni a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Poté k nim bylo přidáno 0,5 ml Nelsonova roztoku (činidlo III). Nakonec bylo přidáno ke každé zkumavce 3,5 ml destilované vody. Zkumavky byly dobře promíchány a byla proměřena absorbance na spektrofotometru proti blanku při 530 nm.

4.6.2 Stanovení rozpustných bílkovin – Biuretovou metodou

Do zkumavek byl napipetován 1 ml supernatantu z kultivační suspenze a objem byl doplněn na 3 ml fyziologickým roztokem. Jako slepý vzorek byly použity 3 ml fyziologického roztoku. Do všech zkumavek bylo přidáno po 0,3 ml biuretova činidla a po 20-30 minutách inkubace byla změřena absorbance na spektrofotometru při 550 nm proti slepému vzorku.

4.6.3 Stanovení specifické celulytické aktivity

Stanovení celulytické saktivity bylo provedeno v supernatantu a v suspenzi při teplotě 5 °C. Jako substrát byl použit 1% roztok karboxymethylcelulosity (CMC) v octanovém tlumivém roztoku (pH = 5,4).

Aktivita celulas byla stanovena spektrofotometricky měřením přírůstku redukujících skupin metodou podle Somogyiho a Nelsona při laboratorní teplotě. Aktivita enzymů byla vypočítána podle vztahu:

$$\alpha = (A_{530} \cdot f) / (t \cdot V).$$

α - aktivita stanovovaného enzymu

A_{530} - absorbance naměřená po jednogodinové inkubaci enzym-substrát

f - přepočítávací faktor koncentrace redukujících skupin pro absorbanci rovnou 1 (mmol / l)

t - čas (min)

V - objem odebraný z reakce

Vypočítané aktivity byly vyjádřeny v relativních hodnotách [%].

Stanovení celulolytické aktivity v supernatantu

Do zkumavky umístěné ve vodní lázni temperované na 50 °C byl odpipetován 1 ml substrátu a k němu byl přidán 1 ml supernatantu z kultivační suspenze. Ihned po smíchání bylo odpipetováno 0,5 ml do předem připravených zkumavek s 0,5 ml směsi Shomogyiho činidla (I + II v poměru 4:1). Tato zkumavka byla použita jako slepý vzorek. Zbytek směsi substrátu a supernatantu byl ponechán 1 hodinu ve vodní lázni a poté bylo odpipetováno 0,5 ml do zkumavky se Shomogyiho činidlem. všechny zkumavky byly povařeny 10 minut a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Nelsonova roztoku a 3,5 ml destilované vody, po promíchání a centrifugování (30 s při 10000 rpm) byla změřena absorbance na spektrofotometru při 530 nm proti slepému vzorku.

Stanovení celulolytické aktivity v suspenzi

Do zkumavky umístěné ve vodní lázni temperované na 50 °C byl odpipetován 1 ml substrátu a k němu byl přidán 1 ml supernatantu z kultivační suspenze. Ihned po smíchání bylo odpipetováno 0,5 ml do předem připravených zkumavek s 0,5 ml směsi Shomogyiho činidla (I + II v poměru 4:1). Tato zkumavka byla použita jako slepý vzorek. Zbytek směsi substrátu a supernatantu byl ponechán 1 hodinu ve vodní lázni a poté bylo odpipetováno 0,5 ml do zkumavky se Shomogyiho činidlem. všechny zkumavky byly povařeny 10 minut a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Po ochlazení bylo přidáno 0,5 ml Nelsonova roztoku a 3,5 ml destilované vody, po promíchání byla změřena absorbance na spektrofotometru při 530 nm proti slepému vzorku.

4.6.4 Stanovení specifické aktivity polygalakturonás

Stanovení polygalakturonasové aktivity bylo provedeno v supernatantu i v suspenzi při laboratorní teplotě. Jako substrát byl použit 0,5% roztok pektanu sodného v octanovém tlumivém roztoku (pH = 4,2).

Aktivita polygalakturonás byla stanovena spektrofotometricky měřením přírůstku redukujících skupin metodou podle Somogyiho a Nelsona při laboratorní teplotě. Aktivita enzymů byla vypočítána podle vztahu:

$$\alpha = (A_{530} \cdot f) / (t \cdot V)$$

α - aktivita stanovovaného enzymu

A_{530} - absorbance naměřená po jednogodinové inkubaci enzym - substrát

f - přepočítávací faktor koncentrace redukujících skupin pro absorbanci rovnou 1 ($\mu\text{mol/l}$)

t - čas (min)

V - objem odebraný z reakce

Vypočítaná aktivita byla vyjádřena v relativních hodnotách [%].

Stanovení specifické aktivity polygalakturonás v supernatantu

K 1 ml roztoku substrátu byl přidán 1 ml supernatantu. Z reakční směsi byly v časových intervalech 0 a 60 minut odebrány alikvoty (0,5 ml) do předem připravených zkumavek s 0,5 ml Somogyiho činidla (I + II v poměru 1:4). Po 10 minutách varu a následném ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,5 ml Nelsonova činidla a 3,5 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl spektrofotometricky měřen proti blanku při 530 nm.

Stanovení specifické aktivity polygalakturonás v suspenzi

K 1 ml roztoku substrátu byl přidán 1 ml suspenze. Z reakční směsi byly v časových intervalech 0 a 60 minut odebrány alikvoty (0,5 ml) do předem připravených zkumavek s 0,5 ml Somogyiho činidla (I + II v poměru 1:4). Po 10 minutách varu a následném ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,5 ml Nelsonova činidla a 3,5 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl spektrofotometricky měřen proti blanku při 530 nm.

4.6.5 Stanovení teplotního optima

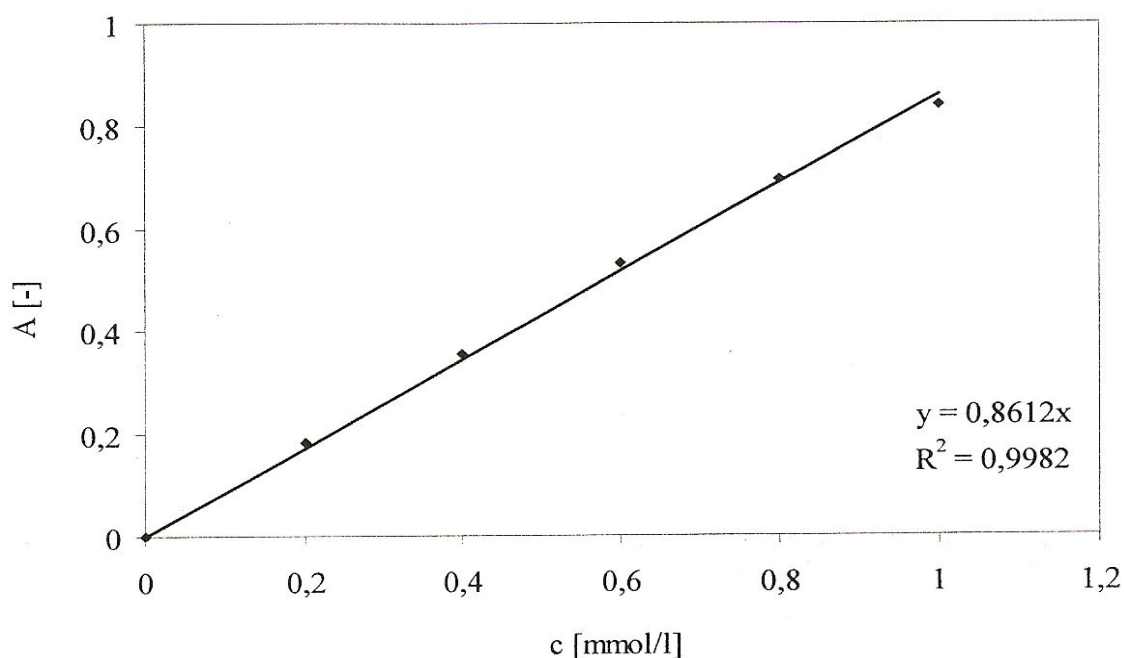
Stanovení teplotního optima bylo provedeno v supernatantu a v sedimentu. Jako substrát byl použit 0,5% roztok pektanu sodného v octanovém pufru o pH 4,2.

Stanovení bylo provedeno při teplotách 25 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C a 80 °C. Do zkumavek byl napipetován 1 ml supernatantu nebo sedimentu a k němu byl přidán 1 ml substrátu. Z reakční směsi byly v časových intervalech 0 a 60 minut odebrány alikvoty (0,5 ml) do předem připravených zkumavek s 0,5 ml se směsí Somogyiho činidla (I + II

v poměru 4:1). Po 10 minutách varu ve vodní lázni a následném ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,5 ml Nelsonova roztoku a 3,5 ml destilované vody. Po promíchání byla změřena absorbance na spektrofotometru proti banku při 530 nm.

4.6.6 Stanovení kalibrační křivky glukosy

Pro sestavení kalibrační křivky byl použit základní roztok glukosy o koncentraci 1 mmol/l. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada glukosy s koncentracemi v jednotlivých vzorcích 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 mmol/l. Ke každé zkumavce bylo přidáno 1 ml Somogyiho činidla (I + II v poměru 1:4). Zkumavka s blankem obsahovala místo vzorku 1 ml destilované vody. Zkumavky byly 10 minut provařeny ve vodní lázni a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Poté k nim bylo přidáno 1 ml Nelsonova roztoku (činidlo III) a 7 ml destilované vody. Zkumavky byly dobře promíchány a byla změřena absorbance proti blanku při 530 nm.



Graf č. 4.1: Kalibrační křivka glukosy

4.6.7 Stanovení kalibrační křivky albuminu – Biuretovou metodou

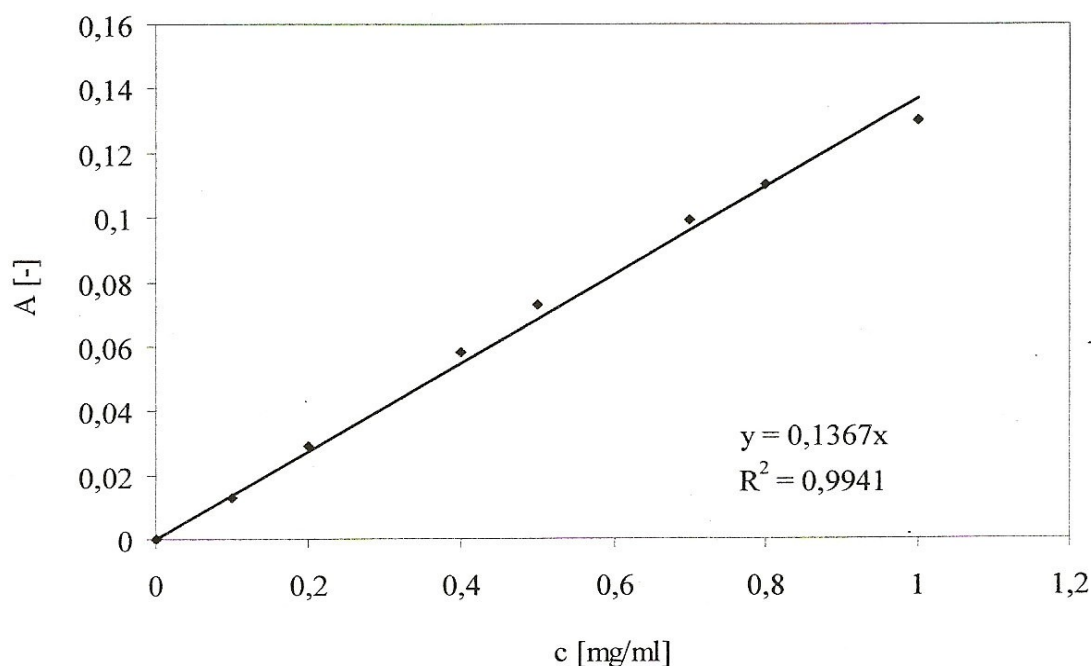
Biuretová metoda je založena na tvorbě fialově zbarvených chelátů mědi s bílkovinou. Různé bílkoviny dávají tuto reakci se stejnou intenzitou. Při stanovení neruší amonné soli. Zbarvení však musí být standartizováno buď na čistou bílkovinu, nebo se musí množství

bílkoviny stanovit jinou metodou.

