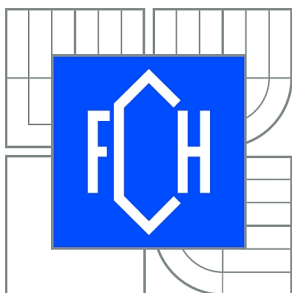




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# STUDIUM PRODUKCE EXTRACELULÁRNÍCH POLYMERŮ POMOCÍ MIKROORGANISMU AUREOBASIDIUM PULLULANS

PRODUCTION OF EXTRACELLULAR POLYMERIC SUBSTANCES BY AUREOBASIDIUM  
PULLULANS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. PAVEL HORÁČEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. RNDr. IVANA MÁROVÁ, CSc.

BRNO 2013



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0740/2012</b>	Akademický rok: <b>2012/2013</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Pavel Horáček</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.</b>	
Konzultanti:	Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.	

### Název diplomové práce:

Studium produkce extracelulárních polymerů pomocí mikroorganismu *Aureobasidium pullulans*

### Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na téma využití *Aureobasidium pullulans* v biotechnologiích, charakterizace produkovaných extracelulárních látek.
2. Optimalizace metod analýzy sledovaných polymerních látek v kultivačním médiu.
3. Experimentální studie vlivu podmínek a kultivačního uspořádání na produkci extracelulárních polymerů pomocí *Aureobasidium pullulans*.

### Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Pavel Horáček  
Student(ka)

-----  
doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá studiem vlivu podmínek a kultivačního uspořádání na produkci extracelulárních polymerů pomocí kvasinkovitého mikroorganismu *Aureobasidium pullulans*. Obsahem teoretické části je stručná charakterizace *A. pullulans*, jeho použití v biotechnologiích a přehled produkovaných látek, zejména pullulanu a kyseliny poly-L-jablečné.

Náplní experimentální části práce bylo zjištění nejvhodnějších podmínek kultivace *A. pullulans* CCM 8182. Zjištěné optimální podmínky byly srovnány s průběhem kultivací na odpadních substrátech, které představují levné zdroje živin a umožňují snížení nákladů výroby. Z odpadních substrátů byly použity například ovesné otruby, pohankové slupky, jablečná vláknina a další.

Součástí experimentální práce byla optimalizace stanovení obsahu extracelulárních polymerů – pullulanu a kyseliny poly-L-jablečné metodou HPLC. V rámci optimalizace byla navržena vhodná mobilní fáze a podmínky separace produktů hydrolyzy polymerů, tj. glukózy a kyseliny L-jablečné na speciální stacionární fázi (kolona Rezex Roa organic acid H<sup>+</sup>, 5 mM kyselina sírová, průtok 0,5 mL.min<sup>-1</sup>, teplota 60 °C,).

K nejvyšší produkci pullulanu došlo při kultivaci na ovesných otrubách (13,03 g.L<sup>-1</sup>) při počátečním pH 7,5, zatímco nejvyšší produkce kyseliny poly-L-jablečné byla zaznamenána u kultivace na jablečných slupkách (2,89 g.L<sup>-1</sup>) při pH 6. Bylo zjištěno, že k vyšší produkci kyseliny poly-L-jablečné došlo při pH 6, zatímco vyšší produkce pullulanu byla při pH 7,5.

## KLÍČOVÁ SLOVA

*Aureobasidium pullulans*, pullulan, poly-L-jablečná kyselina

## ABSTRACT

The diploma thesis is focused on the study of the influence of cultivation conditions and arrangement for the production of extracellular polymeric substances by using yeast-like microorganism *Aureobasidium pullulans*. In the theoretical part a brief description of *A. pullulans*, its use in biotechnology and produced exobiopolymers, especially pullulan and poly-L-malic acid are presented.

The first aim of the experimental part was to set the most appropriate cultivation conditions for *A. pullulans* CCM 8182. Growth and production properties in optimum conditions were compared with cultivation on waste substrates - oat bran, buckwheat husks, apple fiber and others. Waste substrates can be used as cheap nutrient sources which enable reducing cost of potential biotechnological production.

As a further part of this work, optimization of HPLC/RI method for analysis of exobiopolymers has been done. Optimal mobile phase composition and chromatography conditions were proposed. Column Roa organic acid H<sup>+</sup> was the most suitable for simultaneous separation of glucose and malic acid. Before HPLC analysis hydrolysis of polymers was done. Sulphuric acid (5 mmol.L<sup>-1</sup>) was used as a mobile phase at flow rate 0.5 mL.min<sup>-1</sup> and temperature 60 °C.

The highest production of pullulan occurred using oat bran as a substrate (13.03 g.L<sup>-1</sup>) at an initial pH 7.5. Maximum production of poly-L-malic acid was observed during the cultivation on apple peels (2.89 g.L<sup>-1</sup>) at pH 6. It was found that the higher production of poly-L-malic acid occurred at pH 6, while higher production of pullulan was at pH 7.5.

## KEYWORDS

*Aureobasidium pullulans*, pullulan, poly-L-malic acid

HORÁČEK, P. *Studium produkce extracelulárních polymerů pomocí mikroorganismu Aureobasidium pullulans*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 70 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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 FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za ochotu, všestrannou pomoc při řešení problémů a odborné vedení. Také chci poděkovat mé rodině za finanční a psychickou podporu po celou dobu studia.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>9</b>
1.1 <i>Aureobasidium pullulans</i>	9
1.1.1 Morfologické znaky	9
1.2 Využití <i>Aureobasidium pullulans</i>	11
1.2.1 Produkce enzymů	11
1.2.2 Produkce extracelulárních polymerů (ECP)	11
1.2.3 Využití <i>A.pullulans</i> k posklizňové kontrole ovoce a zeleniny	12
1.3 Pullulan	12
1.3.1 Struktura	12
1.3.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti pullulanu	12
1.3.3 Příprava pullulanu v závislosti na použití	13
1.3.4 Polysyntetické deriváty pullulanu	13
1.3.5 Biomedicínské a farmaceutické aplikace	14
1.4 Poly-L-jablečná kyselina (PMLA)	17
1.5 Kultivace mikroorganismů	18
1.5.1 Kultivační půdy přirozené a umělé	19
1.6 Vliv kultivačních podmínek na růst <i>Aureobasidium pullulans</i> a produkci extracelulárních polymerů	22
1.6.1 Vliv pH na produkci extracelulárních polymerů, růst a morfologii <i>A. pullulans</i>	22
1.6.2 Vliv zdroje a koncentrace uhlíku	22
1.7 Průtoková cytometrie	23
<b>2 CÍL PRÁCE</b>	<b>26</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>27</b>
3.1 Použité mikrobiální kmeny, chemikálie, materiály a přístroje	27
3.1.1 Kmen <i>Aureobasidium pullulans</i>	27
3.1.2 Chemikálie	27
3.1.3 Materiál	27
3.1.4 Přístroje	27
3.2 Kultivace <i>Aureobasidium pullulans</i>	28
3.2.1 Tuhé médium	28
3.2.2 Tekuté médium	29
3.2.3 Stanovení růstové křivky	29
3.2.4 Vliv koncentrace zdroje uhlíku	29
3.2.5 Vliv použitého zdroje uhlíku	29
3.2.6 Vliv počátečního pH	30
3.3 Analýza biomasy a produkovaných metabolitů	30
3.3.1 Gravimetrické stanovení obsahu sušiny	30
3.3.2 Stanovení obsahu celkových sacharidů dle Duboise	30
3.3.3 Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyi-Nelsona	30
3.3.4 Stanovení obsahu bílkovin dle Hartree-Lowryho	31
3.4 Optimalizace stanovení obsahu extracelulárních polymerů	31

3.4.1	Precipitace extracelulárních polymerů a gravimetrické stanovení obsahu	31
3.4.2	Úprava vzorku	31
3.4.3	Optimalizace stanovení ECP metodou HPLC	32
3.5	Kultivace na odpadních substrátech	32
3.5.1	Odpadní substráty bez úpravy	32
3.5.2	Odpadní substráty po aplikaci kyselé hydrolýzy	33
3.5.3	Batch kultivace ve fermentoru	33
3.6	Průtoková cytometrie	33
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>34</b>
4.1	Stanovení celkových sacharidů dle Duboise	34
4.2	Stanovení redukcujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona	34
4.3	Stanovení obsahu bílkovin dle Hartree-Lowryho	35
4.4	Optimalizace stanovení extracelulárních polymerů	36
4.4.1	Úprava vzorku	36
4.4.2	Optimalizace stanovení ECP metodou HPLC	36
4.5	Stanovení růstové křivky a produkce exopolymerů <i>A.pullulans</i>	41
4.6	Vliv koncentrace zdroje uhlíku	43
4.7	Vliv použitého zdroje uhlíku	44
4.8	Vliv počátečního pH média	45
4.9	Kultivace na odpadních substrátech	47
4.9.1	Kultivace bez úpravy substrátu	47
4.9.2	Kultivace bez úpravy substrátu při počátečním pH 6	47
4.9.3	Kultivace <i>A.pullulans</i> bez úpravy odpadního substrátu při počátečním pH 7,5	50
4.9.4	Kultivace na odpadních substrátech po aplikaci kyselé hydrolýzy	52
4.9.5	Srovnání jednotlivých kultivací na odpadních substrátech při různých podmínkách	54
4.10	Kultivace <i>A.pullulans</i> ve fermentoru	57
4.10.1	Kultivace na glycerol-glukózovém médiu	57
4.10.2	Kultivace <i>A.pullulans</i> ve fermentoru na syrovátkovém médiu	59
4.11	Využití průtokové cytometrie ke stanovení viability <i>A.pullulans</i>	60
<b>5</b>	<b>ZÁVĚRY</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK</b>	<b>70</b>

## ÚVOD

*Aureobasidium pullulans* je průmyslově významný kvasinkovitý mikroorganismus, který produkuje řadu metabolitů včetně enzymů, komplexních bílkovin a průmyslově významných polymerů. Některé kmeny jsou schopné produkovat pullulan a poly- $\beta$ -L-jablečnou kyselinu. Tyto biopolymery nacházejí uplatnění v řadě potravinářských, farmaceutických a medicínských aplikací. Výhodou extracelulárních polymerů je, že jsou netoxické, nekarcinogenní, biokompatibilní a biologicky odbouratelné. Jsou snadno modifikovatelné a umožňují vytvářet konjugáty, které jsou používány například jako transportní systémy pro léčiva sloužící k léčbě rakoviny. Jak  $\alpha$ - a  $\beta$ - struktury, tak racemická nebo opticky čistá forma kyseliny poly-L-jablečné mohou být získány chemickou cestou, zatímco mikroorganismy produkují poly- $\beta$ ,L-jablečnou kyselinu s vysokou optickou čistotou, která je pro farmaceutické účely nezbytná. Aby mohly tyto materiály cenově konkurovat polymerům vyráběným z ropy, je v posledních letech cílem snížení nákladů biotechnologické produkce. Jednou z možností je použití odpadních látek potravinářského a zemědělského průmyslu jako substrátů pro kultivaci *A. pullulans* a produkci exobiopolymerů.



# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 *Aureobasidium pullulans*

*Aureobasidium pullulans* je ubikvitní, polymorfní a oligotrofní kvasinkovitá plíseň. Nachází se v různých podnebních pásech, a to od tropického a subtropického pásu přes oblast mírného pásu až po arktický pás, kdy je výskyt spíše vzácný. *A. pullulans* se běžně nachází v oblasti Britských ostrovů a Spojených států, Dánska, Rakouska, Německa, Holandska, Polska, České republiky, Ruska a Japonska. V oblasti tropické a subtropické bylo izolováno například v Brazílii, Indii, Číně, Thajsku, Malajsii, Jamajce [1].

### Taxonomické zařazení *Aureobasidium pullulans*:

#### Synonyma [1]:

*Dematium pullulans* de Bary 1866

*Pullularia pullulans* (de Bary) Berkhout 1923

*Hormonema pullulans* (de Bary) Robak 1932

*Aureobasidium vitis* Viala & Boyer 1891

*Pullularia fermentans* Wynne & Gott 1956

#### Klasifikace [1]:

<b>Říše</b>	Houby
<b>Oddělení</b>	Ascomycota
<b>Třída</b>	Dothideomycetes
<b>Řád</b>	Dothideomycetidae
<b>Čeleď</b>	Dothioraceae
<b>Rod</b>	<i>Aureobasidium</i>
<b>Druh</b>	<i>A. pullulans</i>

*A. pullulans* se obvykle vyskytuje na nadzemních částech rostlin a je dominantní houbou vyskytující se na listech. Roste také v povrchových vrstvách mnoha půd, kde se jeho růst zvyšuje v závislosti na hnojení dusíkem. Tento rod byl izolován jak ze sladké, tak i ze slané vody, je přítomen v rhizosféře trav, semen, v hnízdech a peří ptáků, ve zmrazeném ovoci, na bavlněných tkaninách, betonových plochách, plastech apod. Většina kmenů optimálně roste při teplotě 25 °C a jsou citlivé na zahřívání. Jsou však popsány i kmeny, které jsou schopny se adaptovat a růst při teplotě vyšší či nižší [1,2].

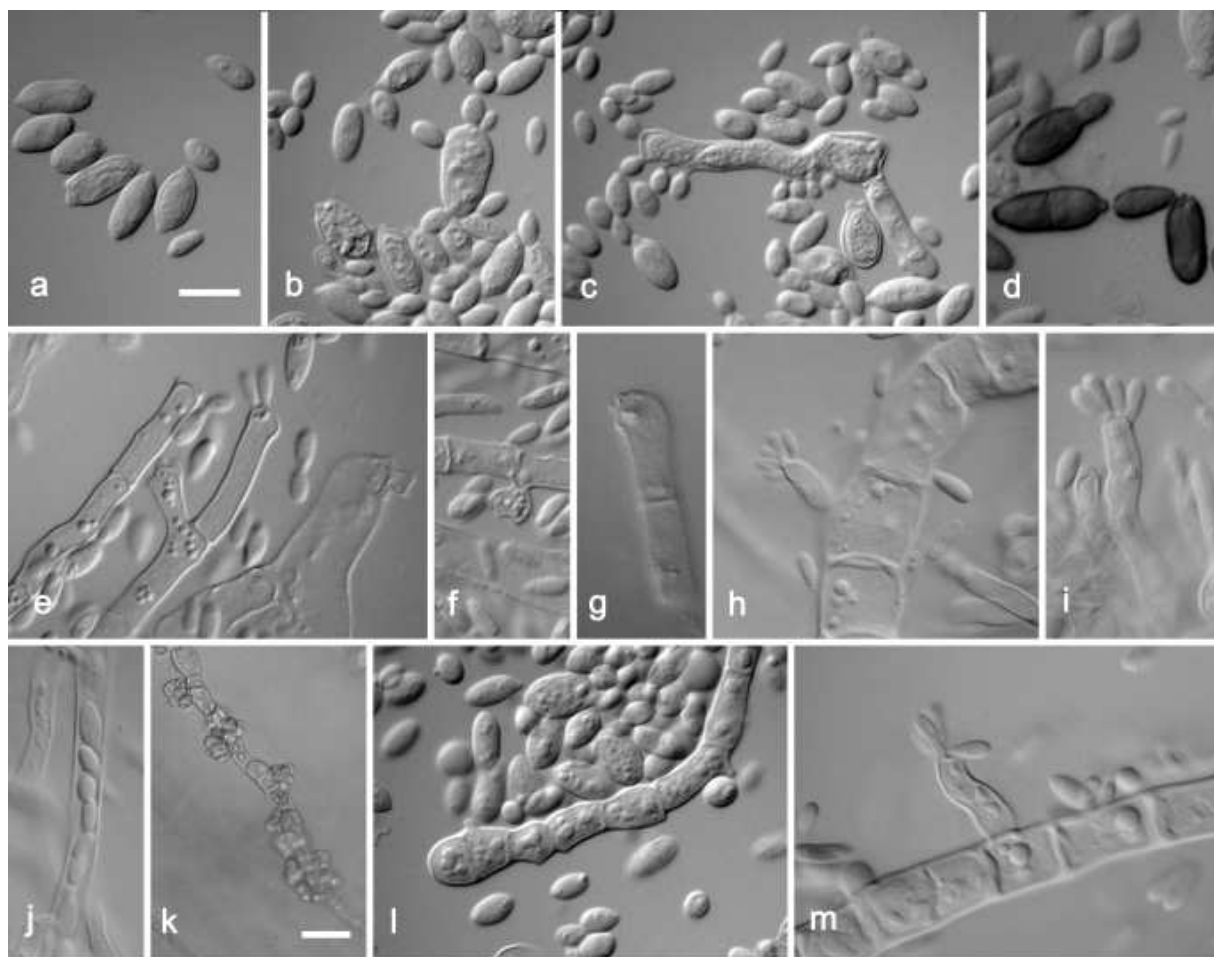
### 1.1.1 Morfologické znaky

Mladé kolonie, které se skládají převážně z pučících kvasinkových buněk, jsou ploché, hladké a lesklé. Jejich zbarvení se pohybuje od bílého po růžové nebo žluté. Stárnutím kolonie získávají sametovou texturu o tmavě hnědé až černé barvě s našedlými okraji. V této fázi je patrný výskyt mycelia a slizké hmoty z konidií. Mycelium je septované o průměru větším než 20 μm, zpočátku je průhledné, postupně se však vyvíjí tmavě hnědá pigmentace, jejíž intenzita je závislá na jeho stáří.