Pro sestrojení kalibrační křivky byl použit základní roztok albuminu o koncentraci 3 mg/ml. Z tohoto roztoku byla připravena kalibrační řada albuminu s koncentracemi v jednotlivých vzorcích 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,7; 0,8 a 1,0 mg/ml podle tabulky č. 3.1. Ke všem zkumavkám bylo přidáno po 0,3 ml biuretova činidla a po 20 až 30 minutách byla změřena absorbance při 550 nm proti slepému vzorku.

Tab. č. 1: Sestrojení kalibrační křivky albuminu při 550 nm

Zkumavka	1	2	3	4	5	6	7	blank
Roztok albuminu [ml]	0,1	0,2	0,4	0,5	0,7	0,8	1,0	0
Fyziologický toztok [ml]	2,9	2,8	2,6	2,5	2,3	2,2	2,0	3,0
c (albuminu) [mg/ml]	0,1	0,2	0,4	0,5	0,7	0,8	1,0	0

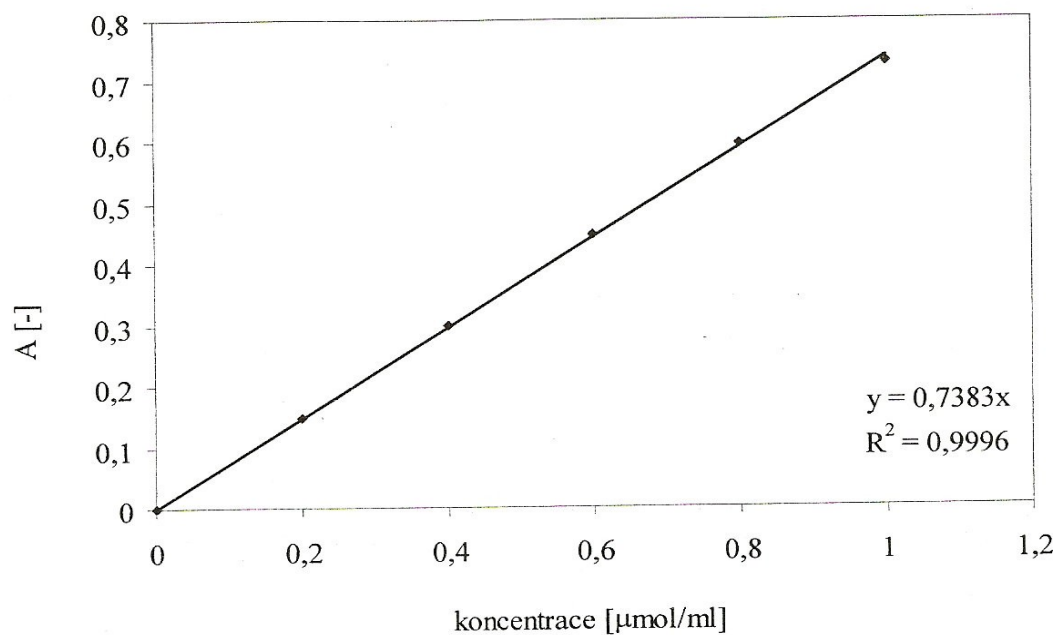


Graf č. 4.2: Kalibrační křivka albuminu

4.6.8 Stanovení kalibrační křivky kyseliny D-galaktopyranuronové

Pro sestrojení kalibrační křivky byl použit základní roztok kyseliny D-galaktopyranuronové s koncentracemi v jednotlivých vzorcích 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a

1,0 $\mu\text{mol/ml}$. Ke každé zkumavce bylo přidáno po 1 ml Somogyiho činidla (I + II v poměru 1:4). Zkumavky byly 10 minut provařeny ve vodní lázni a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Poté k nim bylo přidáno 1 ml Nelsonova roztoku (činidlo III) a 7 ml destilované vody. Zkumavky byly dobře promíchány. Absorbance byla měřena na spektrofotometru proti blanku při 530 nm. Blank obsahoval místo vzorku 1 ml destilované vody.



Graf č. 4.3: Kalibrační křivka kyseliny D-galaktopyranuronové

5 Výsledky a diskuze

V současnosti je věnována nemalá pozornost studiu termofilních mikroorganismů z pohledu možnosti jejich využití pro produkci průmyslově významných enzymů.¹³

Proto jsme se v práci zabývali testováním termofilní směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*. Tato směsná kultura byla získána z čističky odpadních vod Bystřice pod Hostýnem (V & K Kroměříž a.s.) a z těchto důvodů jsme předpokládali možnost produkce pektolytických a celulólytických enzymů, které se podílejí na odbourávání odpadního materiálu rostlinného původu. Důkaz produkce výše uvedených enzymů byl prováděn submerzní kultivací na pektínu a karboxymethylcelulose.

5.1 Submerzní kultivace na pektínu

Kultivace byla provedena na třepačce s rychlostí třepání 99 min^{-1} při teplotě $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Při zaočkování 2 ml kultury (rod *Thermus* a *Bacillus*) byla kultivace monitorována 73 dnů. Celkový objem inokula byl 400 ml a pH bylo na začátku kultivace upraveno na 6,5. U testovaných vzorků byla sledována koncentrace redukujících látek, bílkovin a aktivita polygalakturonás. Stanovení byla provedena v suspenzi a v supernatantě.

5.1.1 Výsledky produkce redukujících látek

Pro stanovení redukujících látek byla použita metoda Somogyiho a Nelsona. Změna koncentrace redukujících látek v závislosti na čase byla sledována v suspenzi a supernatantě při zaočkování 2 ml kultury. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu č. 5.1. Při zaočkování 2 ml kultury dojde k maximálnímu nárůstu redukujících látek 73 den. U vzorků dochází k většímu nárůstu redukujících látek v suspenzi.

5.1.2 Výsledky produkce rozpustných bílkovin

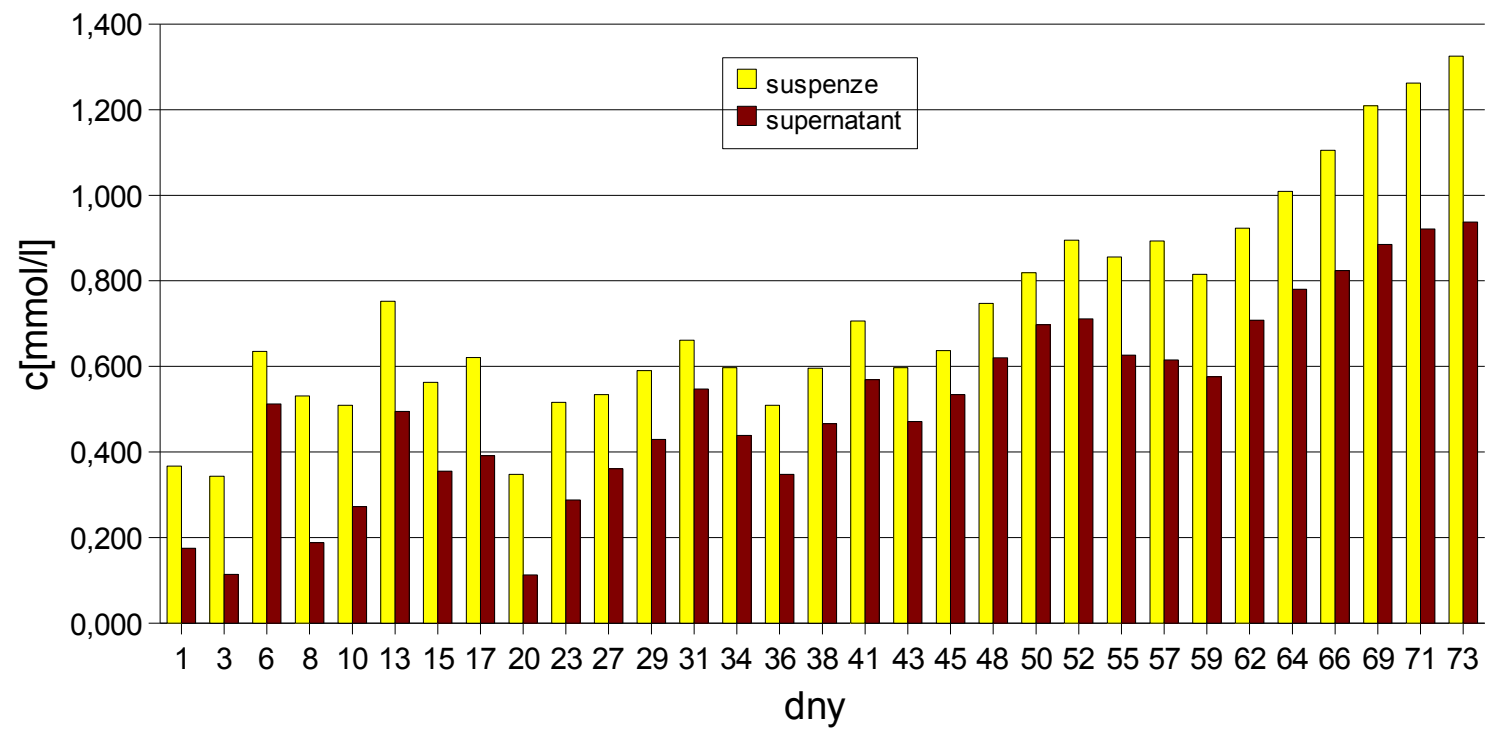
Množství rozpustných bílkovin bylo stanoveno Biuretovou metodou. Rozpustné bílkoviny se do roztoku uvolní alkalickou hydrolyzou. Reakce je založena na tvorbě komplexu Cu^{2+} s bílkovinami.

Změna koncentrace rozpustných bílkovin v závislosti na čase byla sledována v suspenzi a supernatantě. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu č. 5.2. Nejvyšší koncentrace bílkovin bylo dosaženo v suspenzi 73 den a v supernatantě 10 den. Při zaočkování 2 ml kultury se množství bílkovin pohybovalo v intervalu $0,878 - 3,285 \text{ mg/ml}$ v suspenzi a v supernatantě