Vzhled kultury *A. pullulans* během jeho růstu na Petriho misce je zobrazen na Obr. 1. *A. pullulans* nemá žádné výrazné konidiofory. Apikální nebo interkalární blastokonidie jsou produkovány nerozlišenými hýfami. Tyto konidie mohou pokračovat v dalším množení pučením za vzniku sekundárních konidií, které bývají zpravidla menší [3,4,5].



**Obr. 1** Vzhled kultury *A.pullulans* na Petriho misce v závislosti na době kultivace; zleva 3. den, 14. den, 30. den



**Obr. 2** Mikroskopické snímky morfologie mikroorganismu *A.pullulans*:

**a.** uvolněná konidie transformující se na pučící buňku; **b.** synchronní produkce konidií na transformovaném konidiu – kvasinkové buňky; **c.** krátká hýfa produkující konidie; **d.** tmavě hnědá konidie; **e-i, m.** slabě rozlišené terminální a interkalární konidiofory; **j.** endokonidie, **k.** imerzní hýfa s postranní akumulací konidií; **l.** hýfa s bočními jizvami; měřítko **a–m** = 10  $\mu$ m; **k** = 20  $\mu$ m. Upraveno dle [5]

Morfologická forma *A. pullulans* je ovlivňována řadou faktorů jako je teplota, pH a koncentrace kyslíku. Také nutriční faktory ovlivňují morfologii, zejména typ a koncentrace zdroje uhlíku, zdroj dusíku a jeho koncentrace, obsah minerálů a další. Všechny tyto faktory ovlivňují zejména kvasinkovou formu mikroorganismu, která je zodpovědná za produkci pullulanu. *Aureobasidium* se dělí na dvě varianty, a to *A. pullulans* var. *pullulans* (viz Obr. 2) tvořící růžové, světle hnědé nebo žluté kolonie, které po delším čase kolonie tmavnou na *A. pullulans* var. *melanogenum* tvořící velmi brzy černé nebo zelenavě-černé kolonie [3,4,5].

## 1.2 Využití *Aureobasidium pullulans*

*A. pullulans* je průmyslově velmi významný organismus vzhledem k produkci řady metabolitů včetně enzymů, bílkovin (SCP), extracelulárních polysacharidů atd.

### 1.2.1 Produkce enzymů

Jednotlivé kmeny *A. pullulans* izolované z různého prostředí mohou produkovat amylázy, proteázy, lipázy, celulázy a další enzymy, které mají široké uplatnění v průmyslových aplikacích. Proteázy se používají v detergentech, kožedělném průmyslu, lékařství, potravinářství, chemickém průmyslu, zpracování odpadů atd. Amylázy se hojně užívají v pekařském, škrobařském, textilním, potravinářském, farmaceutickém a papírenském průmyslu; dále k analýze v medicínské a klinické chemii. V posledních letech vzrostl zájem o amylázy produkované kvasinkami před bakteriálními amylázami, a to vzhledem k jejich bezpečnosti a schopnosti konvertovat škrobnatou biomasu na proteiny a ethanol. Ačkoli je amylázová aktivita mnohem vyšší u bakterií než u *A. pullulans*, bakterie produkují pouze  $\alpha$ -amylázu, kdežto kvasinky produkují i další amylázy. Lipázy katalyzují širokou škálu reakcí včetně hydrolýzy, alkohololýzy, acidolýzy, esterifikace a aminolýzy. Lipázy *A. pullulans* jsou extracelulární a bylo zjištěno, že surová lipáza produkovaná *A. pullulans* HN2.3 má velmi vysokou hydrolytickou aktivitu vůči sádlu, olivovému, arašídovému a sójovému oleji [1].

Fruktooligosacharidy (FOS) jsou řazeny do třídy prebiotik užívaných jako funkční potraviny. Transfruktosylační reakce pomocí  $\beta$ -fruktofuranosidázy (EC 3.2.1.26) je používána právě pro produkci FOS. Bylo zjištěno, že *A. pullulans* DSM 2404 v sacharózovém médiu produkuje až pět různých fruktofuranosidáz. Fruktosyltransferáza z *A. pullulans* CCY-27-1-94 je stabilní v širokém rozmezí hodnot pH s optimálním pH 4,4 a vysokou teplotní stabilitou s optimem při teplotě 65 °C [1,6].

### 1.2.2 Produkce extracelulárních polymerů (ECP)

*Aureobasidium pullulans* je významným producentem extracelulárních polysacharidů, přičemž nejvýznamnějším z nich je pullulan, který nachází uplatnění v řadě oblastí, např. potravinářském průmyslu, farmaceutickém průmyslu a dalších. Dalším průmyslově významným extracelulárním polymerem je kyselina  $\beta$ -poly-L-jablečná. Podrobnější informace o struktuře, vlastnostech a využití ECP jsou uvedeny v kapitolách 1.3 a 1.4. Dosud nebyla plně objasněna funkce pullulanu ve vztahu k buňkám *A. pullulans*. Je možné, že slouží jako ochrana před nepříznivými podmínkami (např. působení teploty).

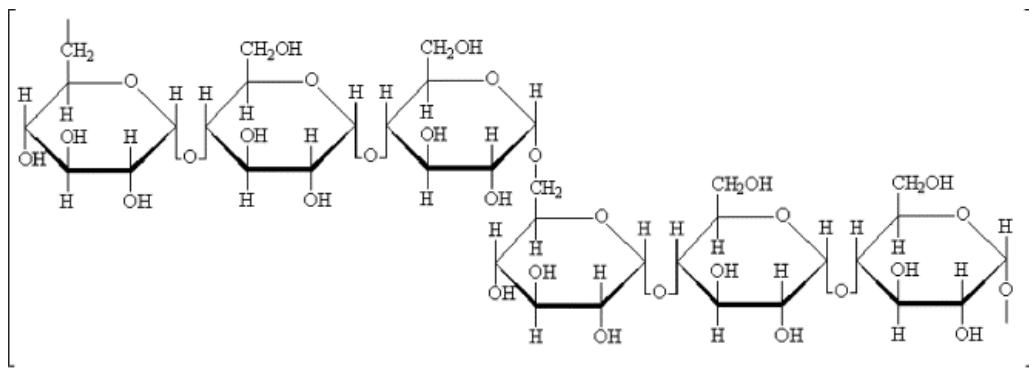
### 1.2.3 Využití *A.pullulans* k posklizňové kontrole ovoce a zeleniny

Primární metodou ošetření ovoce a zeleniny po sklizni je použití fungicidních přípravků. Nicméně obavy veřejnosti z výskytu reziduí vedly k rozvoji výzkumu jiných alternativ ošetření, které by byly méně škodlivé pro lidské zdraví a přírodu. Jelikož k nakažení ovoce a zeleniny posklizňovými chorobami dochází již na poli před samotnou sklizní, bylo by vhodné použít antagonní mikroorganismus ještě před sklizní. V tomto případě daný kmen musí splňovat několik podmínek, a to schopnost tolerovat nízkou dostupnost živin, UVB záření, nízké teploty a klimatické změny. *A. pullulans* je jedním z široce rozšířených a vysoce adaptivních saprofytních mikroorganismů, který má vysokou toleranci k záření a je považován za kontrolního činitele proti posklizňovým onemocněním. Jisté kmeny jsou schopny zamezit např. rozvoji *Penicillium digitatum* na grepech, rozvoji *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* a *Aspergillus niger* na hroznovém víně a rajčatech, rozvoji *Penicillium expansum* na jablcích [1].

## 1.3 Pullulan

### 1.3.1 Struktura

Pullulan je lineární homopolysacharid ( $\alpha$ -D-glukan) složený především z opakujících se maltotriosových jednotek. Ty jsou složeny ze tří molekul glukózy spojených  $\alpha$ -1,4 vazbou, jež jsou propojeny příčně  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) vazbou. Struktura je zobrazena na Obr. 3. Maltotetraózoové jednotky složeny ze čtyř molekul glukózy vazbou  $\alpha$ -1,4, se pravděpodobně vyskytují náhodně a spíše zřídka (6 %) [7]. Byl také zaznamenán vzácný výskyt větvičího místa, kde jsou poly-maltotriosové boční řetězce připojeny k hlavnímu řetězci 1,3-glykosidickou vazbou [1,2,8].



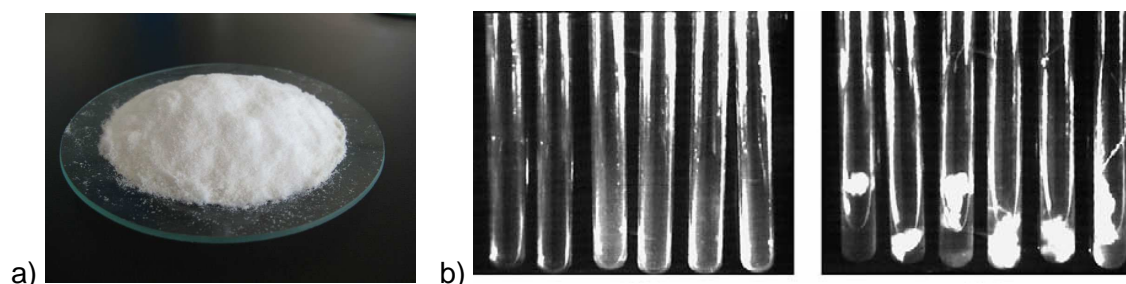
Obr. 3 Struktura pullulanu [1]

### 1.3.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti pullulanu

Jedná se o bílý až mírně nažloutlý prášek (viz Obr. 4a), bez chuti a zápachu, jedlý, netoxický, nekarcinogenní, nemutagenní a biodegradabilní. Na obrázku 4b je zobrazen pullulan získaný srážením ethanolom. Snadno se rozpouští v teplé i studené vodě a je nerozpustný v organických rozpouštědlech, včetně dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu. Vodné roztoky pullulanu jsou velmi viskózní i při relativně nízké koncentraci, ale netvoří gely. Viskozita vodného roztoku závisí na molekulové hmotnosti a nemění se zahřátím, změnou pH ani působením většiny iontů kovů včetně NaCl. Roztoky pullulanu jsou méně viskózní v porovnání s roztoky dalších rozpustných polysacharidů jako je arabská a guaranová guma.

Pullulan je velmi snadno chemicky modifikovatelný a umožňuje vytvářet makromolekulární systémy schopné vytvořit hydrogely. Některé modifikace a aplikace jsou uvedeny v následujících podkapitolách [1,9,10].

Pullulan může tvořit vlákna a tenké filmy, které jsou transparentní, bezbarvé, bez chuti a zápachu a jsou odolné vůči působení tuků a nepropustné pro kyslík. Mohou být použity jako potahový nebo obalový materiál pro potraviny, dále také jako adhesivní a enkapsulační prostředky. Přestože se jedná o  $\alpha$ -D-glukan, je pullulan odolný působení  $\alpha$ -D-amylázy, proto může být použit mimo jiné i v nízkokalorických potravinách [6,9].



**Obr. 4** a) čistý pullulan; b) vlevo supernatant získaný z produkčního média odstraněním biomasy; vpravo supernatant po přidavku ethanolu – vysrážený pullulan [9].

### 1.3.3 Příprava pullulanu v závislosti na použití

Příprava pullulanu se liší v závislosti na jeho použití; při průmyslových aplikacích (adhesiva, disperzační a koagulačních činidla) se fermentační médium pouze zakoncentruje, vysuší a pulverizuje. V případě využití v potravinářství se kultura odbarví použitím aktivního uhlí, zakoncentruje, vysuší a pulverizuje. Pro farmaceutické účely je nutné purifikovat alkoholovou frakcionací nebo membránovou filtrací, odbarvit, odsolit, zakoncentrovat, vysušit a pulverizovat [1,10].

### 1.3.4 Polysyntetické deriváty pullulanu

Vzhledem ke zvýšení použitelnosti může být pullulan derivatizován navázáním různých chemických skupin na jeho základní strukturu. Pullulan obsahuje ve své struktuře devět opakujících se hydroxylových skupin vhodných pro substituční reakce. Reaktivita těchto skupin závisí na rozpouštědle a reakčních činidlech. Tyto skupiny byly podrobeny řadě různých chemických reakcí vedoucích ke vzniku velkého množství derivátů, jejichž stručný přehled je uveden v tabulce 1 [11,12].

**Tabulka 1** Přehled reakcí použitých k přípravě derivátů pullulanu [11]

typ reakce	schéma chemické struktury substituovaného pullulanu (P-OH)
etherifikace	P-O-CH <sub>3</sub> (permethylace)
	P-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2,3</sub> -CH <sub>3</sub> (alkylace)
	P-O-CH <sub>2</sub> -COOH (karboxymethylace) (CMP)
	P-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2,3</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (kationizace)
esterifikace	P-O-CO-CH <sub>3</sub> (acetylace)
	P-O-CO-CH <sub>3</sub> -Cl
	P-O-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-Cholesterol
uretanové deriváty	P-O-CO-NH-CH <sub>2</sub> -CH(OH)-CH <sub>3</sub>
	P-O-CO-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
oxidace	P-COOH
CMP/ hydrazonové deriváty	P-O-CH <sub>2</sub> -CO-NH-doxorubicin
	P-O-CH <sub>2</sub> -CO-NH-protilátka
kopolymerizace	P-O-CH <sub>2</sub> -O-CO-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -R; R= poly (N- isopropylakrylamid)
	P-O-CH <sub>2</sub> -O-CO-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -R; R = poly (butylmethacrylate)

### 1.3.5 Biomedicínské a farmaceutické aplikace

#### Tkáňové inženýrství

Celkové a povrchové vlastnosti jakéhokoliv biomateriálu používaného ve tkáňovém inženýrství ovlivňují dynamiku reakcí, které probíhají na rozhraní tkáňového implantátu. Tyto vlastnosti nebo jejich změna, která probíhá během času in vivo, by měly být předem známy při vytváření biomateriálu určeného pro specifické aplikace. Podobné experimenty byly provedeny i s pullulanem, jež byl konjugován například s interferonem, nízkomolekulárním rekombinantním proteinem rozpustným ve vodě, který má antivirovou i imunoregulační aktivitu. Konjugací s pullulanem byla zachována biologická aktivita léčiva, a zároveň došlo ke zvýšení jeho akumulace v játrech. Povrchová úprava materiálu je rovněž významným nástrojem tkáňového inženýrství [11,12,13].