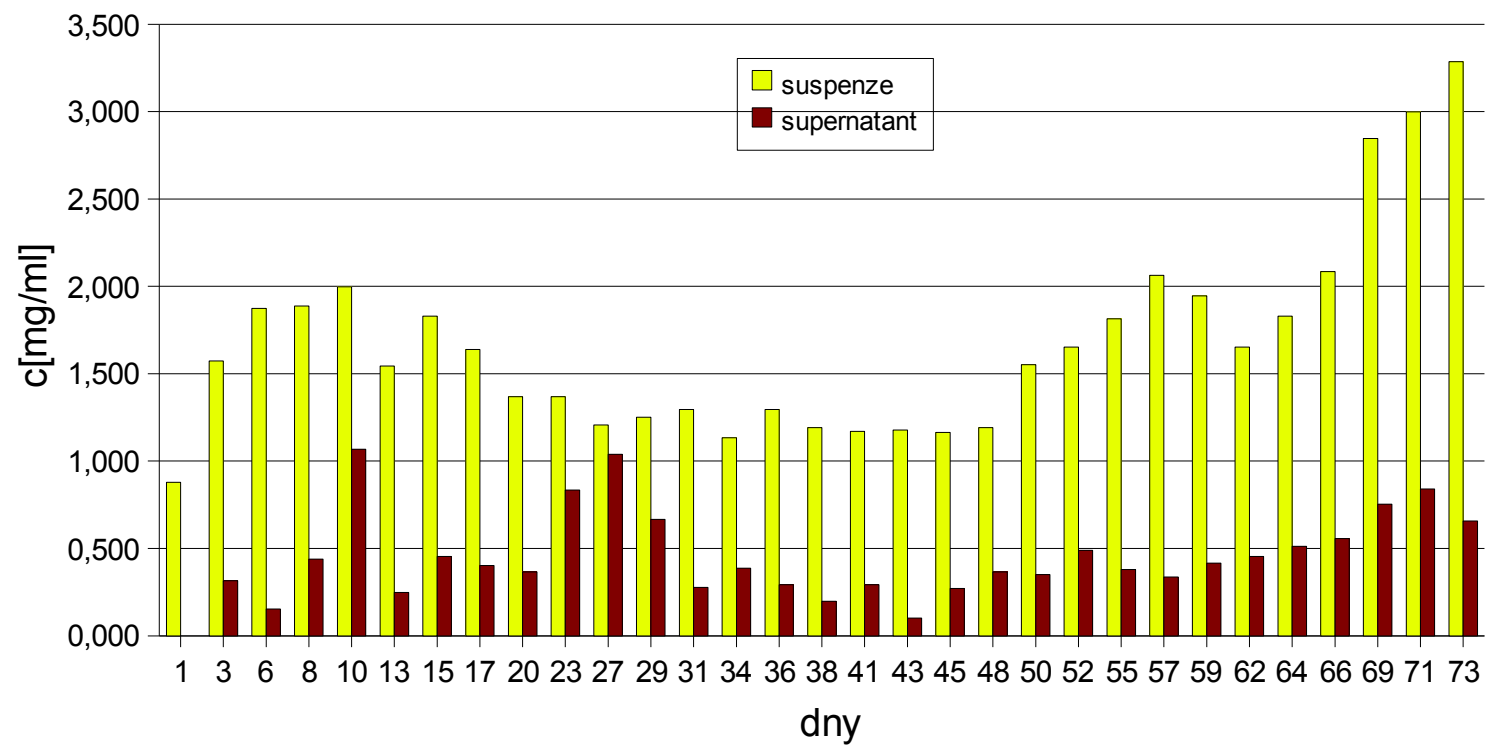
v intervalu 0 – 1,068 mg/ml.

5.1.3 Výsledky produkce enzymu polygalakturonázy

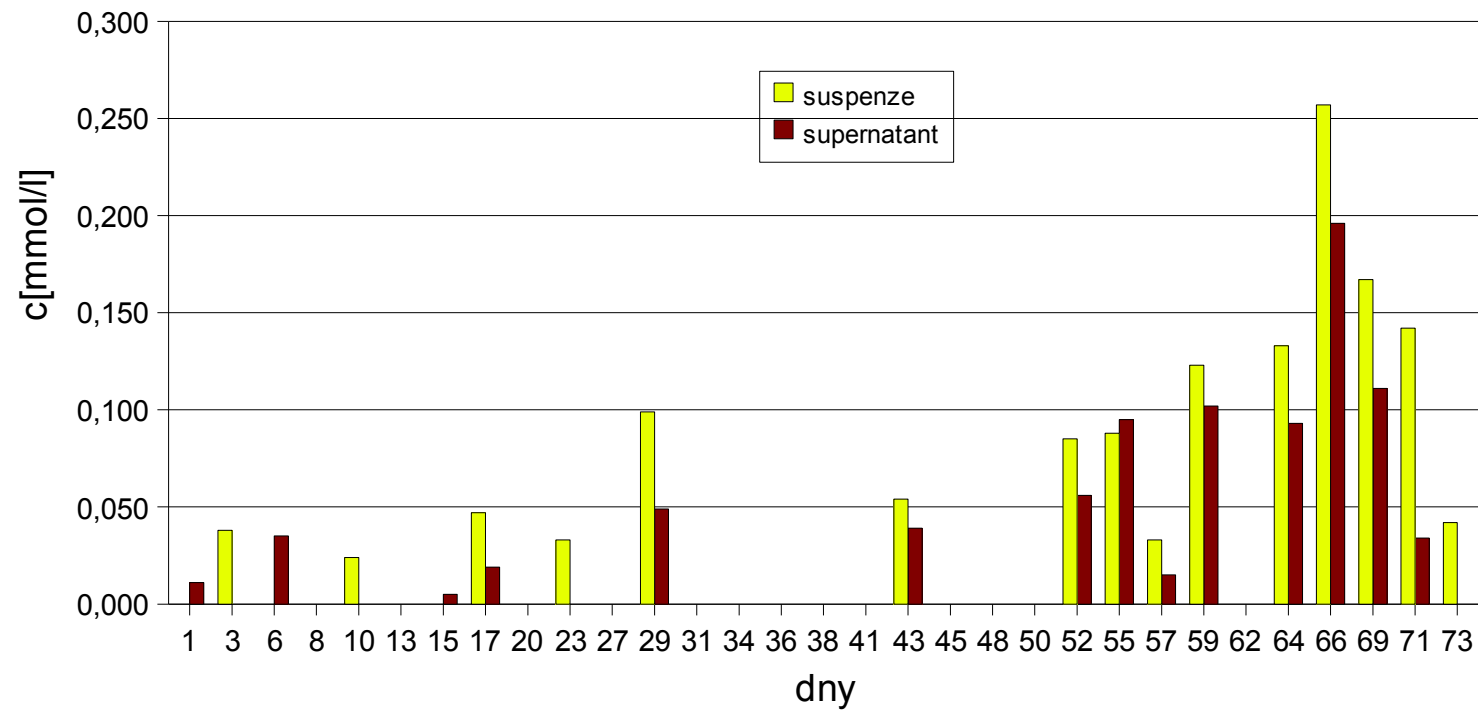
Produkce polygalakturonázy v závislosti na čase byla sledována v suspenzi a supernatantě při zaočkování 2 ml kultury. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu č. 5.3. Maximální hodnoty produkce polygalakturonázy byly dosaženy v suspenzi i v supernatantě 66 den.



Graf č.5.1: Změna koncentrace redukujících látek během kultivace na pektínu zaočkované 2 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*



Graf č. 5.2: Změna koncentrace rozpustných bílkovin během kultivace na pektínu zaočkovávané 2 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*



Graf č. 5.3: Sledování aktivity polygalakturonasy během kultivace na pektínu zaočkovávané 2 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*

5.2 Submerzní kultivace na karboxymethylcelulose (1% CMC)

Kultivace byla provedena na třepače s rychlostí třepání 99 min^{-1} při teplotě $60 \text{ }^\circ\text{C}$ a trvala 73 dnů. Objem kapalného média byl 400 ml a pH bylo na začátku kultivace upraveno na 6,5. U vzorků byly sledovány redukující cukry, bílkoviny a celulólytická aktivita. Stanovení byla provedena v suspenzi a v supernatantě.

5.2.1 Výsledky produkce redukujících látek

Pro stanovení redukujících látek byla použita metoda Somogyiho a Nelsona. Enzymatická hydrolýza celulosy je uskutečňována celulasami, které jsou vysoce specifické. Produktem hydrolýzy jsou obvykle redukující cukry jako je glukosa.²⁰

Změna koncentrace redukujících látek v závislosti na čase byla sledována v suspenzi a supernatantě při zaočkování 2 ml kultury. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu č. 5.4. K maximálnímu nárůstu redukujících látek dojde 73 den v suspenzi, v supernatantě dochází k produkci redukujících látek od 27 dne. U vzorků docházelo k minimálnímu nárůstu v supernatantě. Redukující látky byly vylučovány do prostředí, proto byla jejich koncentrace výrazně vyšší v suspenzi.

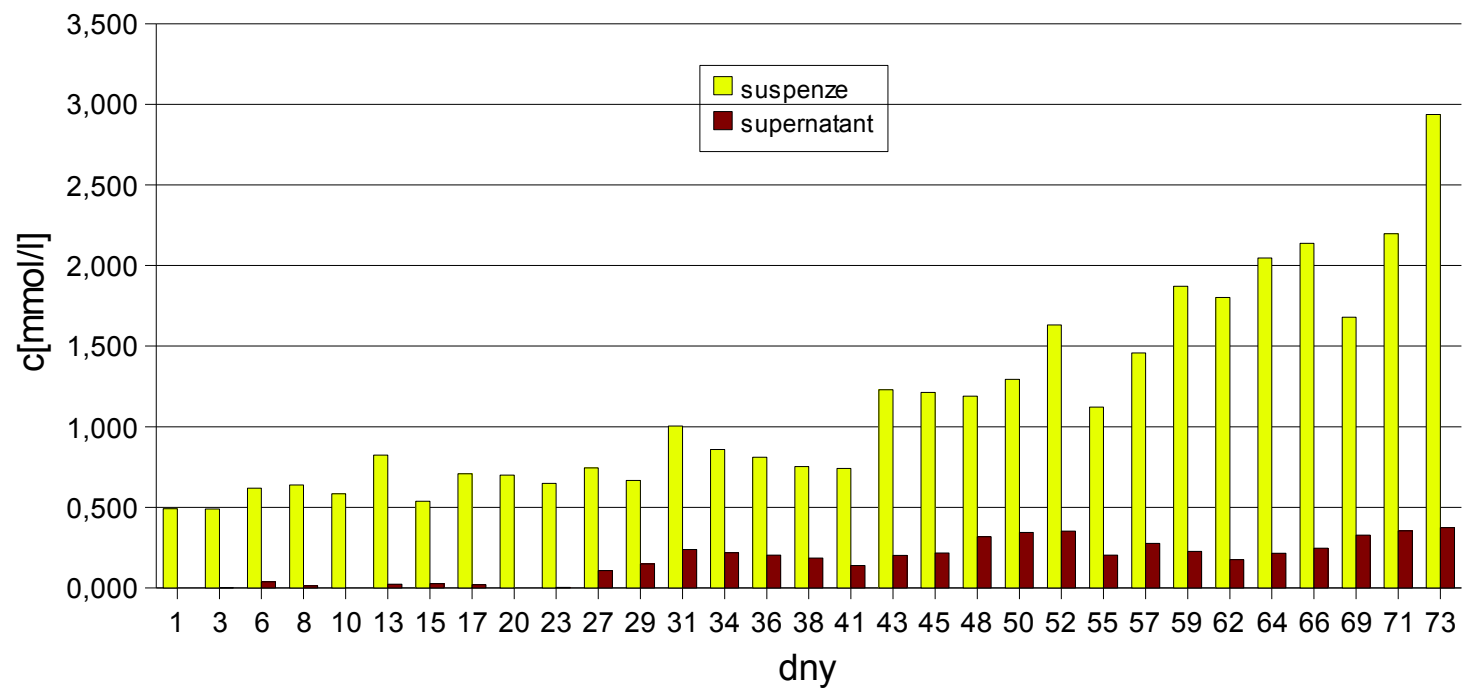
5.2.2 Výsledky produkce rozpustných bílkovin

Množství rozpustných bílkovin bylo stanoveno Biuretovou metodou. Rozpustné bílkoviny se do roztoku uvolní alkalickou hydrolýzou. Reakce je založena na tvorbě komplexu Cu^{2+} s bílkovinami.