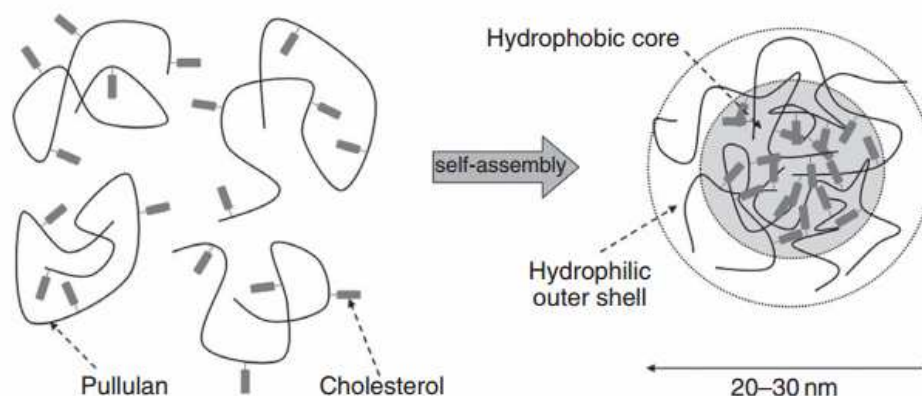
#### Transportní systémy pro léčiva

Všechny regulované systémy aplikace léků jsou zaměřeny na řízené uvolňování terapeutické dávky léčiva a snížení vedlejších účinků tím, že dodávají tu správnou koncentraci léku v případě potřeby (tj. kontrola času) a na správném místě (tj. kontrola distribuce). Konjugace polymeru a léčiva je jednou z hlavních strategií modifikace léčiv, kde se manipuluje s terapeutickými látkami na molekulární úrovni s cílem zvýšit jejich rozpustnost ve vodě, propustnost a stabilitu a tím i biologickou aktivitu. Zmíněné konjugáty jsou detailně popsány v modelu navrženém Ringsdorfem v roce 1975 [14]. Konjugovaný systém jako takový je neaktivní, ale může uvolnit aktivní látky po chemické nebo enzymatické hydrolyze chemické vazby mezi polymerem a léčivem [15].

Poměrně nedávno byly intenzivně zkoumány konjugáty polymerů a protinádorových látek, přičemž se některé prekurzory ukázaly jako slibné. Konjugace snižuje koncentraci volného léčiva v krvi a působení na další citlivé tkáně. Prekurzory léčiv a konjugáty mají v porovnání s volným léčivem delší poločas rozpadu, což vede k pasivnímu hromadění léčiva v nádoru. Byly například vyvinuty různé makromolekulární transportní systémy pro léčiva, s nimiž byly provedeny experimenty na zvířatech i klinické experimenty. Některé syntetické polymery, jako jsou např. kopolymery N-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu, polyethylenglykolu a polysacharidy, byly převážně využívány jako transportní systémy pro protinádorová léčiva, jako jsou doxorubicin, paclitaxel a camptothecin. Nicméně, některé syntetické konjugáty určené pro lyzozomotropní transport léků neuspěly již v raném stádiu klinického výzkumu vzhledem k nepřijatelné toxicitě těchto látek. Z celkového hlediska jsou polysacharidy považovány za nejslibnější nosiče léčiv a enzymů [15].

Gheorge a kolektiv [16] navázali poly(N-isopropylakrylamid-ko-akrylamid) na pullulan za účelem zvýšení tepelné citlivosti vzniklého kopolymeru. Poté byly zbývající hydroxylové skupiny podrobeny reakci s anhydridem kyseliny jantarové a do struktury tak byly zavedeny pH citlivé jednotky (-COOH); výsledný pullulan má více hydrofilní povahu než nativní polymer. Mikročástice připravené z pH senzitivního pullulanu mohou být pak použity jako transportní systém pro léčiva [9,16].

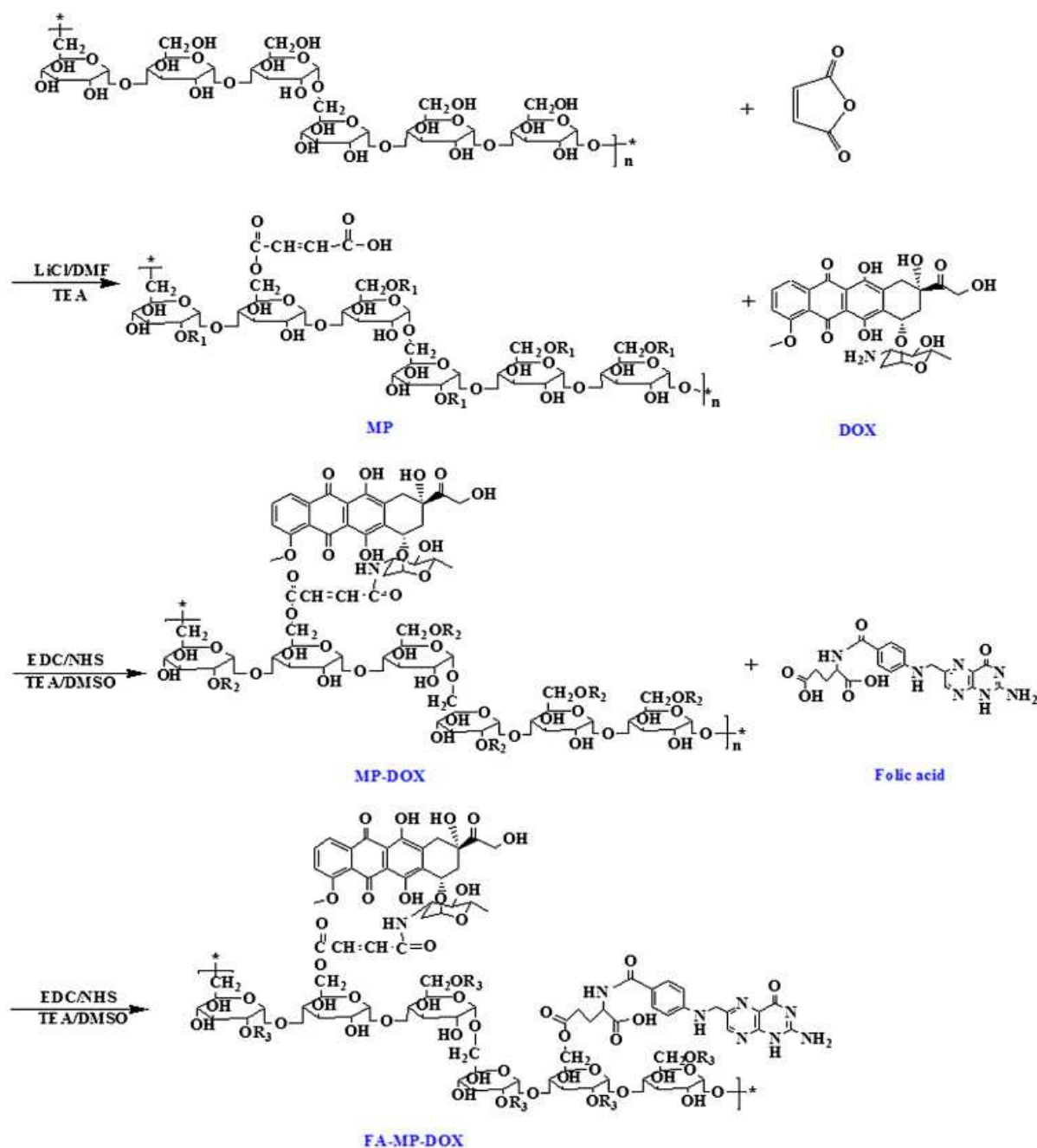
Některé typy polymerních nanočástic jsou vzhledem ke svým příznivým vlastnostem jako je biodegradabilita, biokompatibilita, stabilita a jejich potenciál pro delší působení rovněž velmi vhodné pro cílený transport léčiv např. do mozku přes hematoencefalickou bariéru. Akiyoshi a kol. [17] dosáhli významných úspěchů při přípravě amfifilních polymerů se schopností samovolné agregace do formy nanogelů. Monodisperzní a koloidně stabilní nanogelové částice (20-30 nm) vznikají samosbalemím částečně hydrofobních (5 hm.%) cholesterolových skupin s pullulanem (CHP) ve vodě (zobrazeno na Obr. 5). Tyto nanočástice mohou spontánně tvořit komplexy s různými hydrofobními látkami a rozpustnými proteiny (albumin, chymotrypsin, inzulin) pomocí hydrofobních interakcí. Tímto způsobem byl vyvinut systém pro cílený transport inzulinu. Vzniklé komplexní nanočástice byly stabilní a chránily inzulin před enzymatickou degradací a potlačily jeho akumulaci. Bylo prokázáno, že biologická aktivita komplexu inzulinu in vivo zůstala nezměněna [12,17].



**Obr. 5** Schematické znázornění tvorby cholesterol-pullulanového konjugátu ve vodném roztoku [12]



Pullulan může být také použit pro zaměřování nádorových buněk. Scomparin ve své práci [18] navrhla dva nové „protirakovinné“ polymery k detekci nádorových buněk. Pullulan byl derivatizován buď doxorubicinem nebo doxorubicinem a kyselinou listovou. Poté by pullulan aktivován opakovanou oxidací a funkcionalizován redukční konjugací s merkaptaminem a 1,9 kDa polyethylenglykolem amonným [PEG (NH<sub>2</sub>)]. Tato studie naznačuje, že doxorubicin-pullulanové biokonjugáty mají vhodné vlastnosti pro pasivní zacílení nádorů, zatímco konjugáty s kyselinou listovou a pullulanem mají limitovaný vliv na selektivní buněčnou absorpci [10,11,18]. Postup přípravy konjugátu je zobrazen na Obr. 6.



Obr. 6 Syntéza konjugátu pullulanu a doxorubicinu [15]



## Transportní systémy pro genovou terapii

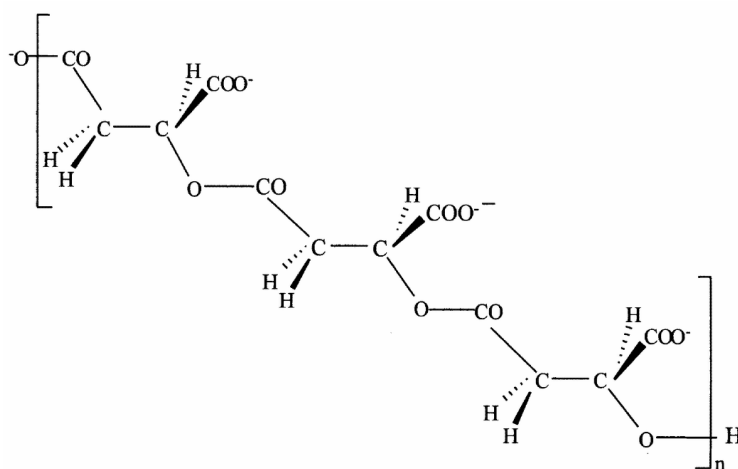
Genová terapie je obvykle realizována pomocí virových vektorů, přičemž hlavní jejich nevýhodou je to, že jsou imunogenní, způsobují onemocnění a mohou být zdraví škodlivé. Proto je cílem řady studií vývoj syntetických vektorů na bázi kationaktivních derivátů přírodních polymerů [19]. Studium transportních systémů cílených na játra je zaměřeno na kompatibilitu kationaktivního pullulanu v krevním oběhu, fyzikálně-chemické vlastnosti, příjem nanokomplexu hepatocyty a in-vitro transfekci. Vzhledem k vysoké specifitě pullulanu pro jaterní buňky je tato vlastnost využívána prostřednictvím vhodných konjugátů pullulanu a léčiva. Hosseinkhani a kolektiv [20] spojili deriváty pullulanu s plazmidovou DNA ve vodném roztoku obsahujícím ionty zinku. Tento konjugát zvyšuje míru genové exprese u jaterních buněk, která trvá po dobu 12 dnů od aplikace [11,12,19].

### Náhrada krevní plazmy pomocí pullulanu

Pullulan byl také prozkoumán jako možná náhrada krevní plazmy, podobně jako se používá dextran. Polymery, které jsou přirozeně velmi dobře rozpustné ve vodě, jsou vhodné k tomuto účelu a tuto podmínku splňuje i pullulan. Pullulan o vyšší molekulové hmotnosti způsobuje zvýšení krevního tlaku, kdežto polymer o nižší molekulové hmotnosti je z těla velmi rychle vylučován a zanechává hemorhagický šok. Jako náhradu krevní plazmy je tedy doporučeno používat pullulan o molekulové hmotnosti okolo 60 kDa [11,12].

## 1.4 Poly-L-jablečná kyselina (PMLA)

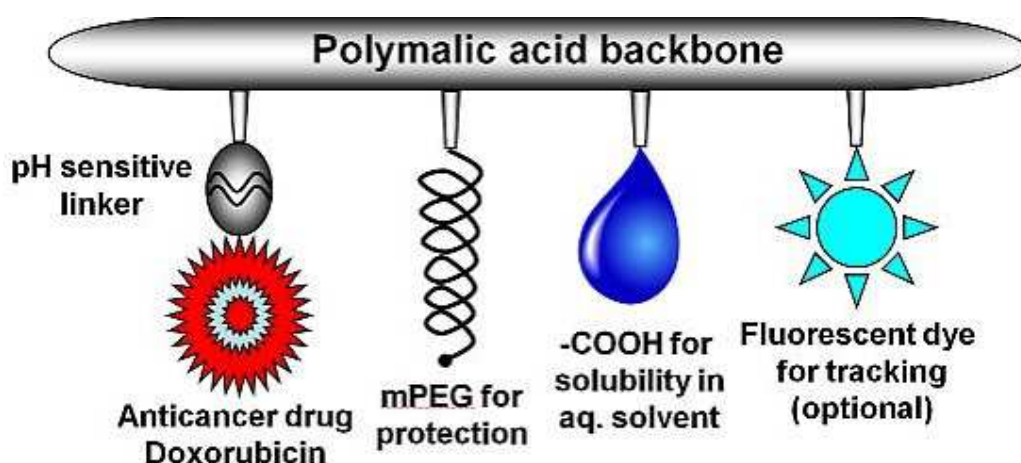
Poly-β-L-jablečná kyselina (Obr. 7) je nevětvený čtyřuhlíkatý polyester složený z monomerních jednotek L-malátu. Jednotky jsou připojovány přes karboxylovou skupinu do α polohy a rovněž do β-polohy tvořící ester. Jak α- a β- struktury, tak racemická nebo opticky čistá forma poly-L-malátu mohou být získány chemickou cestou, zatímco mikroorganismy produkují výhradně poly(β,L-jablečnou kyselinu) s vysokou optickou čistotou. Před objevením možné produkce biologickou cestou s využitím myxomycet a některých vláknitých hub byl polyester kyseliny jablečné syntetizován z odpovídajících laktonů. V roce 1969 byla ohlášena Shimadem a kol. první izolace, v té době plně necharakterizovaného poly-L-malátu, z *Penicillium cyclopium* [21]. O dvacet let později byl tento polymer „znovuobjeven“ jako inhibitor DNA-polymerázy u *Physarum polycephalum* a byl podrobně charakterizován [22,23].



Obr. 7 Struktura PMLA [24]

PMLA byla poté uznána jako nový typ biopolymeru, jehož velké množství bylo izolováno Nagatem a kol. v roce 1993 z *Aureobasidium pullulans* [25]. PMLA je nyní řazena mezi poly- $\beta$ -hydroxyalkanoáty. Tyto polymery, zvláště poly- $\beta$ -hydroxybutyrová kyselina (PHB), jsou syntetizovány a uchovávány v zásobních granulích mnoha bakterií a jsou biotechnologicky produkovány pro průmyslovou výrobu biodegradabilních plastů. PMLA dosud nebyla objevena u bakterií. Metabolická dráha syntézy a degradace PMLA pravděpodobně nesouvisí s metabolickou dráhou syntézy polyhydroxyalkanoátů. Zatímco tyto lipofilní polyestery mají funkci zásobárny uhlíku a energie, PMLA interaguje s dalšími biopolymery z důvodu vysokého náboje a rozpustnosti [24,26].

PMLA je plně biodegradabilní a biokompatibilní a má výjimečně dobré vlastnosti pro použití jako transportní systémy pro léčiva, které mohou specificky zacílit určitou tkáň a kovalentně se navázat. Bylo již publikováno použití nanokonjugátů s PMLA obsahujících několik funkčních modulů schopných projít hematoencefalickou bariérou, jakožto látek používaných k chemoterapii u nádorů mozku [24]. Na obrázku 8 je zobrazena struktura takového konjugátu. Na kostru kyseliny poly-L-jablečné je navázán doxorubicin jako protirakovinné léčivo, polyethylenglykol, který slouží jako ochrana proti enzymové degradaci, -COOH skupiny zajišťují dobrou rozpustnost ve vodných roztocích a fluorescenční barvivo (značka) slouží k detekci konjugátu in-vivo [24,26].



Obr. 8 Schématické zobrazení nanokonjugátu kyseliny poly-L-jablečné [26]

## 1.5 Kultivace mikroorganismů

V současné době lze kultivovat v laboratoři téměř všechny druhy bakterií, kvasinek a plísní i části prvoků. Kultivační média musí splňovat optimální podmínky pro růst mikrobů. Za optimálních podmínek mají mikroorganismy obrovskou rozmnožovací schopnost, rozmnožují se obvykle přímým anebo nepřímým dělením [27].

Dostatečnou možnost pomnožení mikroorganismů zajišťují tekuté živné půdy. Tekuté živné půdy se využívají především pro pomnožení všech mikroorganismů. Mikroorganismy rostou buď v zákalu, nebo rostou jako povrchová blána. Kapka tekuté půdy (bujón) s pomnoženými mikroby se nanese na tuhou živnou půdu (agar), kde vyrostou v optimálním prostředí z jednoho jedince za 16 až 18 hodin shluk milionů zárodků, který je viditelný pouhým okem. Tento shluk se nazývá kolonie a má přibližně velikost špendlíkové hlavičky. Velikost, vzhled a další vlastnosti kolonie (okraje, povrch, transparentnost, barva, změna

v okolí, konzistence a zápach) jsou charakteristické pro určitý mikroorganismus a mohou tak sloužit k jejich předběžnému rozeznání případně k vyhodnocení kontaminace čisté kultury jiným mikroorganismem [28,29].

Kromě živin v kultivačních médiích je třeba pro růst mikroorganismů zajistit optimální teplotu, vlhkost, pH prostředí, u některých je významnou podmínkou vhodné plynné prostředí pro kultivaci (anaerobní prostředí aj.) [29].

### **1.5.1 Kultivační půdy přirozené a umělé**

Podle svého původu se všechny kultivační půdy dělí na půdy přirozené (komplexní) a na půdy umělé. K jejich přípravě se používají buď hotové přírodní produkty nebo komponenty, které se mohou z těchto produktů připravit. Při přípravě polosyntetických médií nebo médií na speciální účely se do nich přidávají peptony, různé extrakty, hydrolyzáty, které zabezpečují optimální výživu mikroorganismů. Sojová mouka se přidává do kultivačních médií buď přímo, nebo jako enzymatický či kyselý hydrolyzát. Kromě vysokého obsahu škrobu a bílkovin má též vysoký obsah tuků, které mohou při kontinuální kultivaci působit jako protipěnicí přípravek [27,29].

Přirozenými půdami jsou také kravské mléko, lakmusové mléko, králičí sérum nebo vaječné půda. Dalšími přirozenými živnými médii jsou plátky bramboru, mrkev, jablko, ovocné a zeleninové kaše, šťávy a další. Tyto půdy jsou vhodné na krátkodobou kultivaci určitého mikroorganismu nebo na izolaci přírodních zdrojů [28,30]. Nevýhodou přirozených půd je skutečnost, že neznáme přesně jejich chemické složení, nejsou tedy jednoznačně chemicky definovány a jednotlivé substance k jejich přípravě se mohou ve svém složení a vlastnostech odlišovat v závislosti na konkrétním výrobcu [29].

Složení kultivačních půd umělých (syntetických, minerálních) je přesně známé, neboť jsou tvořeny substancemi jednoznačně chemicky definovanými, zejména anorganickými sloučeninami. Do umělých půd patří rovněž půdy organické, jež obsahují vedle minerálních složek i různé sacharidy a aminokyseliny jako zdroje energie a dusíku [29].

### **Úprava hodnoty pH kultivačních médií**

Hodnota pH je velmi důležitý činitel pro růst mikroorganismů. Většina mikroorganismů roste na médiích s neutrální hodnotou pH, některé druhy však mohou vyžadovat média i výrazně kyselá nebo mírně alkalická. Bakterie vyžadují pH 7 – 7,4; kvasinky a mikromycety slabě kyselá prostředí pH 4,5 – 6. Jen málo organismů roste při extrémních hodnotách pH [27].

### **Zdroj uhlíku**

Pro většinu heterotrofních mikroorganismů musí kultivační médium kromě biogenních prvků a růstových faktorů obsahovat vhodný zdroj uhlíku, většinou ve formě jednoduchých sacharidů nebo polysacharidů. Zdrojem uhlíku se mohou stát i přirozené ingredience, které jsou zároveň zdrojem uhlíku i růstových faktorů, jako jsou pepton, masový extrakt, kaseinový hydrolyzát [27].

### **Zdroj dusíku**

Jako zdroj dusíku můžou mikroorganismy využívat vzdušný dusík, dusitany, dusičnany, amonné soli nebo organicky vázaný dusík v aminokyselinách, peptidech, peptonech až nativních bílkovinách. Vzdušný dusík využívají některé bakterie v procesu fixace dusíku (např. *Azotobacter*). Nejvhodnějším zdrojem dusíku pro většinu heterotrofních

mikroorganismů jsou amonné soli. Vhodným zdrojem je také močovina. Velmi náročné na zdroj dusíku jsou mléčné bakterie, které vyžadují přímo některé esenciální aminokyseliny, peptidy nebo bílkoviny, bez jejichž zdroje nejsou schopné se rozmnožovat [27].

### **Zdroj růstových faktorů**

Auxotrofní mikroorganismy, které nejsou schopny syntetizovat růstové faktory, si vyžadují jejich přítomnost v kultivačním médiu. Růstovými faktory mohou být vitamíny, aminokyseliny, purinové a pyrimidinové báze, vyšší mastné kyseliny nebo aminy. Růstové faktory si vyžadují mikroorganismy, které je nenacházejí ve svém přirozeném prostředí (např. patogenní nebo mléčné bakterie či kultury, které mutací ztratily schopnost je syntetizovat (auxotrofní mutanti).

### **Zdroje minerálních látek**

Důležitými složkami živných médií jsou fosfor a hořčík, které se zúčastňují přenosu energie pomocí reakcí zprostředkovaných adenosin trifosfátem. Zdrojem fosforu jsou soli kyseliny fosforečné. Jeho nedostatek způsobuje zpomalení růstu, popřípadě fermentačních procesů mikroorganismů. Další biogenní prvky jako jsou draslík, vápník, železo, chlór, molybden, zinek, měď, kobalt, bór a nikl se přidávají do živného média ve formě solí v malých koncentracích, jež jsou zjištěny experimentálně v závislosti na daném mikroorganismu [27].

### **Voda**

Voda je nejdůležitější komponenta, na níž je úzce vázán vývoj, růst a rozmnožování mikroorganismů. Dodržovat vysoký stupeň jakosti použité vody je velmi důležité. Může být jednou ze závažných příčin, proč nelze srovnávat kultivační média připravená na různých pracovištích. Destilovaná voda se používá na přípravu syntetických a specifických půd.

Výrobní proces při mikrobiální produkci se skládá z řady dílčích postupů, které za sebou následují v tomto pořadí:

1. předběžná úprava výchozí suroviny;
2. sterilizace výchozích látek a doplňkových složek kultivačního prostředí;
3. vlastní biochemická přeměna;
4. desintegrace produkčního mikroorganismu v případě, že produkt není vylučován do prostředí a hromadí se uvnitř buněk;
5. izolace produktu;
6. dodatečná úprava produktu [27].

### **Povrchová kultivace**

Metoda povrchové fermentace je prováděna dvěma způsoby. Při prvním se používají podlouhlé perforované nádoby s polotuhým médiem (ve vrstvě 1 až 10 cm), které se po zaočkování produkčním kmenem umístí v prostorech s konstantní teplotou a vlhkostí. Při druhém způsobu se kultivace provádí v pomalu se otáčejících bubnech opět s kontrolou teploty a vlhkosti.

## Submerzní kultivace

Při submerzní fermentaci se používají průmyslové fermentory o objemu 5 – 50 m<sup>3</sup>; obvykle se využívá asi 80 % jejich objemu. Mezi různými možnostmi technické realizace submerzního fermentačního postupu lze rozlišit dva hlavní typy: prvním je jednorázový vsádkový způsob, kdy jsou do fermentoru najednou vpraveny substráty, doplňkové živiny a mikrobiální buňky a po uplynutí určité doby se izoluje produkt. Druhou možností představuje kontinuální způsob, spočívající v nepřetržitém přidávání výchozích složek náplně bioreaktoru a v odebrání produktu a odpadních látek kultivačního média.

V některých případech je výhodnější vsádkový způsob, např. při produkci antibiotik a obecně při výrobě látek požadovaných jen v malých množstvích. Kontinuální proces je používán ve velkoobjemových výrobcích (např. ethanolu, aminokyselin, krmné biomasy), avšak vývoj směřuje k tomu, aby se uplatnil i tam, kde je dnes užíván jednorázový vsádkový postup. Velkým nedostatkem kontinuálního procesu ovšem je, že spolu s odebraným produktem a odpadními látkami jsou z fermentoru odváděny i mikroorganismy. Řešení bylo nalezeno v imobilizaci buněk vazbou na nosič, který může být trvale umístěn v bioreaktoru nebo je snadno oddělitelný od ostatních složek odebíraných z kultivační nádoby [27].

Velmi důležitou a často velice náročnou částí výroby je izolace získaného produktu. Je-li vylučován produkčním mikroorganismem do kultivačního média, lze produkt izolovat přímo. V případě, že se hromadí uvnitř buněk, až po jejich dezintegraci. Hlavní oblasti uplatnění průmyslové mikrobiologie jsou:

- A. Produkce mikrobiální biomasy z různých odpadních surovin; je především zdrojem komplexních bílkovin (SCP) pro krmné účely a perspektivně i pro lidskou výživu. Slouží však i k výrobě dalších látek (fosfolipidů, vitamínů, nukleotidů aj.).
- B. Provádění syntéz a konverzí, při nichž se výchozí látky přeměňují na žádané konečné produkty. Jde-li o vznik složitějších látek z jednodušších prekurzorů za použití celé metabolické dráhy nebo její větší části, hovoříme o biosyntéze [27].

Jako biotransformaci nebo biokonverzi pak označujeme procesy, které zahrnují jen jednu nebo několik málo enzymových reakcí. Přeměny složitějších substrátů na jednodušší produkty, při nichž dochází pouze k přesunům atomu vodíku mezi meziprodukty, nikoli k úplné oxidaci substrátů jako při respiraci (dýchání), označujeme jako fermentaci. Mikroorganismy lze použít k výrobě široké palety organických sloučenin typu:

- a) tzv. primárních metabolitů, což jsou nízkomolekulové látky, které jsou nezbytné pro metabolismus a růst organismu (aminokyseliny, nukleotidy, vitamíny, organické kyseliny aj.)
- b) sekundárních metabolitů, tj. nízkomolekulových látek, které nejsou nezbytné pro buněčné syntézy a nehrají proto přímou úlohu v metabolismu a růstu (např. antibiotika, toxiny, alkaloidy, pigmenty aj.)
- c) biopolymerů, jako jsou enzymy, polysacharidy a poly- $\beta$ -hydroxybutyrát;
- d) čištění odpadních vod a likvidace dalších znečištěnin - biotechnologie životního prostředí;
- e) použití mikroorganismů na extrakci malých až stopových kvant kovů z drcených nerostných surovin [27].

## 1.6 Vliv kultivačních podmínek na růst *Aureobasidium pullulans* a produkci extracelulárních polymerů

### 1.6.1 Vliv pH na produkci extracelulárních polymerů, růst a morfologii *A. pullulans*

Optimální pH pro produkci pullulanu se nachází v rozsahu od 5,5 do 7,5. Existuje pouze několik studií, kdy došlo k vysoké produkci polymerů při kyselém pH kultivačního média. Toda a kol. zjistili, že i malá odlišnost pH v blízkosti neutrální hodnoty ovlivňuje produkci [31]. Zajímavý je fakt, že optimální pH pro růst biomasy je 4,5 a nižší. Rozdíl mezi optimální hodnotou pH pro produkci pullulanu a pro nárůst buněčné hmoty nepřímo souvisí s nezávislým charakterem těchto dvou procesů. Nicméně není možné ignorovat vztah mezi morfologií buněk a schopností kultury produkovat pullulan [32].

Stále je předmětem diskuze a zkoumání, která morfologická forma je zodpovědná za produkci polymeru. Ve většině studií zaměřených na produkci pullulanu byl získán díky kvasinkové formě *A. pullulans*. V několika dalších publikacích je schopnost produkce charakteristická pro chlamydostry. S jistotou je možné konstatovat, že hodnota pH vyvolává morfologické změny buněk, které pak dodatečně rozlišují biosyntetické cesty produkce. Kvasinková forma při neutrálním pH produkuje pullulan o velké molekulové hmotnosti, zatímco kombinovaná kultivace mycelární a kvasinkové formy je odpovědná za vysokou produkci pullulanu [32,33].

### 1.6.2 Vliv zdroje a koncentrace uhlíku

Produkce extracelulárních polymerů je závislá na zdroji uhlíku. Divoké kmeny *A. pullulans* izolované Benderem a kol. spotřebovaly během 5 denní kultivace 22 g·dL<sup>-1</sup> glukózy a 20 g·dL<sup>-1</sup> sacharózy, přičemž produkovaly 1,3 g extracelulárních polymerů na 1 g biomasy [34]. *A. pullulans* je schopné v závislosti na kmenu růst nejen na médiu obsahujícím glukózu a sacharózu, ale také fruktózu, maltózu, manózu, galaktózu a další sacharidy. Některé divoké kmeny intenzivně rostou na maltózovém médiu, nicméně produkují nízké koncentrace pullulanu. Problém s nízkou produkcí byl následně vyřešen mutací několika kmenů s výsledkem zvýšení jejich schopnosti produkovat pullulan [1,34].

S cílem snížit náklady produkce pullulanu byly pro biosyntézu použity ekonomicky výhodné substráty; například hydrolyzát bramborového škrobu, syrovátka, řepná melasa, šťáva z cukrové třtiny, kokosové mléko a slupky nebo také hydrolyzát rašeliny. V případě použití odpadních substrátů, kdy není známo přesné chemické složení, je velmi vhodné provést analýzu chemické struktury produkovaných polysacharidů, jelikož se výsledná molekulární struktura může výrazně lišit.