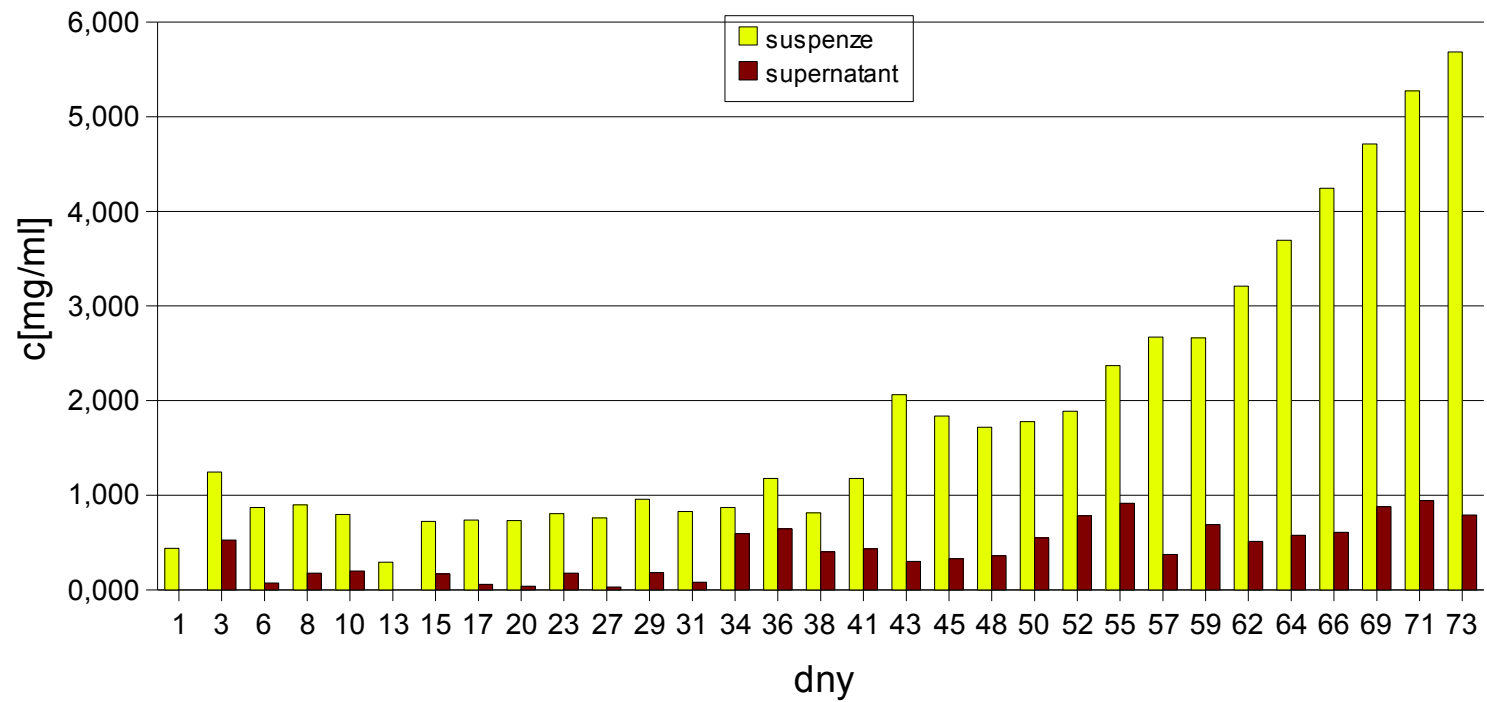
Změna koncentrace rozpustných bílkovin v závislosti na čase byla sledována v suspenzi a supernatantě. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu č. 5.5. Při zaočkování 2 ml kultury bylo dosaženo nejvyšší koncentrace bílkovin v suspenzi 73 den a v supernatantě 71 den. Množství bílkovin se pohybovalo v intervalu $0,293 - 5,684 \text{ mg/ml}$ v suspenzi a v supernatantě v intervalu $0 - 0,944 \text{ mg/ml}$.

5.2.3 Výsledky produkce celulólytické aktivity

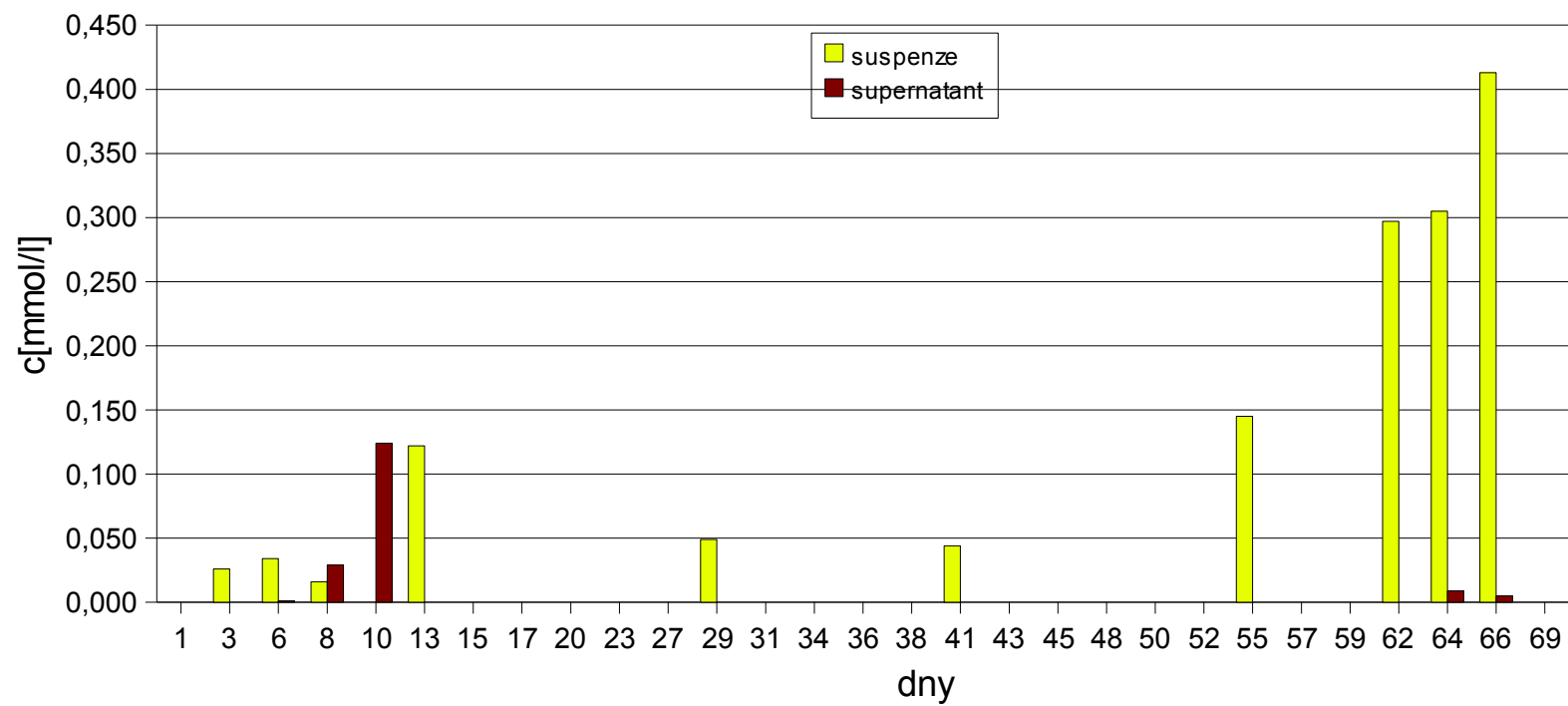
Produkce celulóly v závislosti na čase byla sledována v suspenzi a supernatantě. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu č. 5.6. Produkce extracelulárních celulólytických enzymů byla zaznamenána 8 a 10 den v supernatantě, přičemž 10 den byla produkce maximální. V suspenzi bylo dosaženo maxima 66 den.



Graf č. 5.4: Změna koncentrace redukujících látek během kultivace na 1% CMC zaočkované 2 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*



Graf č. 5.5: Změna koncentrace rozpustných bílkovin během kultivace na 1% CMC zaočkované 2 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*



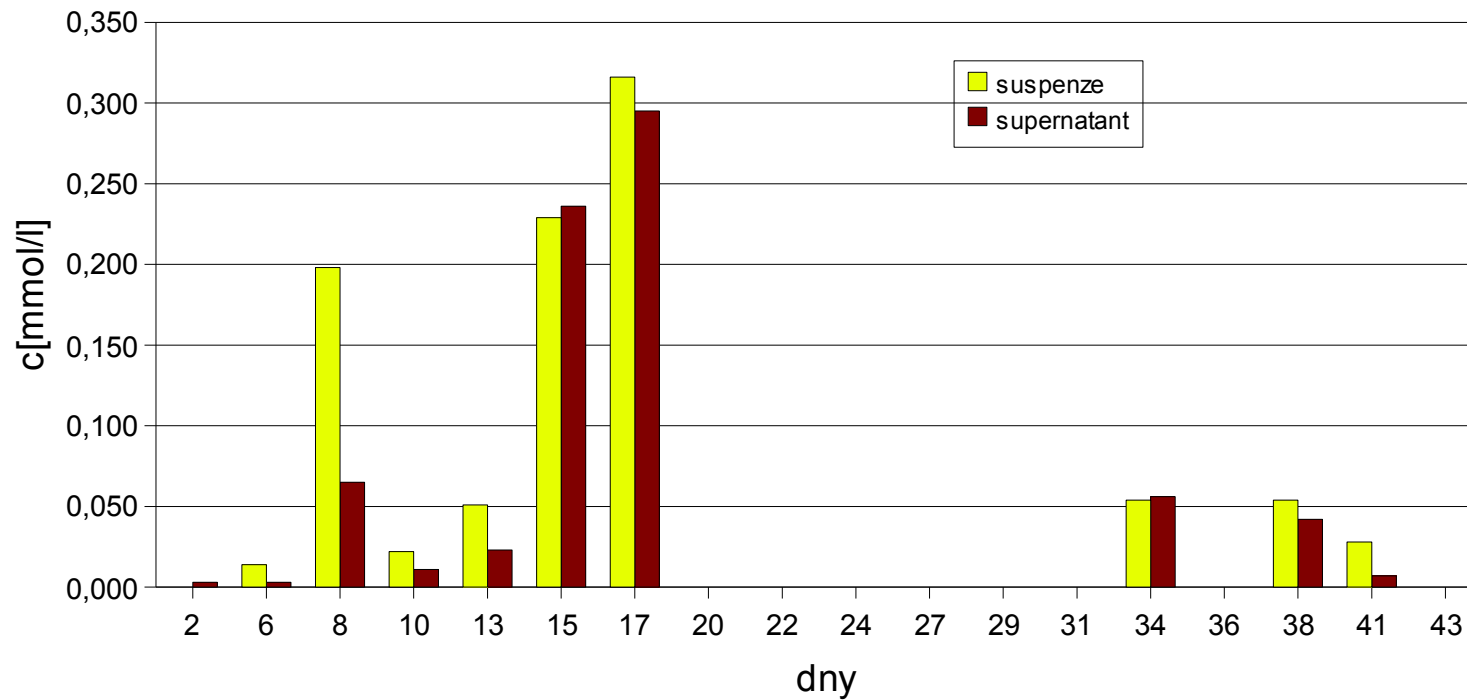
Graf č. 5.6: Sledování celulólytické aktivity během kultivace na 1% CMC zaočkované 2 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*

5.3 Vliv koncentrace inokula na produkci sledovaných enzymů

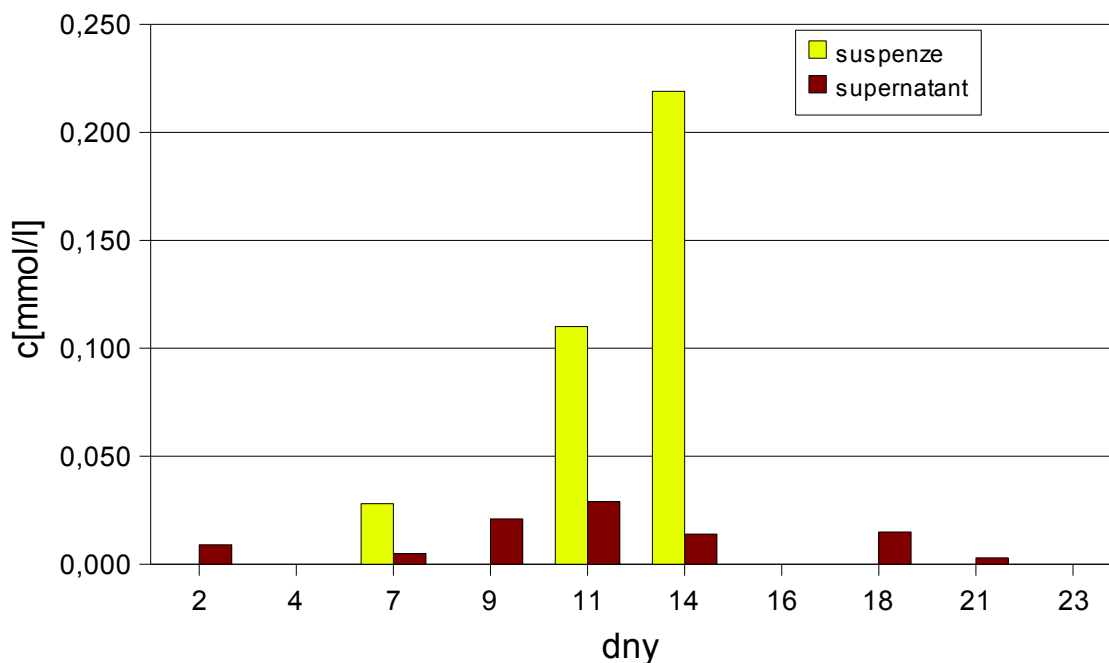
Na základě výsledků z předchozích pokusů byla směsná termofilní kultura rodu *Thermus* a *Bacillus* pomnožena na glukosovém médiu a pak následně použita v množství 18 ml na zaočkování kultivačního média pektínu a karboxymethylcelulosity. Kultivace byla provedena shodně jako 5.1 a 5.2. Byla sledována aktivita enzymů, koncentrace rozpustných bílkovin a redukujících látek.