S komplexním monomerním složením extracelulárních polysacharidů produkovaných *A. pullulans* je možné se setkat nejen u odpadních materiálů, ale také při použití přesně definovaných analogů glukózy jako je např. 3-O-methy-D-glukóza, D-glukózamin a N-acetyl-D-glukózamin. Při použití těchto tří substrátů některé skupiny syntetizují exopolymery obsahující jen glukózu a mannózu, v některých dalších studiích byla získána složitá molekulární struktura polysacharidů [32].

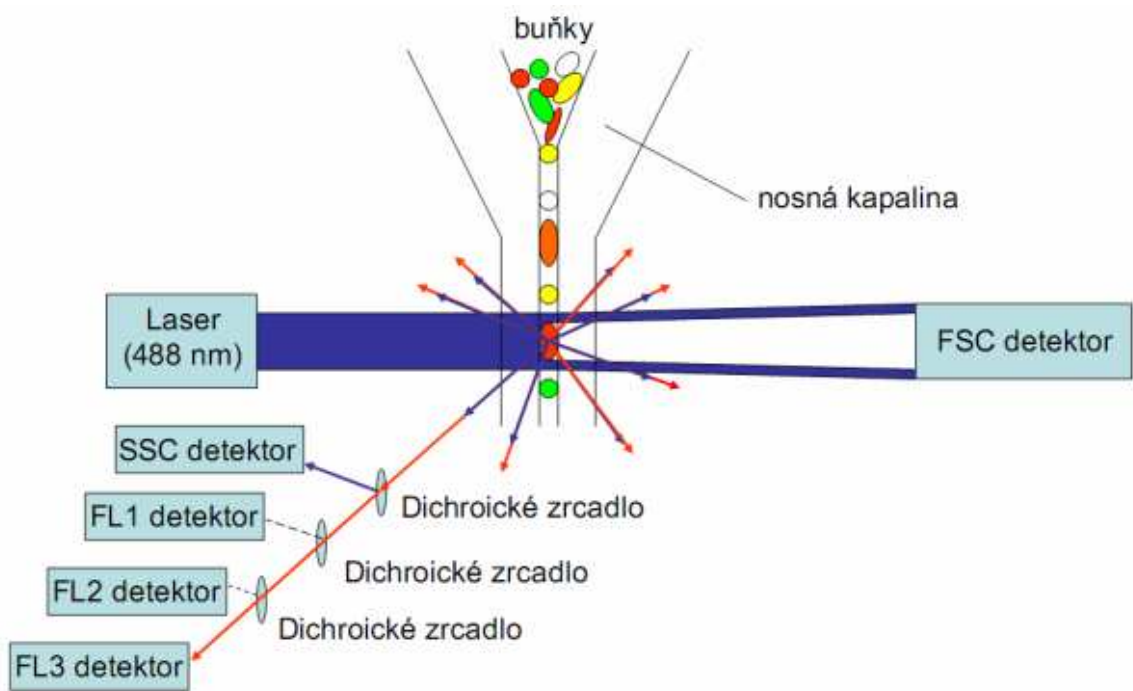
Při optimalizaci biotechnologické produkce extracelulárních polysacharidů je velmi důležité charakterizovat vhodně viabilitu použité mikrobiální kultury a její změny v průběhu kultivace za různých podmínek, případně na různých typech substrátu. Jednou z moderních metod stanovení živých a mrtvých buněk a životaschopnosti mikrobiální kultury je průtoková cytometrie.

### 1.7 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je moderní technika sloužící k provedení rychlého měření nejen fyzikálně-chemických vlastností na úrovni jedné částice nebo buňky v suspenzi, které jsou unášeny laminárním tokem nosné kapaliny do měřicí cely, kde jsou hydrodynamicky zaostřeny. Poté procházejí konstantní rychlostí jednotlivými laserovými paprsky, kdy během průchodu dochází k detekci fluorescence. Buňky (částice) jsou následně unášeny do třídící jednotky nebo odpadní nádoby. Detektory jsou zaměřeny do bodu, kde dochází k průchodu kapaliny světelným paprskem; jeden detektor je umístěn v rovině světelného paprsku (rozptyl světla v přímém směru – FSC detektor), který je úměrný velikosti buněk (částic) a další jsou umístěny kolmo na něj (rozptyl světla pod úhlem 90° - SSC detektor), který odpovídá granularitě a optickým vlastnostem částic; dále je použit jeden či více fluorescenčních detektorů [35,36,37].

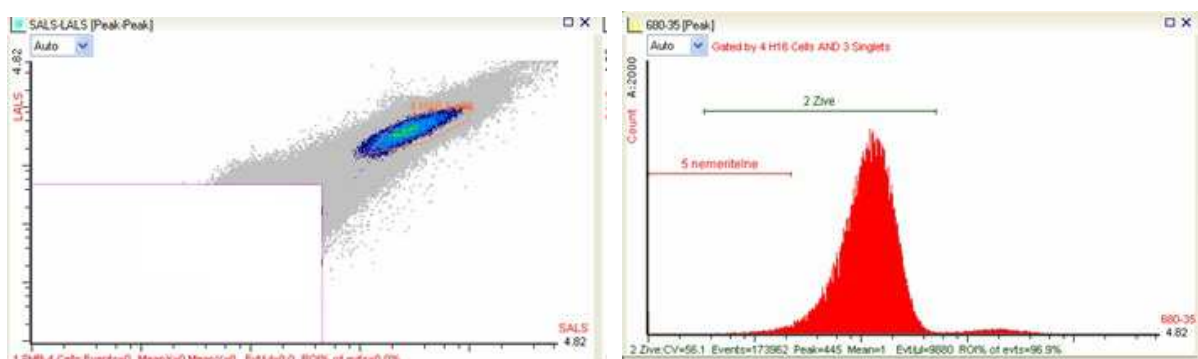
K barvení různých buněčných struktur se používá celá řada fluorescenčních barviv, které se mohou specificky vázat například na DNA, buněčnou stěnu, lipidy apod. Ke stanovení viability se nejčastěji využívají barviva schopné vazby na DNA. V praxi se využívají tři základní skupiny fluorochromů. První skupina látek se neselektivně vmezeňuje do dvoušroubovice DNA, což dovoluje stanovit celkové množství nukleové kyseliny. Do této skupiny patří např. propidiumjodid a ethidiumbromid, kdy je propidiumjodid častěji používán vzhledem k jeho nižší toxicitě. Druhá skupina látek se váže na oblasti DNA bohaté na A-T báze. Nejpoužívanější je DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol). Při použití těchto látek se histogramy vyznačují vysokou rozlišovací schopností a umožňují detekovat částice lišící se jen nepatrně v množství či složení DNA. Nedají se však použít pro zjištění absolutního množství DNA. Poslední skupinou jsou fluorescenční barviva (např. antibiotika mitrmycin, chromomycin), které se váží k úsekům bohatým na G-C báze [37,38,39].

Uspořádání měřicí cely průtokového cytometru se znázorněním principu průtokové cytometrie je zobrazeno na obrázku 9.



**Obr. 9** Schéma měřící cely průtokového cytometru se znázorněním principu průtokové cytometrie [40]

Jak již bylo zmíněno, optika obsahuje excitační zdroje (nejčastěji se jedná o lasery) a sběrné optické dráhy, které systémem čoček, zrcadel a optických filtrů zachycují fluorescenční a rozptýlené záření a převádějí je na opticky aktivní vrstvu optoelektronických detektorů (fotonásobičů a fotodiód) tvořících rozhraní mezi optickým a elektronickým podsystémem průtokového cytometru. Z technického hlediska je nejsložitějším systémem právě elektronika, která převádí optické signály na signály elektronické, které poté zesiluje, digitalizuje a zpracovává do srozumitelné formy, kterou je grafická reprezentace jednotlivých buněk (částic) na monitoru řídicího počítače [38]. Ukázka grafického výstupu je uvedena na obrázku 10.



**Obr. 10** Grafický výstup z průtokové cytometrie; vlevo – výběr oblasti buněk; vpravo – zobrazení živých a mrtvých buněk



Průtoková cytometrie nachází uplatnění v řadě vědních oborů, a to například v medicíně, biochemii, mikrobiologii a dalších. V současné době se používá i v klinické praxi při diagnostice rakoviny či při imunologickém vyšetření pacientů s virem HIV. Dovoluje velmi rychlou analýzu až tisíce buněk (částic) za sekundu s možností oddělení jednotlivých částic na základě zvoleného parametru za předpokladu, že je přístroj vybaven třídící jednotkou. Z mikrobiologického hlediska je nejčastěji využíván ke sledování viability buněk, obsahu DNA, RNA, celkového obsahu proteinů, enzymové aktivity, intracelulárního pH, membránového potenciálu, oxidativního stresu a řady dalších vlastností, které lze odlišit vhodně zvoleným značením fluorescenčními sondami nebo sledováním autofluorescence [38,39].

## 2 CÍL PRÁCE

- Rešerše na téma využití *Aureobasidium pullulans* v biotechnologiích, charakterizace produkovaných extracelulárních látek.
- Optimalizace metod analýzy extracelulárních polymerních látek v kultivačním médiu.
- Experimentální studie vlivu podmínek a kultivačního uspořádání na produkci extracelulárních polymerů pomocí *Aureobasidium pullulans*.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité mikrobiální kmeny, chemikálie, materiály a přístroje

##### 3.1.1 Kmen *Aureobasidium pullulans*

Pro experimentální práci byl použit kmen *Aureobasidium pullulans* CCM 8182 získaný z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy Univerzity MU v Brně.

##### 3.1.2 Chemikálie

Standardy:

Glukóza monohydrát, p.a., Lach-Ner, ČR  
Fruktóza, p.a., Lach-Ner, ČR  
Laktóza p.a, Lach-Ner, ČR  
Maltóza p.a., Lach-Ner, ČR  
Kyselina L-jablečná, Sigma-Aldrich, SRN  
Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, SRN  
Pullulan, Sigma-Aldrich, SRN  
Pullulanáza, Sigma-Aldrich, SRN

Acetonitril pro HPLC Super Gradient), Fluka, SRN

Folin-Ciocalteuovo činidlo, Penta, ČR

Síran amonný p.a., Lach-Ner, ČR

Síran hořečnatý heptahydrát p.a. - Lachema

Fenol p.a., Lach-Ner, ČR

Kyselina sírová, 96%, Lach-Ner, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., LachNer, ČR

Molybdenan amonný p.a., Mach Chemikálie, ČR

Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát, 98%, Sigma-Aldrich, SRN

Ostatní chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných dodavatelů.

##### 3.1.3 Materiál

Jablečné slupky, jablečná vláknina, pohankové slupky, ovesné otruby, vaječné a bezvaječné těstoviny byly získány v běžné obchodní síti. Syrovátka – (mlékárna Pribina a.s., Přebyslav), složení: voda (93 %), sušina (68 g.L<sup>-1</sup>), laktóza (39,60 g.L<sup>-1</sup>), glukóza (0,35 g.L<sup>-1</sup>), PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (63 mg.L<sup>-1</sup>); technický glycerol (Vitrum), odpadní řepkový olej z VŠ menzy.

##### 3.1.4 Přístroje

Očkovací box Aura mini – Bioair Instruments (UK)

Třepačka LT 2 – Sklárny Kavalier (ČR)

Centrifuga – U 32, Boeco (Německo)

Centrifuga – C 28, Boeco (Německo)

Centrifuga – Mikro 200, Vitrum (Německo)

Analytické váhy – Boeco (Německo)

Spektrofotometr UV-VIS, Helios α – Unicam (UK)

pH-metr – I221 Calibration Check, Microprocessor pH meter – Hanna instruments (USA)

Filtry – MS® Nylon Syringe Filter, velikost pórů 0,45 μm

Vodní lázeň – HB4 basic, IKA LABORTECHNIK

Vortex – Heidolph, Vitrum (Německo)

Ultrazvuk – PS02000 ultrasonic compact cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)

Sušárna – LS-35 (ČR)

Fermentor – Biostat B-plus, objem 5 L, Sartorius Biotech (Německo)

Cytometr – APOGEE FLOW SYSTEMS

Sestava HPLC-RI, UV-VIS (Ecom spol. s.r.o.)

Pumpa	Pumpa, programátor gradientu Beta 10
Degaser	DG 3014
Termostat	Termostat kolon LCO 102
Držák předkolony	KJO-4282, ECOM
Detektor	Refraktometrický detektor - RIDK 102 Spektrofotometrický detektor LCD 2084

Vyhodnocovací program Clarity

Sestava HPLC/PDA/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)

Termostat	LCO 101
Detektor	PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
Pumpa	MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR

Vyhodnocovací systém Xcalibur

Kolony	Rezex Roa organic acid H <sup>+</sup> , 300 mm x 7,8 mm, zrnitost 8 µm, Phenomenex company, (USA); SUPELCOSIL LC-NH <sub>2</sub> , 250 mm x 4,6 mm, zrnitost 5 µm, Supelco Analytical (Sigma Aldrich, SRN); Restek C18 Ultra Aqueous, 250 mm x 4.6 mm; zrnitost 5 µm; Restek corporation (USA); Zorbax Eclipse XDB C18, 250 mm x 4,6 mm; zrnitost 5 µm, Agilent technologies (USA).
--------	--

## 3.2 Kultivace *Aureobasidium pullulans*

### 3.2.1 Tuhé médium

Pro úchovu byla použita dvě tuhá média, a to minerální médium a obohacené médium. Složení obou médií je uvedeno v tabulce 2. Po sterilizaci v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut bylo médium rozlito do sterilních Petriho misek a zaočkováno roztěrem kličkou. Kultura byla uchovávána při teplotě 4 °C a pravidelně přeočkovávána.

**Tabulka 2** Složení minerálního a obohaceného média

minerální médium	
látka	koncentrace [g.L <sup>-1</sup> ]
glukóza	80,0
NaNO <sub>3</sub>	2,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
KCl	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
agar	10,0

obohacené médium	
látka	koncentrace [g.L <sup>-1</sup> ]
glukóza	20,0
pepton	20,0
yeast ex.	10,0
agar	20,0

### 3.2.2 Tekuté médium

Na základě studia literatury a experimentálního ověření bylo pro kultivaci *A. pullulans* zvoleno produkční médium o složení uvedeném v tabulce 3. Sterilizace média probíhala v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 minut. Produkční médium bylo zaočkováno inokulem o objemu 10 %. Inokulum bylo připraveno do 500 mL Erlenmayerových baněk, které obsahovaly 200 mL minerálního média o stejném složení jako v tabulce 2 s výjimkou nahrazení dusičnanu sodného dusičnanem amonným. Po sterilizaci bylo médium zaočkováno třemi kličkami kultury *A. pullulans* z Petriho misky. Poté byla baňka umístěna na temperovanou třepačku (30 °C) a rychlosti 160 rpm. Po 3 dnech byla takto připraveným inokulem zaočkována produkční média.

**Tabulka 3** Složení produkčního média a inokula

látka	koncentrace [g.L <sup>-1</sup> ]
glukóza	80,0
NaNO <sub>3</sub>	2,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
KCl	0,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2

### 3.2.3 Stanovení růstové křivky

Během kultivace ve fermentoru o objemu 1,5 L v produkčním médiu (kap. 3.2.2.) bylo v pravidelných intervalech odebráno 10 mL vzorku, který byl použit ke stanovení obsahu biomasy a množství produkovaných ECP dle postupu uvedeného v kap. 3.3.1, resp. 3.4. Růstová křivka byla zaznamenána dvakrát a výsledky jsou průměrnými hodnotami ze dvou kultivací.

### 3.2.4 Vliv koncentrace zdroje uhlíku

Pro tento účel byla použita glukóza o koncentraci 40, 60 a 80 g.L<sup>-1</sup>. Kultivace probíhala na temperované třepačce při teplotě 30 °C a rychlosti 160 rpm v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 mL obsahujících 50 mL produkčního média. Kultivace byla ukončena po 96 hodinách. Výsledky jsou uvedeny jako průměr dvou kultivací.

### 3.2.5 Vliv použitého zdroje uhlíku

Dalším provedeným experimentem bylo zjištění vlivu použitého zdroje uhlíku na produkci biomasy a ECP. Pro tento účel bylo použito 5 sacharidů – glukóza, maltóza, sacharóza, fruktóza a laktóza o koncentraci 80 g.L<sup>-1</sup> a dále technický glycerol (60 g.L<sup>-1</sup>), technický glycerol s glukózou v poměru 1:1, syrovátka a odpadní olej (2,4 g na 100 ml). Kultivace probíhala na temperované třepačce při teplotě 30 °C a 160 rpm v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 mL obsahujících 50 mL produkčního média. Kultivace byla ukončena po 96 hodinách. Kultivace byla provedena 2krát. Výsledky jsou uvedeny jako průměr dvou kultivací.

### 3.2.6 Vliv počátečního pH

Dalším sledovaným faktorem byl vliv počátečního pH na růst biomasy a produkci extracelulárních polymerů. Hodnoty počátečního pH byly v rozmezí 4 – 7,5; resp. 4, 6 a 7,5. Kultivace probíhala na temperované třepačce při teplotě 30 °C a rychlosti 160 rpm v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 mL obsahujících 50 mL produkčního média; jako zdroj uhlíku byla použita glukóza, sacharóza a fruktóza o koncentraci 80 g·L<sup>-1</sup>, zaočkováno 10 % inokula. Kultivace byla ukončena po 96 hodinách. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ze dvou kultivací.

### 3.3 Analýza biomasy a produkovaných metabolitů

K charakterizaci výsledků kultivace byla použita řada analytických metod. Jednotlivé postupy práce jsou uvedeny v následujících podkapitolách.

#### 3.3.1 Gravimetrické stanovení obsahu sušiny

Ke stanovení byl použit objem 10 mL fermentačního média, který byl centrifugován při teplotě 4 °C po dobu 20 minut při 12 000 rpm. Získaný supernatant byl použit pro následné stanovení redukcí sacharidů, celkových sacharidů atd., jak je popsáno v následujících podkapitolách. Sediment byl dvakrát promyt destilovanou vodou a následně sušen při teplotě 80 °C do konstantní hmotnosti. Získaná sušina poté byla zvážena na analytických vahách a obsah přepočten na g·L<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2 Stanovení obsahu celkových sacharidů dle Duboise

Metoda je založena na dehydrataci sacharidů koncentrovanou kyselinou sírovou a následné kondenzaci furfuralu či 5-hydroxymethylfurfuralu s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů, které lze spektrometricky změřit při vlnové délce 490 nm [41].

Pro stanovení celkových sacharidů byl použit supernatant získaný po centrifugaci biomasy (kap. 3.3.1). K 1 mL supernatantu naředěného podle potřeby byl napipetován 1 mL 5% roztoku fenolu a 5 mL koncentrované kyseliny sírové. Zkumavky byly důkladně promíchány a ponechány 30 minut stát při laboratorní teplotě. Po této době byla změřena absorbance při vlnové délce 490 nm proti slepému vzorku, který byl připraven totožným způsobem jako vzorky, s výjimkou nahrazení 1 mL vzorku 1 mL destilované vody. Výsledná koncentrace celkových sacharidů ve vzorcích byla vypočtena dosazením do rovnice kalibrační křivky.

Rovnice kalibrační křivky byla sestrojena proměřením roztoků standardu glukózy o koncentraci 10 – 100 μg·mL<sup>-1</sup>. Každý vzorek byl proměřen třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka pomocí software Microsoft Office Excel.

#### 3.3.3 Stanovení redukcí sacharidů podle Somogyi-Nelsona

Redukující sacharidy v alkalickém prostředí a za zvýšené teploty (100 °C) redukcí měďnatou sůl obsaženou v Somogyiho činidle. Vznikající měďná sůl vytváří s Nelsonovým činidlem modrozelený komplex, jehož koncentrace se určí měřením absorbance při 720 nm proti slepému vzorku [41].

K 1 mL vzorku zředěného dle potřeby bylo přidáno 0,5 mL roztoku Somogyi-Nelsona I (24 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 16 g NaHCO<sub>3</sub>, 144 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12 g vinanu sodno-draselného, doplněno 800 mL destilované vody) a 0,5 mL roztoku Somogyi-Nelsona II (4 g CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O,

24 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, doplněno 200 mL destilované vody). Poté byly všechny zkumavky promíchány a po dobu 10 minut ponechány ve vroucí vodní lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 0,5 mL činidla Somogyi-Nelson III (25 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> rozpuštěného ve 450 mL destilované vody, 21 mL konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 g Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O) a obsah zkumavek byl důkladně promíchán na vortexu, aby došlo k rozpuštění vzniklé sraženiny. Po rozpuštění sraženiny byl výsledný objem ve zkumavkách upraven na 10 mL a po opětovném promíchání byla proměřena absorbance při vlnové délce 720 nm proti slepému vzorku (1 mL vzorku nahrazen 1 mL destilované vody).

Rovnice kalibrační křivky byla sestrojena proměřením roztoků standardu glukózy o koncentraci 1 – 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Každý vzorek byl proměřen třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka pomocí software Microsoft Office Excel.

### **3.3.4 Stanovení obsahu bílkovin dle Hartree-Lowryho**

K 1 mL supernatantu zředěného dle potřeby bylo přidáno 0,9 mL roztoku A (2 g vinan sodno-draselný tetrahydrát, 100 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 500 mL 1 M NaOH, doplněno vodou do objemu 1 litru), zkumavky byly inkubovány při teplotě 50 °C po dobu deseti minut. Následně byly zkumavky ochlazeny na laboratorní teplotu a bylo přidáno 0,1 mL roztoku B (2 g vinan sodno-draselný tetrahydrát, 1 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 90 mL H<sub>2</sub>O, 10 mL 1 M NaOH), po promíchání byly zkumavky ponechány 10 minut stát při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly k obsahu zkumavek připipetovány 3 mL roztoku C (roztok byl denně připravován zředěním 1 mL Folin-Ciocalteau činidla 15 mL destilované vody). Poté byly všechny zkumavky promíchány a po dobu 10 minut ponechány inkubovat při teplotě 50 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu a promíchání byla proměřena absorbance při vlnové délce 650 nm proti slepému vzorku (1 mL vzorku nahrazen 1 mL destilované vody) [41].

Rovnice kalibrační křivky byla sestrojena proměřením roztoků standardu hovězího albuminu o koncentraci 30 – 150 µg.mL<sup>-1</sup>. Každý vzorek byl proměřen třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka pomocí software Microsoft Office Excel.

## **3.4 Optimalizace stanovení obsahu extracelulárních polymerů**

### **3.4.1 Precipitace extracelulárních polymerů a gravimetrické stanovení obsahu**

K 5 mL supernatantu získaného dle postupu 3.3.1. bylo do zkumavky připipetováno 10 mL studeného ethanolu. Obsah byl promíchán a ponechán v klidu v lednici. Po uplynutí 1 hodiny byla vzniklá sraženina centrifugována při 14000 rpm, získaný sediment byl vysušen při teplotě 80 °C do konstantní hmotnosti. Získaná sušina byla poté zvážena na analytických vahách a obsah přepočten na g.L<sup>-1</sup>.

### **3.4.2 Úprava vzorku**

Produktem kultivací *A. pullulans* jsou mimo jiné dva extracelulární polymery, a to pullulan a poly-L-jablečná kyselina. Analýza těchto produktů pomocí HPLC probíhala po hydrolýze glykosidických vazeb mezi jednotlivými molekulami monomerů. K tomuto štěpení byly použity dva způsoby:

Enzymová hydrolýza – byl připraven 0,05 M octanový pufr o pH 5,0 smícháním 14,8 mL 0,2 M kyseliny octové a 35,2 mL 0,2 M octanu sodného a doplněním do 200 mL. Vzorek standardu pullulanu byl rozsuspendován v tomto pufru tak, aby jeho výsledná koncentrace

byla 10 g·L<sup>-1</sup>. Poté byl připraven enzym z komerčního preparátu pullulanázy o aktivitě 400 U·mL<sup>-1</sup>. K 1 mL připraveného standardu pullulanu bylo přidáno 5 µL enzymu 10krát zředěného roztoku pullulanázy. Enzymové štěpení probíhalo 24 hodin při laboratorní teplotě [42].

Kyselá hydrolyza – byla provedena pomocí 4M HCl a 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. K 1 mL vzorku supernatantu (kap. 3.3.1) byl přidán 1 mL kyseliny chlorovodíkové (sírové). Hydrolyza probíhala při teplotě 90 °C po dobu 9 hodin. Optimalizace hydrolyzy byla provedena v předchozí práci [43,44]. Vzorky supernatantů získaných po centrifugaci biomasy (kap. 3.3.1) pro jednotlivé kultivace byly proměřeny před a po použití kyselé hydrolyzy metodou HPLC RI.

### 3.4.3 Optimalizace stanovení ECP metodou HPLC

Součástí práce byla také optimalizace stanovení extracelulárních polymerů metodou HPLC v supernatantu (kultury *A.pullulans*) získaném dle postupu v kap. 3.3.1 a po aplikaci kyselé hydrolyzy viz kap. 3.4.2.

Pro tento účel byly testovány 4 chromatografické kolony:

1. kolona Restek C18 Ultra Aqueous, 250 mm x 4.6 mm se zrnitostí 5 µm; Restek;
2. kolona Zorbax Eclipse XDB C18, 250 mm x 4,6 mm se zrnitostí 5 µm, Agilent;
3. kolona SUPERCOSIL LC-NH<sub>2</sub>, 250 mm x 4,6 mm se zrnitostí 5 µm, Supelco analytical;
4. kolona Rezex Roa organic acid H<sup>+</sup>, 300 mm x 7,8 mm se zrnitostí 8 µm, Phenomenex.

Použité detektory:

UV-VIS; refraktometrický detektor; PDA (fotodiodové pole).

Obsah pullulanu byl vyjádřen rozdílem obsahu glukózy před a po aplikaci kyselé hydrolyzy (kap. 3.4.2). Obsah kyseliny poly-L-jablečné byl vyjádřen jako rozdíl obsahu L-jablečné kyseliny před a po aplikaci kyselé hydrolyzy. Množství bylo vyjádřeno v g·L<sup>-1</sup>.

## 3.5 Kultivace na odpadních substrátech

### 3.5.1 Odpadní substráty bez úpravy

Součástí experimentální práce bylo také použití odpadních substrátů, a to jablečné vlákniny, syrovátky, vaječných a bezvaječných těstovin, pohankových slupek a ovesných otrub, jakožto levných zdrojů uhlíku. Kultivace probíhala na temperované třepačce při teplotě 30 °C a otáčkách 160 rpm v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 mL obsahujících 50 mL produkčního média, kdy navážka jednotlivých substrátů činila 5 hm.%. Kultivace byla ukončena po 96 hodinách. Kultivace byla provedena 2krát. Výsledky jsou uvedeny jako průměr těchto dvou kultivací.



### 3.5.2 Odpadní substráty po aplikaci kyselé hydrolýzy

Hydrolýza byla provedena dle následujícího postupu: navážka 5 hm.% daného substrátu byla převedena do 50 mL destilované vody a bylo přidáno 1 obj.% koncentrované kyseliny sírové. Hydrolýza probíhala při 100 °C po dobu 1 hodiny, poté byl obsah baňky zfiltrován, pH upraveno na 7,5 a získaný supernatant byl po přidání minerálních látek vysterilován a zaočkován 10 % inokula. Kultivace probíhala na temperované třepačce při teplotě 30 °C a otáčkách 160 rpm v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 mL obsahujících 50 mL produkčního média. Kultivace byla ukončena po 96 hodinách. Obdobně jako v předchozích experimentech byla kultivace provedena 2krát a vypočtena průměrná hodnota z těchto dvou kultivací.

### 3.5.3 Batch kultivace ve fermentoru

V rámci experimentální práce této diplomové práce byla provedena také batch kultivace ve fermentoru o objemu 1,5 L. Produkční médium o stejném složení jako v kapitole 3.2.2 obsahujícím jako zdroj uhlíku glukózu a technický glycerol v poměru 1:1 o celkové koncentraci 30 g.L<sup>-1</sup>. Toto produkční médium bylo zaočkováno 24-hodinovým inokulem v poměru 1:10 (objem inokula : objem média). pH bylo udržováno na hodnotě 6, teplota kultivace 30 °C. Rychlost míchání byla 300 rpm, vzdušnění 1–1,5 vvm. Kultivace byla ukončena po 96 hodinách. Za stejných podmínek probíhala kultivace na syrovátkovém médiu, které obsahovalo jako produkční médium pouze čistou syrovátku bez přidávaných látek o složení uvedeném v kap. 3.1.3. Obě kultivace byly provedeny dvakrát a výsledné hodnoty jsou uvedeny jako průměr z těchto dvou kultivací.

## 3.6 Průtoková cytometrie

Pomocí průtokové cytometrie byla zjišťována viabilita buněk po působení teploty jako stresového faktoru. Byly připraveny 4 suspenze buněk *A. pullulans* v prostředí fyziologického roztoku s koncentrací pullulanu 0; 1; 5 a 10 g.L<sup>-1</sup>. Vzorek byl vystaven působení teploty -10 °C, dále působení teploty 50, 60 a 70 °C po dobu 10 minut. Pro analýzu na průtokové cytometrii byly buňky 10x ředěny PBS puřem a 1 mL buněčné suspenze byl barven 3 µL roztoku propidiumjodidu (5 mg·mL<sup>-1</sup>). Vzorek byl následně 5 minut inkubován v temnu a analyzován na průtokovém cytometru. Nástřik vzorku byl 14 µl·min<sup>-1</sup>, dávkováno bylo 300 µl vzorku. Scattergram SALS/LALS byl využit k výběru buněčné populace, která byla následně analyzována s využitím červeného fluorescenčního kanálu (600 – 635 nm), přičemž počet mrtvých/živých buněk byl odečten z histogramu sestrojeného pro červený kanál.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V úvodu experimentální části byly provedeny optimalizace metod stanovení produkce biomasy a metabolitů tak, aby bylo možné monitorovat růstové a produkční vlastnosti kultury *A.pullulans*.

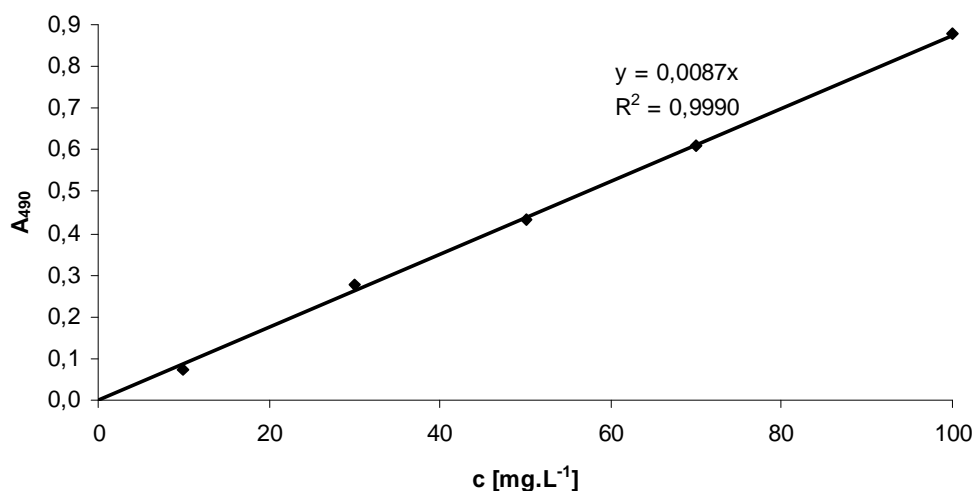
### 4.1 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise

Celkové sacharidy dle Duboise byly stanoveny spektrofotometricky podle postupu v kap. 3.3.2. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4 a jsou vyneseny do grafu 1. Obsah celkových sacharidů byl vypočten dosazením do rovnice kalibrační křivky:  $y = 0,0087 \cdot x$ ,  $R^2 = 0,9990$ .