5.3.1 Výsledky polygalakturonásové a celulytické aktivity

Produkce polygalakturonásové a celulytické aktivity v závislosti na čase byla sledována v suspenzi a v supernatantě. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu č. 5.7 a č. 5.8. Nejvyšší hodnoty polygalakturonásové aktivity bylo dosaženo v suspenzi i v supernatantě 17 den kultivace (graf č. 5.7). A maximální hodnoty celulytické aktivity bylo dosaženo 14 den v suspenzi a 17 den v supernatantě. Z grafů vyplývá, že při zaočkování 18 ml kultury dosáhneme maxima v polovičním čase kultivace.



Graf č. 5.7: Sledování aktivity polygalakturonasy během kultivace na pektínu zaočkované 18 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*



Graf č. 5.8: Sledování celulolytické aktivity během kultivace na 1% CMC zaočkované 18 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*

5.3.2 Výsledky produkce rozpustných bílkovin

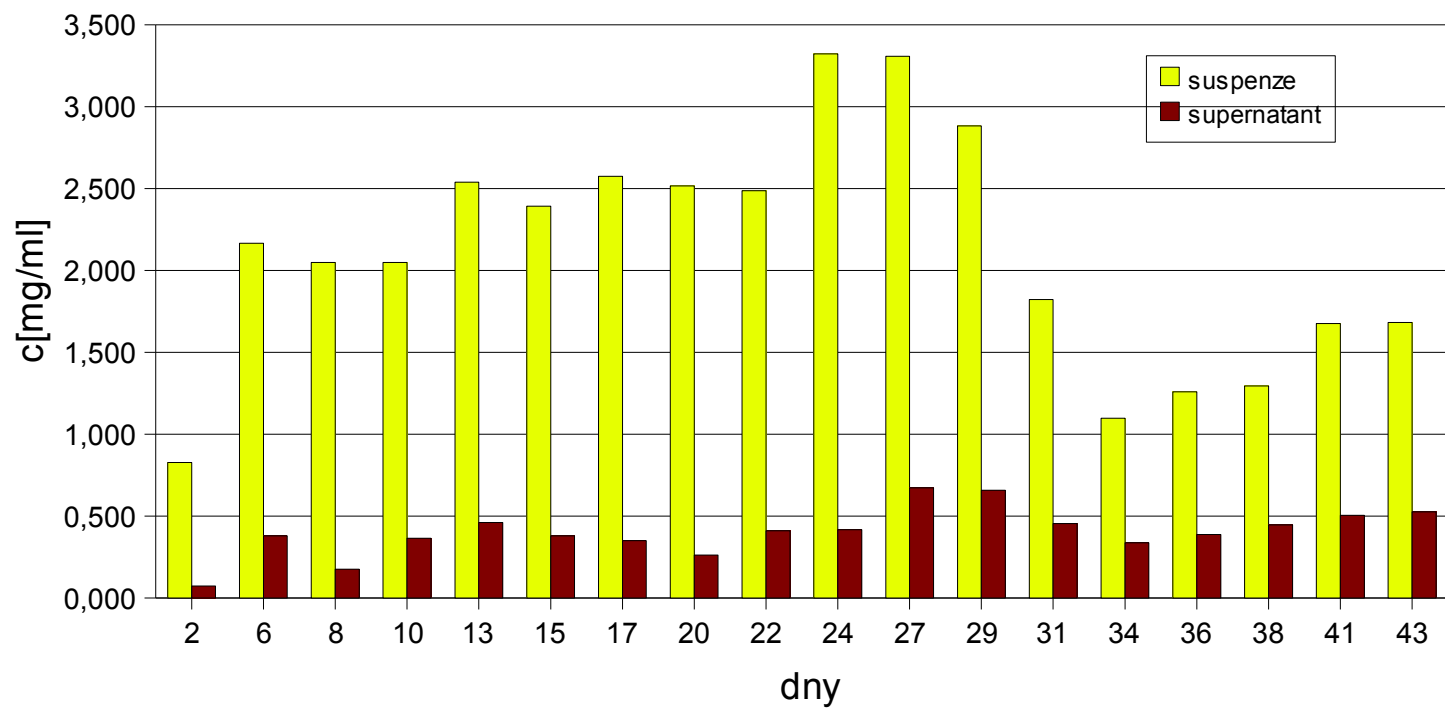
Množství rozpustných bílkovin bylo stanoveno Bibretovou metodou.

Změna koncentrace rozpustných bílkovin v závislosti na čase byla sledována v suspenzi a v supernatantě na pektínu a karboxymethylcelulose. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu č. 5.9 a č. 5.10.

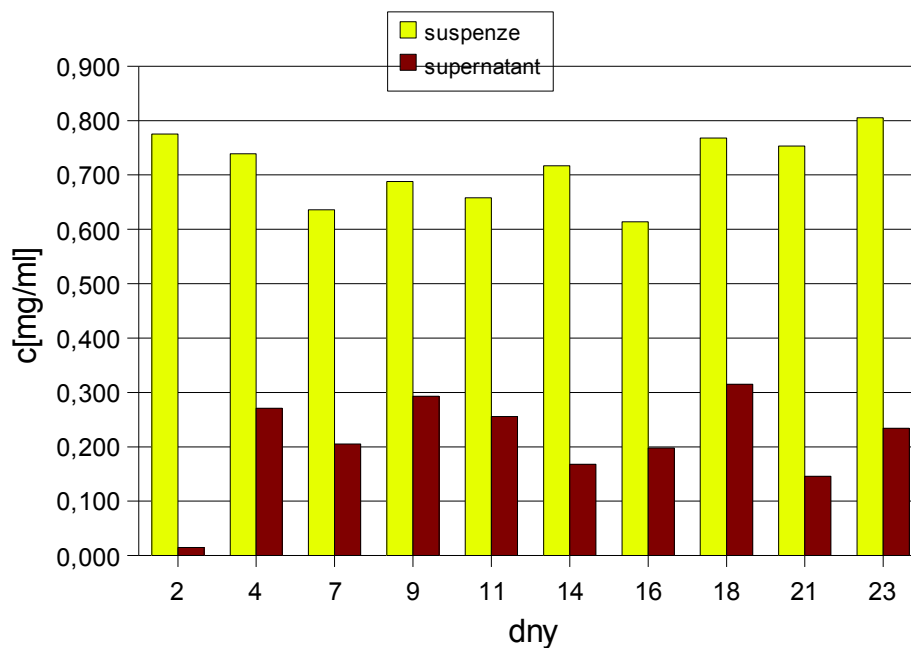
Při zaočkování 18 ml na pektínu bylo dosaženo nejvyšší koncentrace bílkovin v suspenzi 24 den a v supernatantě 27 den. Množství bílkovin se pohybovalo v suspenzi v intervalu 0,827 – 3,321 mg/ml a v supernatantě v intervalu 0,073 – 0,673 mg/ml (graf č. 5.9).

Na 1% CMC bylo dosaženo nejvyšší koncentrace bílkovin v suspenzi 23 den a v supernatantě 18 den. Množství bílkovin se pohybovalo v suspenzi v intervalu 0,636 – 0,805 mg/ml a v supernatantě v intervalu 0,015 – 0,315 mg/ml (graf č. 5.10).

Z výsledků vyplývá, že množství kultury nemělo vliv na množství rozpustných bílkovin, ale mělo vliv na dobu kultivace, která se zkrátila na poloviční dobu.



Graf č. 5.9: Změna koncentrace rozpustných bílkovin během kultivace na pektínu zaočkované 18 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*

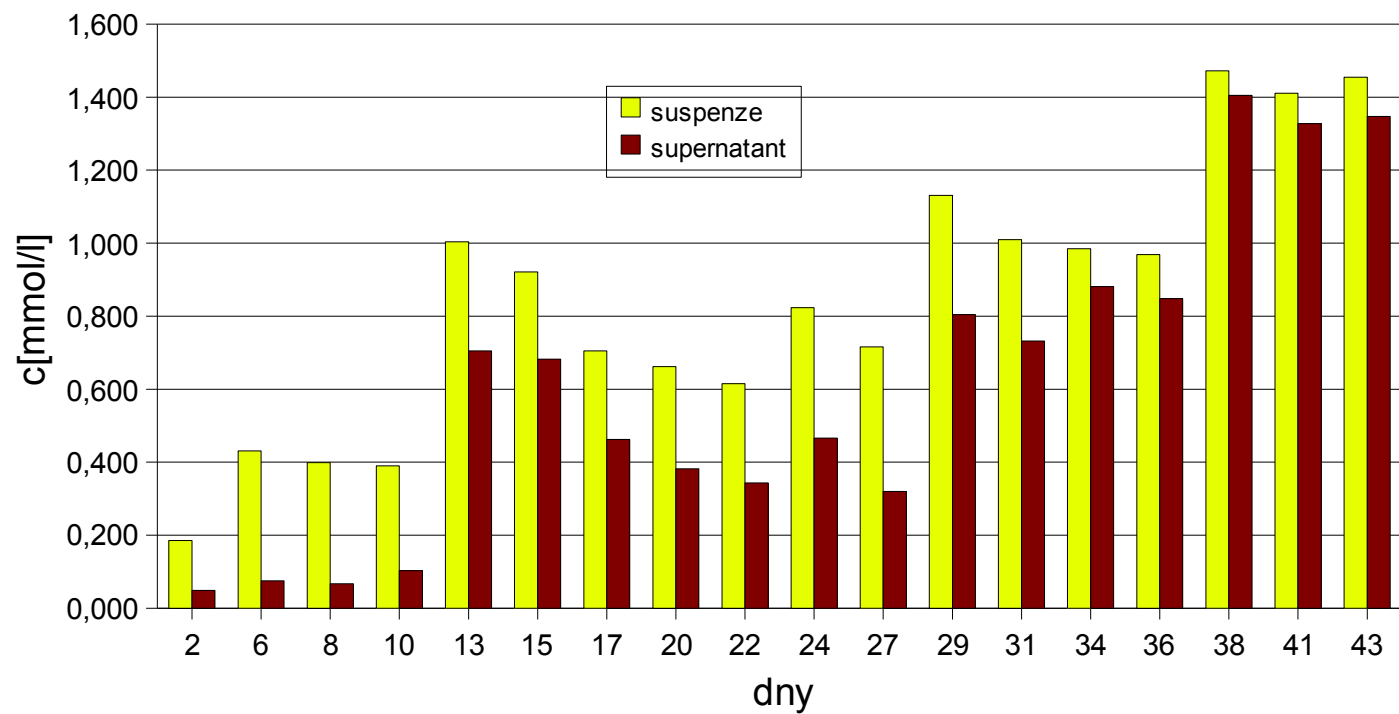


Graf č. 5.10: Změna koncentrace rozpustných bílkovin během kultivace na 1% CMC zaočkované 18 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*