**Tabulka 4** Tabulka hodnot pro stanovení kalibrační křivky

c [mg.L <sup>-1</sup> ]	A <sub>490</sub>	s <sub>D</sub>
10	0,074	0,009
30	0,275	0,022
50	0,431	0,026
70	0,610	0,027
100	0,876	0,011

**Graf 1** Kalibrační křivka pro stanovení obsahu celkových sacharidů



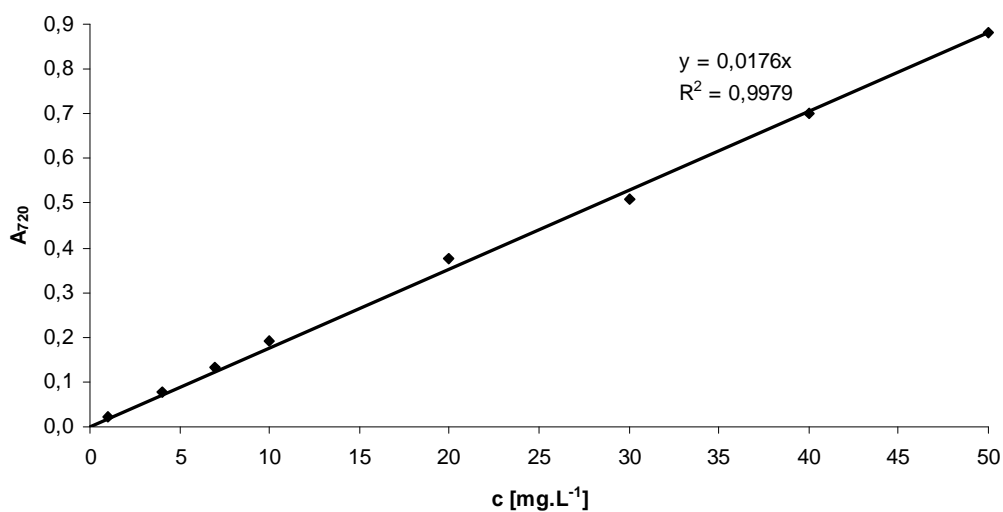
### 4.2 Stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona

Stanovení redukujících sacharidů bylo provedeno dle postupu v kap. 3.3.3. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5 a jsou vyneseny do grafu 2. Obsah redukujících sacharidů byl vypočten dosazením do rovnice kalibrační křivky:  $y = 0,0176 \cdot x$ ,  $R^2 = 0,9979$ . Tato metoda byla zvolena jako orientační vzhledem k faktu, že při této metodě dojde k reakci všech přítomných redukujících sacharidů, tedy nejen glukózy, která slouží ke kvantifikaci pullulanu.

**Tabulka 5** Tabulka hodnot pro stanovení kalibrační křivky

c [mg.L <sup>-1</sup> ]	A <sub>720</sub>	s <sub>D</sub>
1	0,023	0,005
4	0,078	0,008
7	0,132	0,005
10	0,192	0,007
20	0,378	0,006
30	0,509	0,035
40	0,700	0,009
50	0,881	0,014

**Graf 2** Kalibrační křivka pro stanovení obsahu redukujících sacharidů



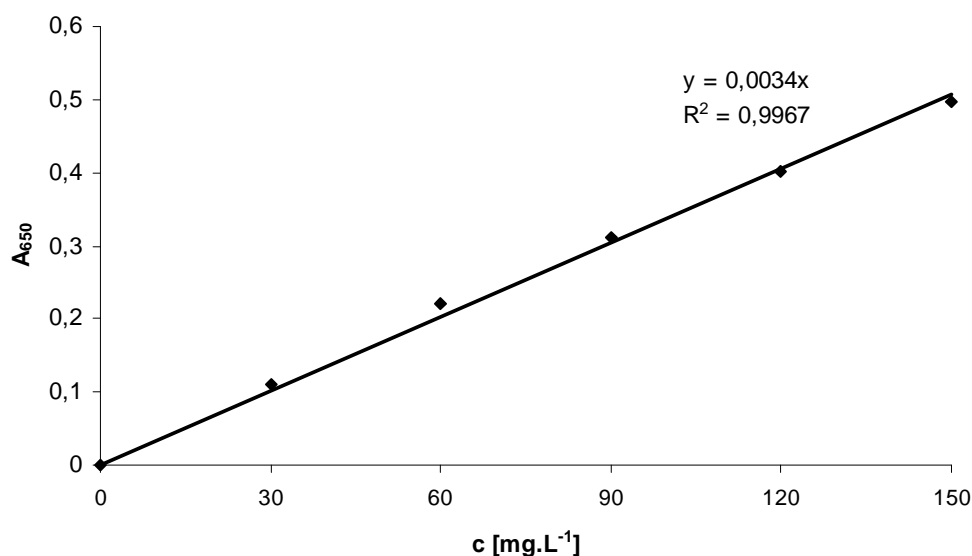
### 4.3 Stanovení obsahu bílkovin dle Hartree-Lowryho

Stanovení obsahu proteinů ve vzorku byl proveden dle postupu v kap. 3.3.4. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 6 a graficky znázorněna v grafu 3. Obsah proteinů byl vypočten dosazením do rovnice kalibrační křivky  $y = 0,0034 \cdot x$ ,  $R^2 = 0,9967$ .

**Tabulka 6** Tabulka hodnot pro stanovení kalibrační křivky

c [mg.L <sup>-1</sup> ]	A <sub>650</sub>	s <sub>D</sub>
30	0,111	0,002
60	0,220	0,005
90	0,312	0,009
120	0,403	0,006
150	0,498	0,013

**Graf 3** Kalibrační křivka pro stanovení obsahu bílkovin



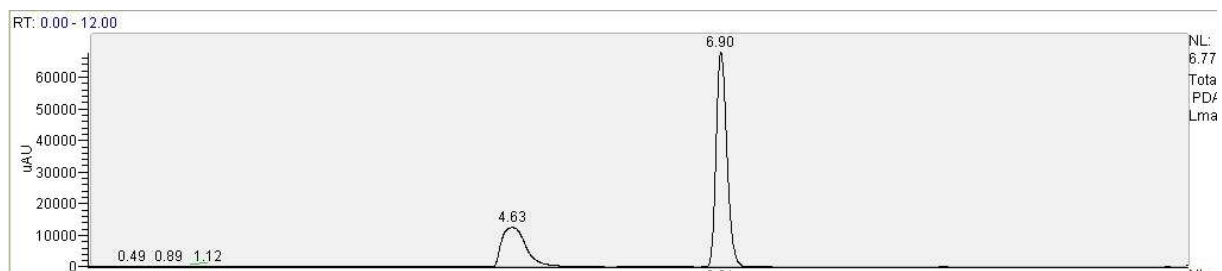
#### 4.4 Optimalizace stanovení extracelulárních polymerů

##### 4.4.1 Úprava vzorku

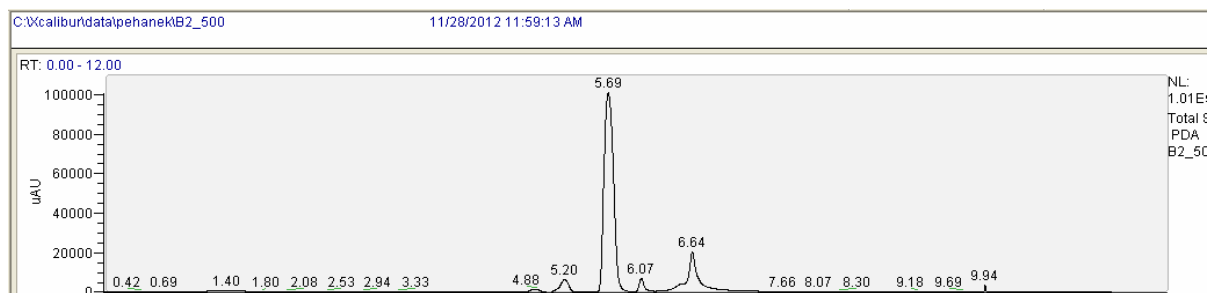
Za účelem stanovení ECP bylo nutné nejdříve provést hydrolyzu polymerů a poté optimalizovat metodu stanovení monomerů přítomných ve vzorku. V rámci testovacích experimentů byla ověřena možnost použití enzymové a kyselí hydrolyzy extracelulárních polysacharidů. Vzhledem k substrátové specifitě pullulanázy (štěpí glykosidové vazby mezi jednotkami glukózy) došlo pouze k hydrolyze pullulanu, proto byla pro vyhodnocení obsahu všech extracelulárních polymerů zvolena kyselá hydrolyza. K provedení kyselí hydrolyzy byla vzhledem k těkavosti kyseliny chlorovodíkové použita 2 M kyselina sírová. Hydrolyza probíhala při teplotě 90 °C po dobu 9 hodin.

##### 4.4.2 Optimalizace stanovení ECP metodou HPLC

V první fázi HPLC stanovení monomerů ECP (glukóza, kyselina L-jablečná) bylo třeba optimalizovat chromatografické podmínky. Zásadní pro simultánní stanovení složek exopolymerů je výběr stacionární fáze. Byly nastříknuty standardy glukózy, kyseliny L-jablečné a reálného vzorku supernatantu po kyselí hydrolyze (kap. 3.4.2) po kultivaci na ovesných otrubách (dále jako reálný vzorek). Jako první byla pro stanovení kyseliny L-jablečné použita kolona Restek C18. Mobilní fází byl fosfátový pufr o pH 3 a koncentraci 20  $\text{mM}\cdot\text{L}^{-1}$ . Analýza probíhala při teplotě 35 °C a vlnové délce 210 nm. Průtok byl nastaven na 0,5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  [45]. Nastříknutý standard kyseliny L-jablečné měl retenční čas 6,90 min (Obr. 11).

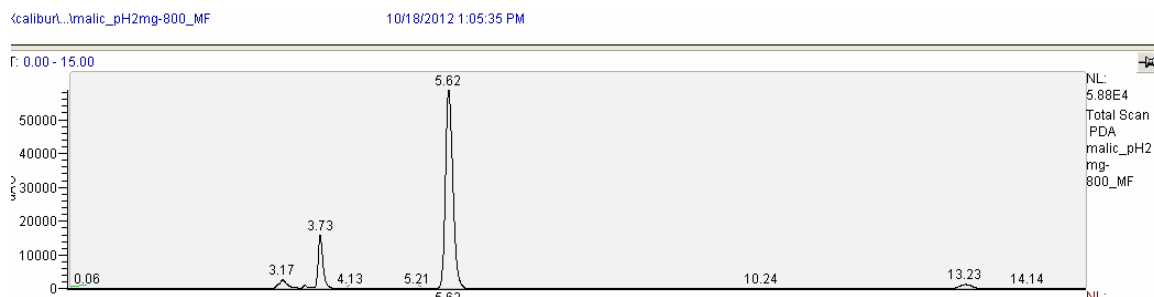


**Obr. 11** Standard *L*-jablečné kyseliny (vpravo), rozpouštědlo (vlevo), Restek C18, PDA detektor  $\lambda = 210 \text{ nm}$ ,  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 35 \text{ }^\circ\text{C}$

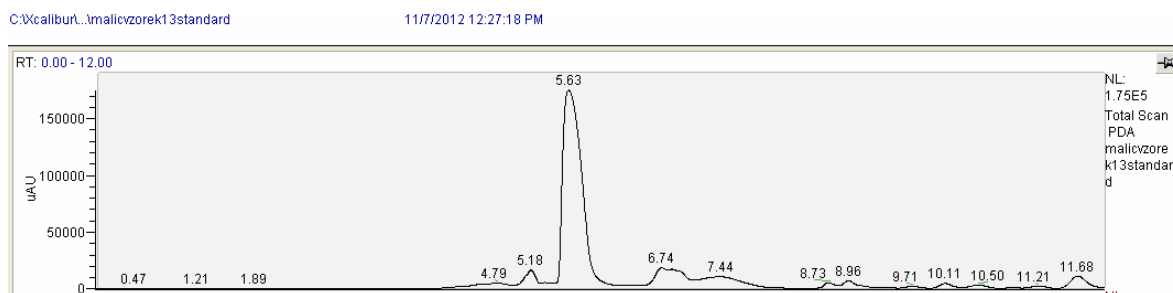


**Obr. 12** Reálný vzorek, Restek C18, PDA detektor  $\lambda = 210 \text{ nm}$ ,  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 35 \text{ }^\circ\text{C}$

Po analýze reálného vzorku (supernatant po kultivaci na ovesných otrubách) nedošlo ke kvalitnímu oddělení kyseliny jablečné. V dalším kroku byl upraven průtok mobilní fáze na hodnotu  $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  a dále pak na  $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Ani po této úpravě nedošlo k oddělení kyseliny jablečné z reálného hydrolyzovaného vzorku. Při průtoku  $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  měla kyselina jablečná retenční čas 5,62 min (Obr. 13).



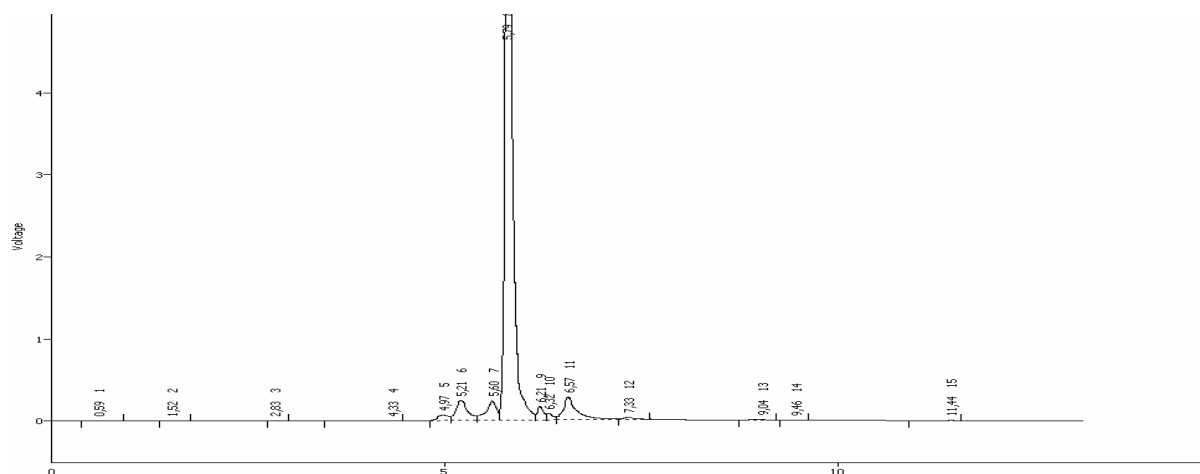
**Obr. 13** Standard kyseliny-*L*-jablečné (vpravo), Restek C18, PDA detektor  $\lambda = 210 \text{ nm}$ ,  $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 35 \text{ }^\circ$



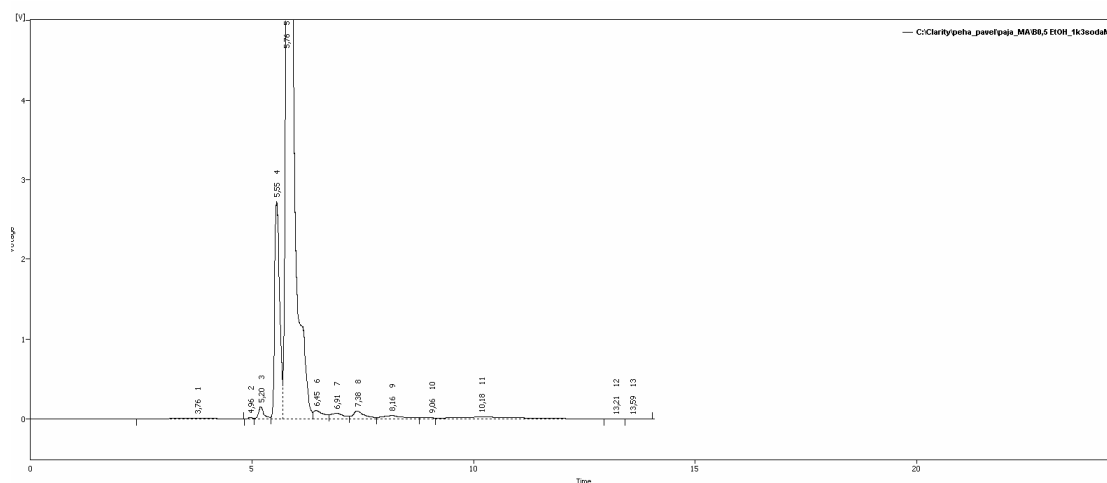
**Obr. 14** Reálný vzorek, Restek C18, PDA detektor  $\lambda = 210 \text{ nm}$ ,  $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $t = 35 \text{ }^\circ\text{C}$

Kolona Restek nebyla vhodnou kolonou pro stanovení kyseliny jablečné z důvodu nedokonalého rozdělení jednotlivých sledovaných složek (Obr. 14).