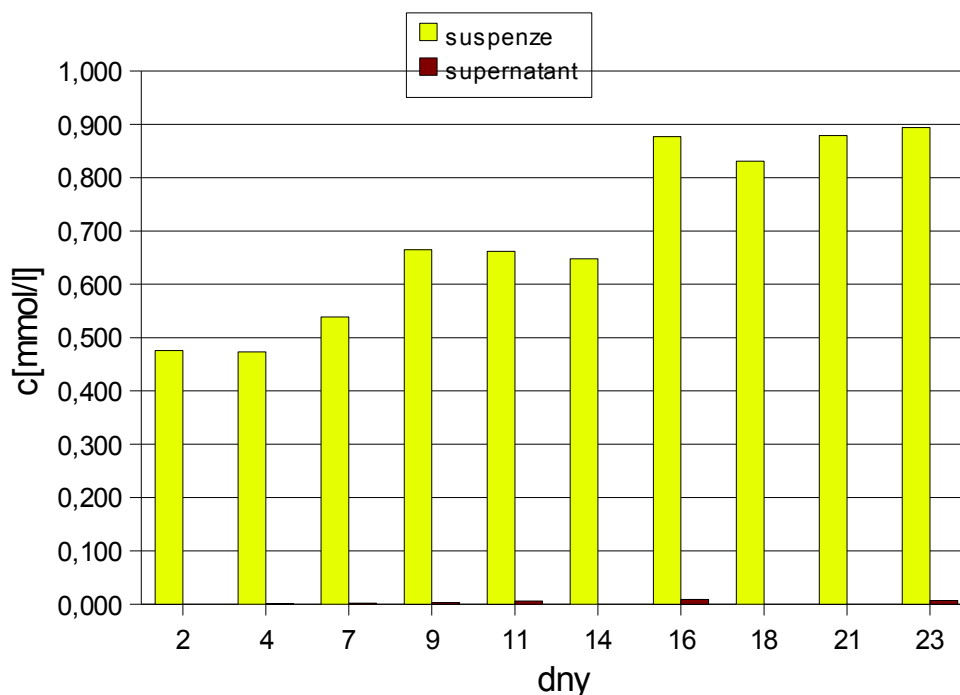
5.3.3 Výsledky produkce redukujících látek

Pro stanovení redukujících látek byla použita metoda Somogyiho a Nelsona.

Změna koncentrace redukujících látek v závislosti na čase byla sledována v suspenzi a v supernatantě na pektínu a 1% CMC. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu č. 5.11 a č. 5.12. K maximálnímu nárůstu redukujících látek na pektínu docházelo 38 den (graf č. 5.11). U 1% CMC docházelo k maximálnímu nárůstu 23 den v suspenzi, zatímco v supernatantě nedocházelo téměř k žádnému nárůstu redukujících látek za celou dobu kultivace (graf č. 5.12). Redukující látky byly vylučovány do prostředí, proto byla jejich koncentrace výrazně vyšší v suspenzi.



Graf č. 5.11: Změna koncentrace redukujících látek během kultivace na pektínu zaočkované 18 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*

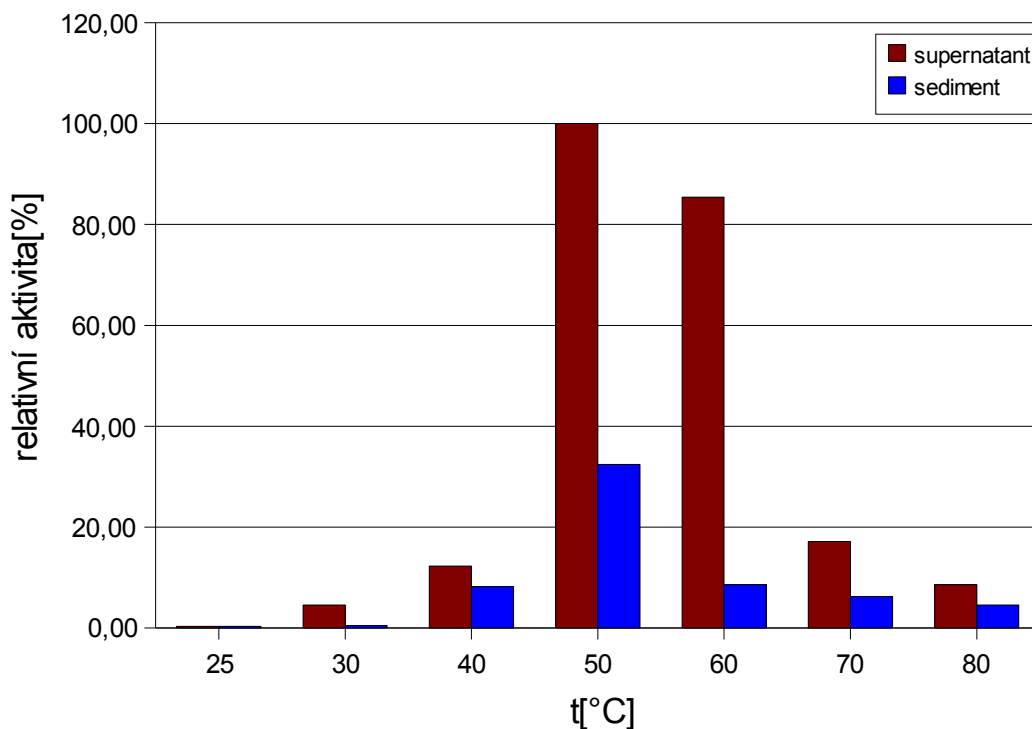


Graf č. 5.12: Změna koncentrace redukujících látek během kultivace na 1% CMC zaočkované 18 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*

5.4 Stanovení teplotního optima polygalakturonázy

Teplotním optimem rozumíme teplotu, při které má enzym nejvyšší aktivitu.

Měření bylo provedeno v supernatantě a v sedimentu při teplotě 25, 30, 40, 50, 60, 70 a 80 °C. K zaočkování bylo použito 2 ml směsné termofilní kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*. Výsledky jsou uvedeny v grafu č. 5.13. Polygalakturonáza dosahovala 100% relativní aktivity při teplotě 50 °C v supernatantě. Při nižších teplotách jak 50 °C byla aktivita nižší a při 50 °C dosahovala maximálních hodnot a pak docházelo opět k poklesu aktivit v supernatantě i v sedimentu. 100% relativní aktivita odpovídá specifické aktivitě 0,585 mmol/protein v supernatantě. Nejvyšší relativní aktivita v sedimentu odpovídá 0,189 mmol/protein.

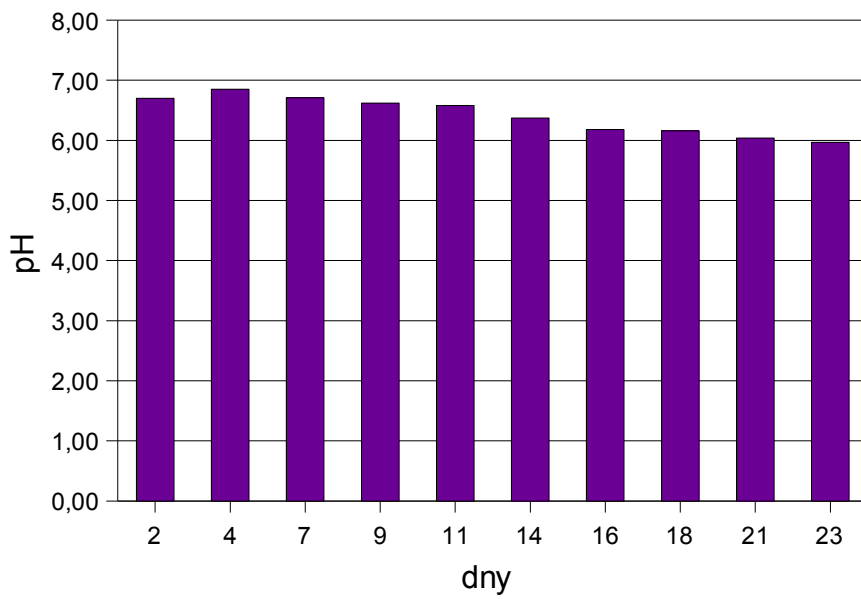


Graf č. 5.13: Stanovení teplotního optima polygalakturonázy

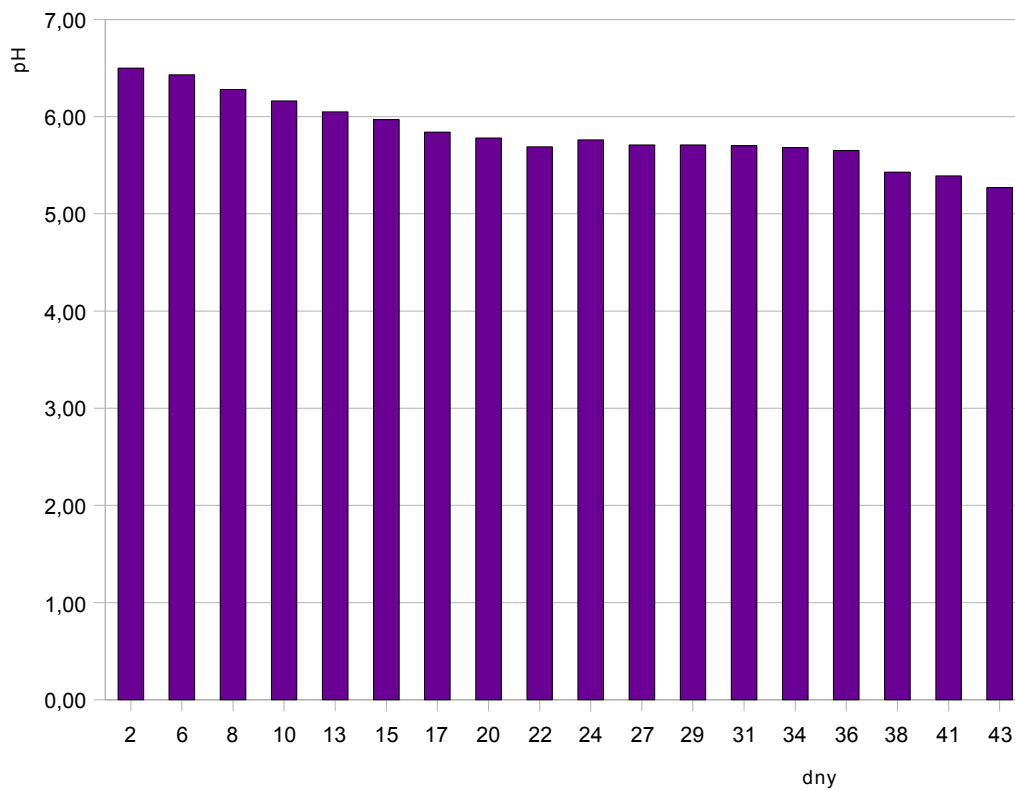
5.5 Výsledky změny pH během kultivace

Většina bakterií roste v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí.⁴

Změny pH během kultivace byly sledovány na karboxymethylcelulose a na pektínu. K zaočkování bylo použito 18 ml směsné termofilní kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*. Výsledky měření jsou uvedeny v grafu č. 5.14 a č. 5.15. Na začátku kultivace bylo pH u obou vzorků upraveno na hodnotu 6,5 a v průběhu kultivace docházelo k poklesu pH. K poklesu pH dochází pravděpodobně v důsledku tvorby kyselin během kultivace.



Graf č. 5.14: Změny pH během kultivace na 1% CMC



Graf č. 5. 15: Změny pH během kultivace na pektínu

6 Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývala kultivací termofilních mikroorganismů (směsná kultura rodu *Thermus* a *Bacillus*) na pektínu nebo na karboxymethylcelulose.

Byla sledována produkce celulolytické aktivity a polygalakturonás, přičemž byly stanoveny i redukující látky a rozpustné bílkoviny. Dále bylo stanoveno i teplotní optimum pro polygalakturonásu a taktéž bylo monitorováno pH v průběhu kultivace v produkčním médiu.

Na základě stanovení teplotního optima polygalakturonás, bylo stanovení aktivity polygalakturonás prováděno při teplotě 50 °C. Stanovení celulolytické aktivity bylo prováděno rovněž při teplotě 50 °C.

Na karboxymethylcelulose a pektínu směsná termofilní kultura rodu *Thermus* a *Bacillus* produkovala oba extracelulární enzymy. Mikroorganismy vykazovaly tedy aktivitu polygalakturonázy a celulolytickou aktivitu. Z grafického vyjádření lze pozorovat vztah mezi produkcí celulolytické aktivity a koncentrací redukujících látek nebo aktivity polygalakturonás a koncentrací redukujících látek. Při nárůstu aktivit docházelo k poklesu koncentrace redukujících látek a naopak.

Produkce enzymů byla sledována v závislosti na koncentraci inokula. Ze získaných výsledků vyplývá, že koncentrace inokula měla vliv na produkci enzymů. Zaočkování se provádělo 2 ml nebo 18 ml kultury. Zaočkování 18 ml kultury způsobilo urychlení produkce enzymů a to v polovičním čase kultivace.

Během kultivace na pektínu i karboxymethylcelulose docházelo k poklesu pH v živném médiu pravděpodobně v důsledku tvorby kyselin.

Rozdíl mezi počátečními a koncovými daty byl statisticky významný, na základě statistické významnosti 0,05, tudíž lze konstatovat nárůst redukujících látek a rozpustných bílkovin při zaočkování 2 ml kultury na pektínu i na karboxymethylcelulose. Při zaočkování 18 ml na pektínu a karboxymethylcelulose docházelo k nárůstu redukujících látek.

7 Seznam použité literatury

- ¹Vodrážka, Z.: *Biochemie*. Praha 1999, s. 26, 47-48, 101, 105-106, 120, 124, 134, ISBN 80-200-0600-1.
- ²Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter: *Základy buněčné biologie*. 1998, s. 596-598, ISBN 80-902906-2-0.
- ³Velíšek, J.: *Chemie potravin I*. Tábor 2002, ISBN 80-86659-00-3.
- ⁴Šilhánková, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha 2002, s.15-16, 29-56, 122, 168, ISBN 80-200-1024-6.
- ⁵Obrázek celulosy: dostupné z: <http://upload.wikimedia.org/wiki/Soubor:celulosa.jpg>. Stránka byla naposledy editována 25.4. 2006. Citováno 18.2. 2007.
- ⁶Görner, F., Valík, Ľ: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava 2004, ISBN 80-967064-9-7.
- ⁷Babák, L.: *Modelování a optimalizace kultivací průmyslově důležitých termofilních mikroorganismů*. Brno 2005, Disertační práce na Vysokém učení technickém, Fakultě chemické.
- ⁸ Dostupné z: <http://www.cs.ualberta.ca/bioinfo/GOSUB/gram-negative.html>. Citováno dne 18.2. 2007
- ⁹Betina, V. a kolektiv: *Mikrobiologické laboratorné metody*. 1.vyd. Bratislava 1988.
- ¹⁰Beffat, T., Blanc, M., Lyon, P.-F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J. L., Aragno, M.: *Isolation of Thermus strains from hot composts (60 to 80 °C)*. Applied and environmental microbiology, 1996, vol. 62, no. 5, pp. 1723-1727 (20 ref). ISSN 0099-2240.
- ¹¹Wood, W. A., Kellogg, S. T.: *Lignin peroxidase of Phanerochaete chrysosporium*. Methods in enzymology-Biomass, 1988, vol. 161. Inc.:238-249.
- ¹²Hans-Georg Hoppe: *Use of Fluorogenic Model Substrates for Extracellular Enzyme Activity (EEA) Measurement of Bacteria*. Aquatic Microbial Ecology, 1993.
- ¹³Šiříšřová, L., Melzoch, K., Hávová, G.: *Vývoj metod umožňujících stanovení produktů termofilních bakterii*. Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, VŠCHT Praha, Technická 5, Praha 6.
- ¹⁴Vodrážka, Z., Rauch, P., Káš, J.: *Enzymologie*. Praha 1998, s. 156-159, ISBN 80-7080-124-7.
- ¹⁵Jaouani, A., Tabka, M. G., Pennineckx, M. J.: *Lignin modifying enzymes of Corioloropsis polyzona and their role in olive oil mill wastewaters decolourisation*. Chemosphere, March

2006, vol. 62, no. 9, pp. 1421-1430.

¹⁶Blouzard, J. CH., Bourgeois, C., Philip, P., Valette, O., Bélaich, A., Tardif, Ch., Bélaich, J. P., Pagés, S.: *Enzyme Diversity of the Cellulolytic system Produced by Clostridium cellulolyticum Explored by Two-Dimensional Analysis: Identification of Seven Genes Encoding New Dockerin-Containing Proteins*. December 2006.

¹⁷Dostupné z: <http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/kultirtech.pdf>

¹⁸Lapara, T. M., Alleman, J. E.: *Thermophilic aerobic biological wastewater treatment*. 1999, vol. 33, no. 4, pp. 895-908.

¹⁹Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L.: *Charakterization of cellulases and hemicellulases produced by Trichoderma reesei on various carbon sources*. *Prosecc Biochemistry*, November 2005, vol. 40, vol. 11, pp. 3519-3525.

²⁰Sun, Y., Cheng, J.: *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. *Bioresource Technology*, May 2002, pp. 1-11.

²¹Suto, M., Tomita, F.: *Induction and Catabolite Represion Mechanisms of cellulase in Fungi*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, vol. 92, no. 4, pp. 305-311.

²²Tenreiro, S., Nobre, M. F., Costa, M. S.: *Thermus silvanus sp. nov. and Thermus chliarophilus sp. nov., Two New Species Related to Thermus ruber but with Lower Growth Temperatures*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, vol. 45, no. 4, p. 633-639.

²³Dostupné z: <http://aem.org/cgi/content/abstract/54/2/466>. Poslední úprava 2007, citováno 16.12. 2007.

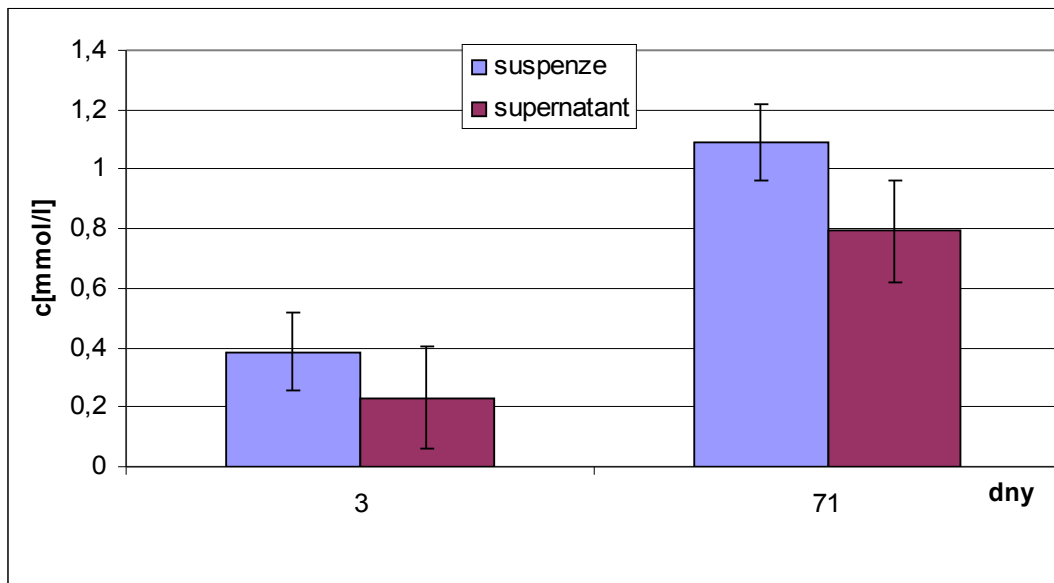
²⁴Pason, P., Kyu, K. L., Ratanakhanokchai, K.: *Paenibacillus curdlanolyticus Strain B-6 Xylanolytic-Cellulolytic Enzyme system That Degrades Insoluble Polysaccharides*. School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand, 2006.

²⁵Shallom, D., Shoham, Y.: *Microbial hemicellulases*. *Curent Opinion in Microbiology*, 2003, vol. 6, no. 3, pp. 219-228.

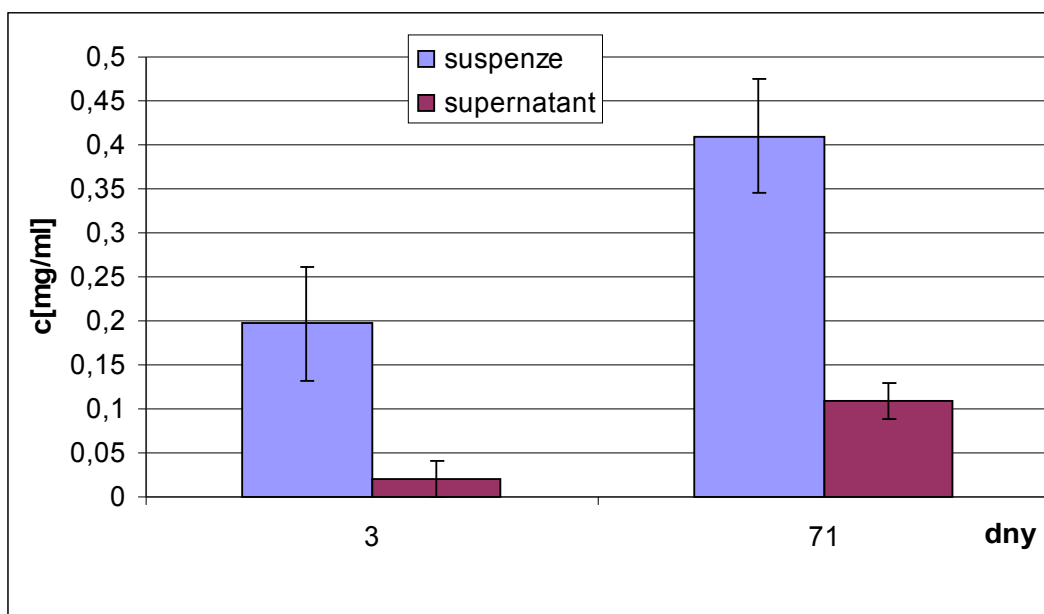
8 Seznam použitých zkratk a symbolů

CMC karboxymethylcelulosa

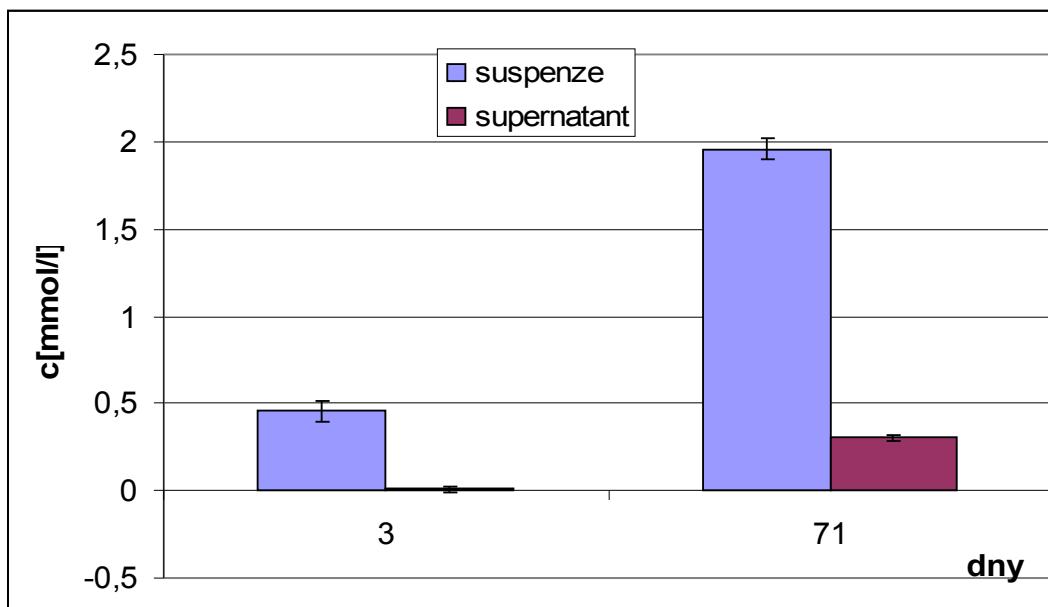
9 Přílohy



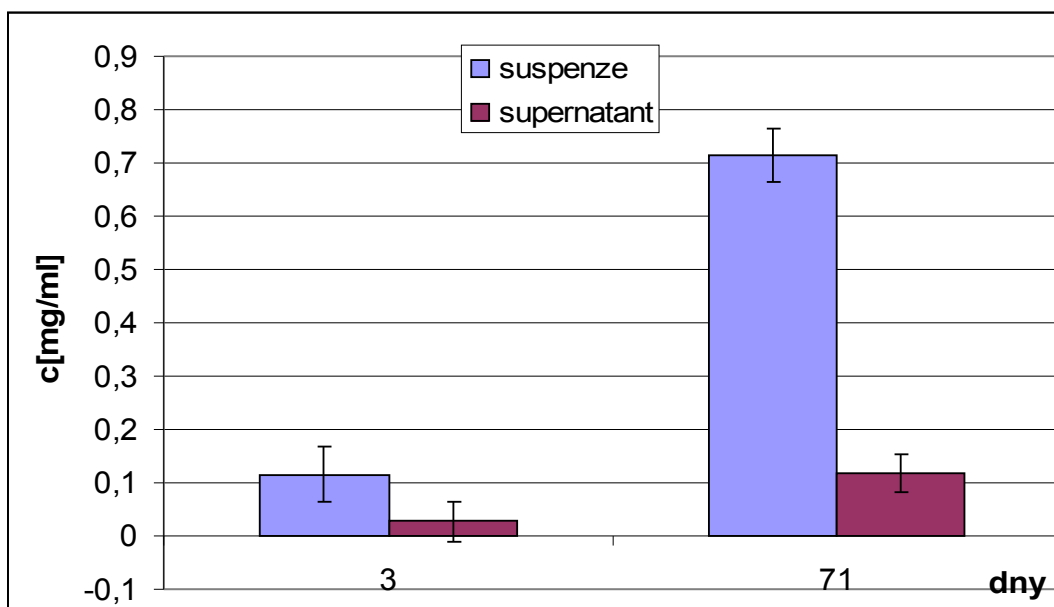
Graf č. 9.1: Statistické znázornění koncentrace redukujících látek během kultivace na pektínu zaočkované 2 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*



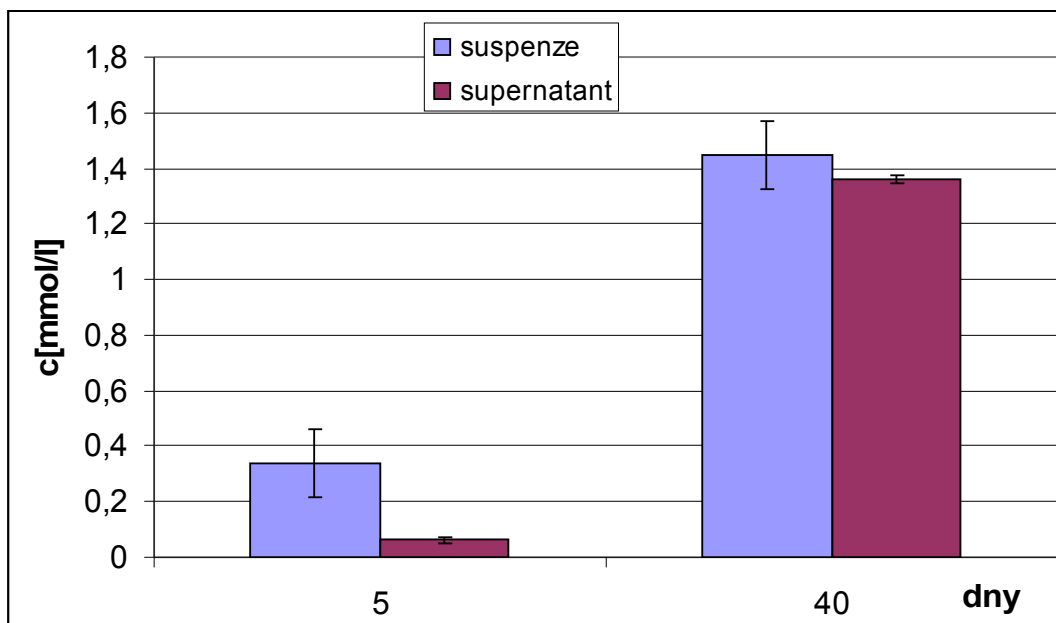
Graf č. 9.2: Statistické znázornění koncentrace rozpustných bílkovin během kultivace na pektínu zaočkované 2 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*



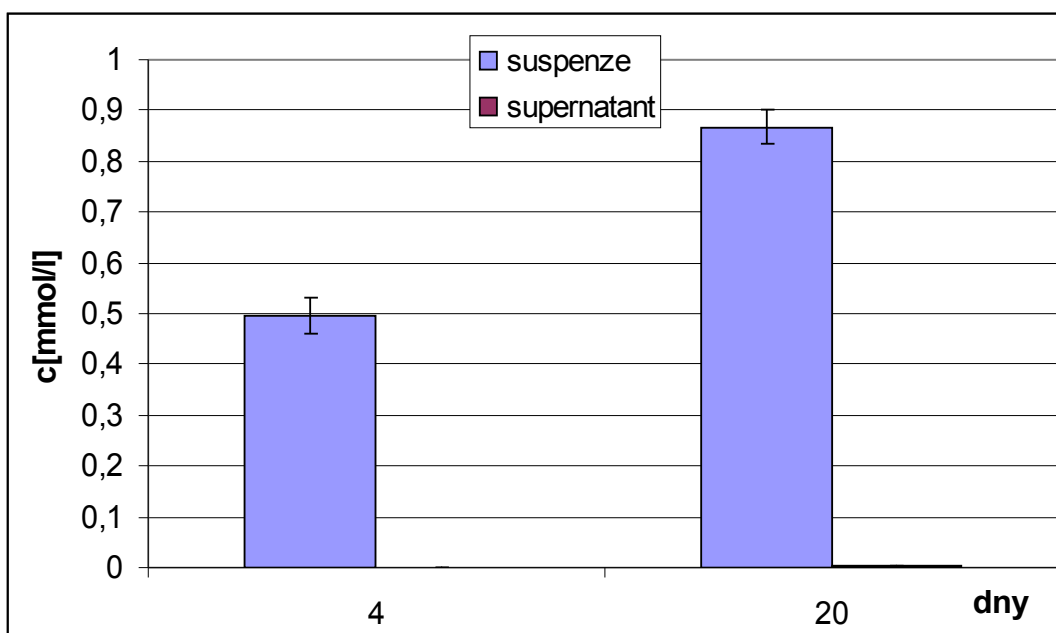
Graf č. 9.3: Statistické znázornění koncentrace redukujících látek během kultivace na 1% CMC zaočkované 2 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*



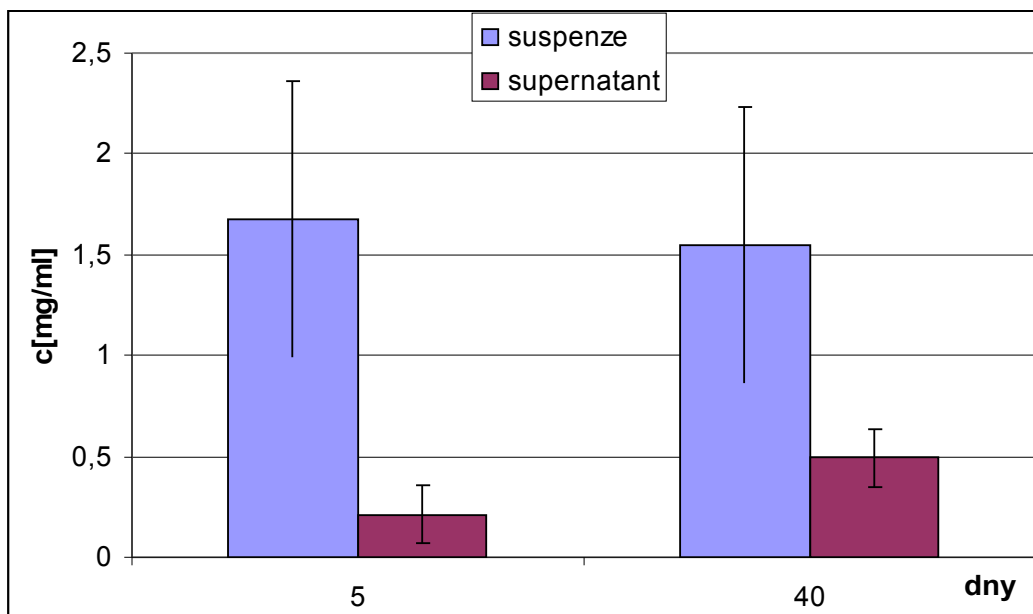
Graf č. 9.4: Statistické znázornění koncentrace rozpustných bílkovin během kultivace na 1% CMC zaočkované 2 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*



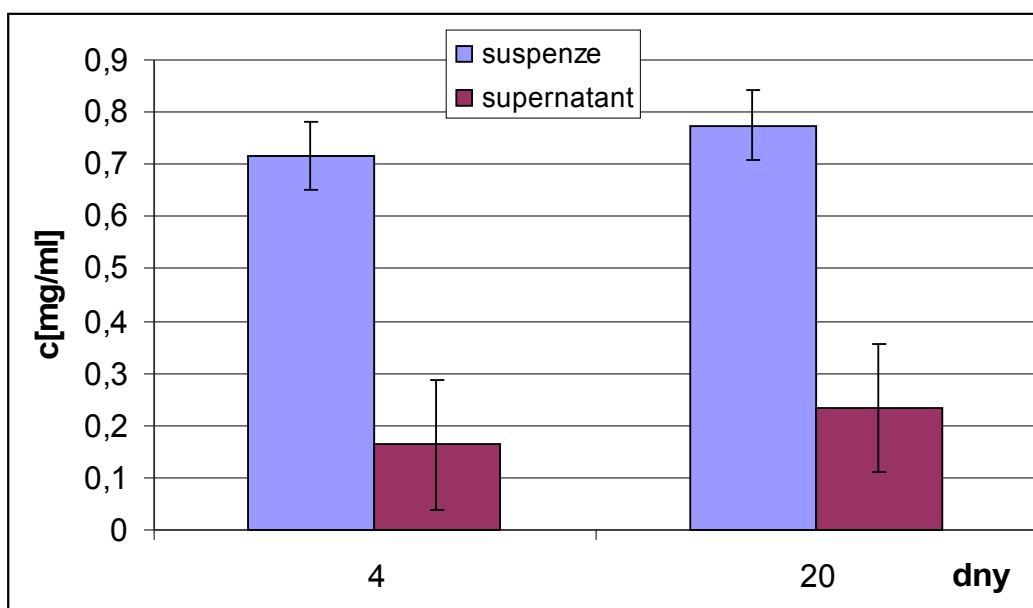
Graf č. 9.5: Statistické znázornění koncentrace redukujících látek během kultivace na pektínu zaočkované 18 ml směsné kultury rodu *Thermus a Bacillus*



Graf č. 9.6: Statistické znázornění koncentrace redukujících látek během kultivace na 1% CMC zaočkované 18 ml směsné kultury rodu *Thermus a Bacillus*



Graf č. 9.7: Statistické znázornění koncentrace rozpustných bílkovin během kultivace na pektínu zaočkované 18 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*



Graf č. 9.8: Statistické znázornění koncentrace rozpustných bílkovin během kultivace na 1% CMC zaočkované 18 ml směsné kultury rodu *Thermus* a *Bacillus*