Další kolonou testovanou pro stanovení koncentrace kyseliny jablečné v médiu byla kolona Zorbax Eclipse XDB C18. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr o koncentraci  $20 \text{ mM}\cdot\text{L}^{-1}$  a pH 3. Detekce byla prováděna na UV-VIS detektoru při vlnové délce  $210 \text{ nm}$ , separace probíhala při teplotě  $35 \text{ }^\circ\text{C}$  a průtoku  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  [45].



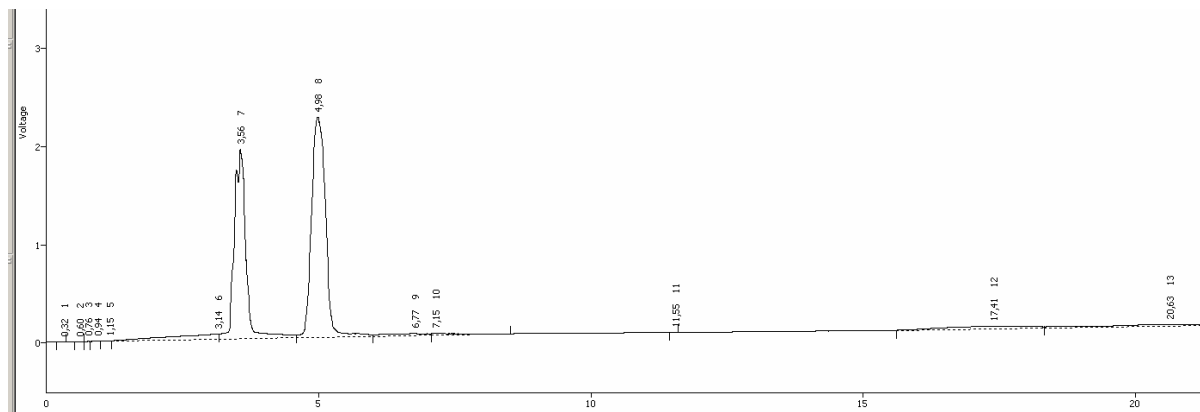
**Obr. 15** Reálný vzorek, Zorbax XDB C18, UV-VIS detektor  $\lambda = 210 \text{ nm}$ ,  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $t = 35 \text{ }^\circ\text{C}$



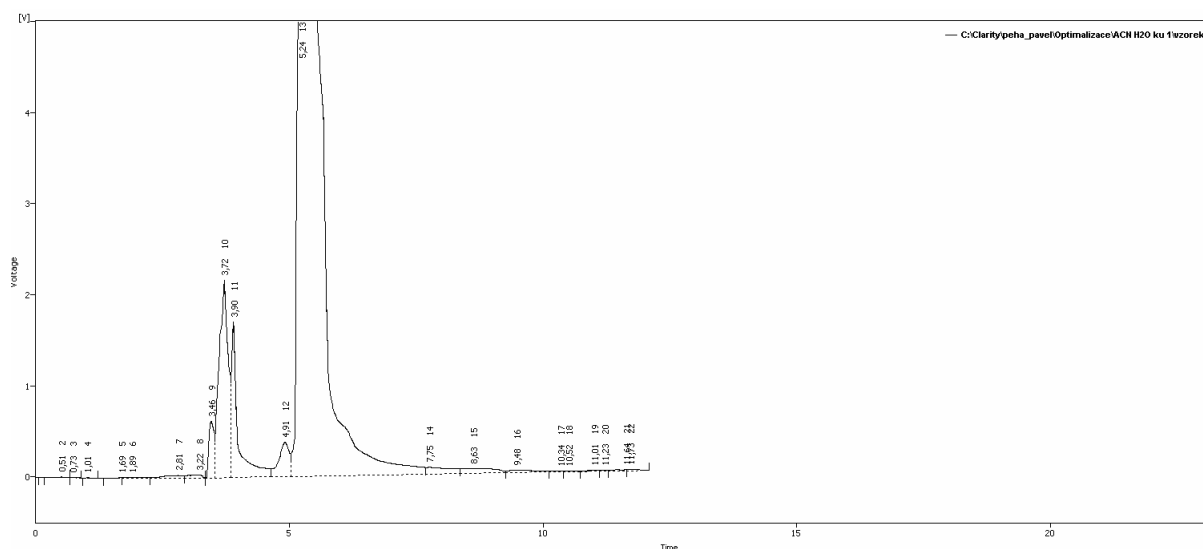
**Obr. 16** Reálný vzorek s přidavkem standardu kyseliny L-jablečné, Zorbax XDB C18, UV-VIS detektor  $\lambda = 210 \text{ nm}$ ,  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $t = 35 \text{ }^\circ\text{C}$

Rovněž kolona Zorbax XDB nebyla shledána vhodnou pro stanovení kyseliny jablečné. Po nástřiku reálného hydrolyzovaného vzorku nedošlo k rozdělení směsi píku (Obr. 15). Po přidání standardního přídatku došlo ke zvětšení plochy smíšeného píku (Obr. 16). V porovnání s kolonou Restek C18 (Obr. 14) je tato kolona méně citlivá a píky méně rozdělené.

Další testovanou kolonou byla kolona SUPELCOSIL  $\text{NH}_2$ , která je vhodná k analýze sacharidů, v našem případě glukózy (monomer pullulanu). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu a vody v poměru 75:25. Analýza probíhala při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  a průtoku  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (optimalizace viz [42]). Detekce byla provedena s využitím refraktometrického detektoru. Po nástřiku standardu glukózy byl retenční čas pro glukózu 4,98 minut - viz Obr. 17.



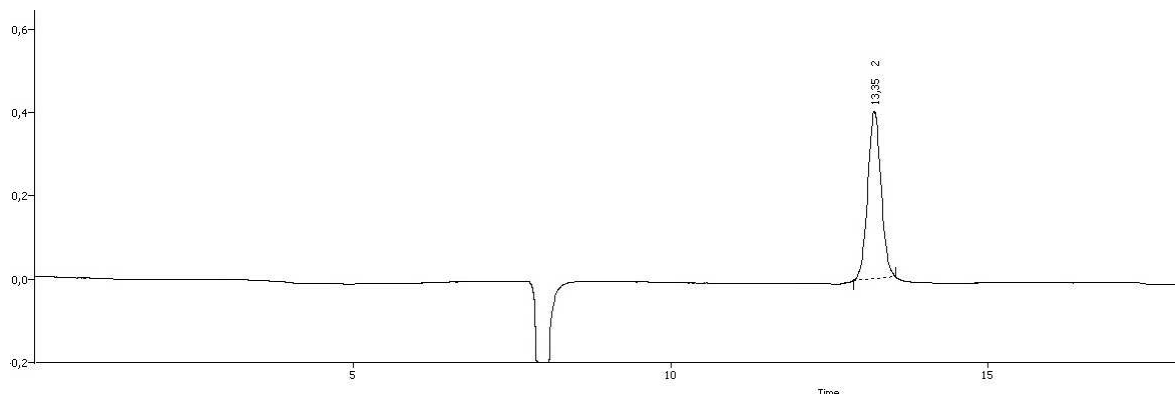
**Obr. 17** Standard glukózy, SUPELCOSIL NH<sub>2</sub>, RI detektor,  $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $R_t=4,98\text{ min}$ ; pík vlevo – rozpouštědlo, vpravo - glukóza



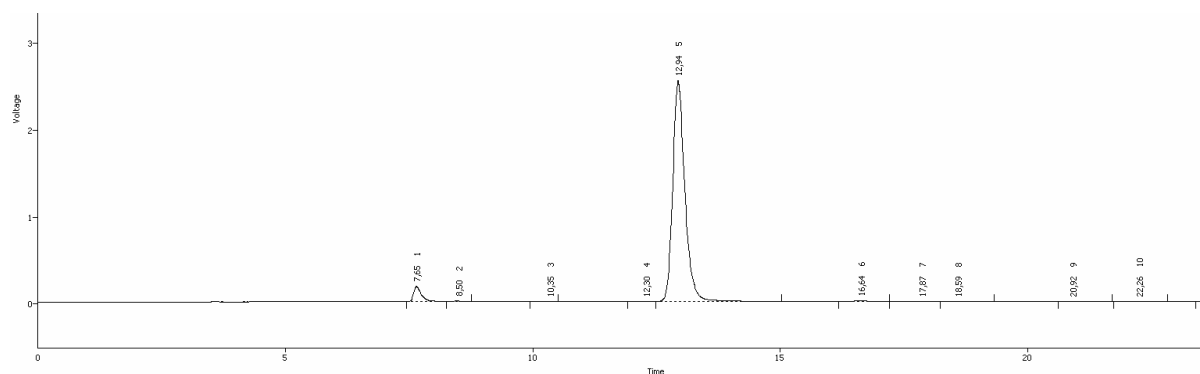
**Obr. 18** Reálný vzorek, SUPELCOSIL NH<sub>2</sub>, RI detektor,  $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $1,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $R_t=4,98\text{ min}$ ; pík vlevo – rozpouštědlo, vpravo – směsný pík

Po nástřiku hydrolyzovaného reálného vzorku se vyskytovala v retenčním čase glukosy směs jiných látek viz Obr. 18. Pro lepší rozdělení těchto látek bylo změněno složení mobilní fáze. Došlo ke snížení poměru acetonitrilu ve směsi s vodou na poměr 65:35. Ani tato změna ovšem nevedla ke zlepšení rozdělení látek. Ani kolona Supelcosil NH<sub>2</sub> nebyla tedy vhodná pro stanovení obsahu extracelulárních polymerních produktů *A. pullulans*.

Poslední testovaná kolona Rezek Roa organic acid H<sup>+</sup> je určena pro analýzu organických kyselin a sacharidů. Jako mobilní fáze byla použita 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Teplota separace byla 60 °C a průtok mobilní fáze 0,5 mL·min<sup>-1</sup> (dle [46]). Standard kyseliny L-jablečné měl retenční čas 13,35 min u detekce refraktometrickým detektorem (Obr.19) a UV-VIS detekce (Obr. 20).

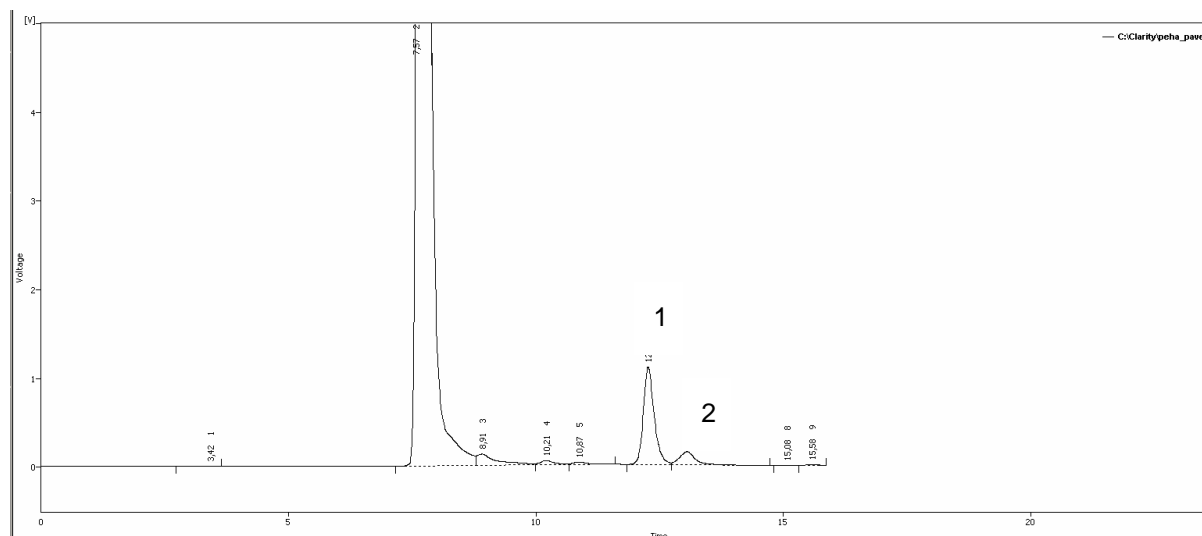


**Obr. 19** Standard kyseliny L-jablečné, Rezex Roa, RI detektor,  $t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $R_t=13,35\text{ min}$



**Obr. 20** Standard kyseliny L-jablečné, Rezex Roa, UV-VIS detektor,  $t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $R_t=12,94\text{ min}$

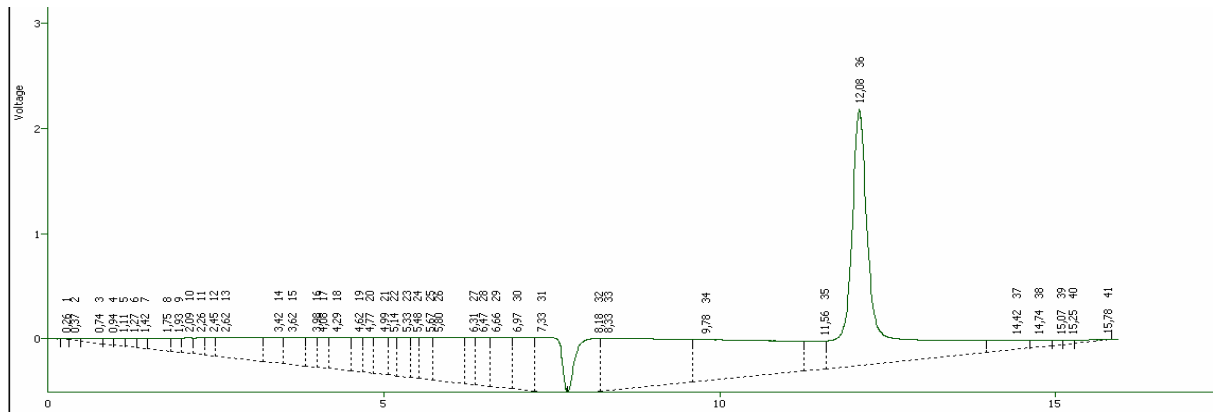
Po nástřiku reálného vzorku došlo k rozdělení jednotlivých složek – glukózy a L-jablečné kyseliny (Obr. 21). Retenční čas kyseliny jablečné se shodoval a přítomnost této kyseliny prokázal také přídavek vnitřního standardu.



**Obr. 21** Reálný vzorek, Rezex Roa, RI detektor,  $t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $R_t=13,06\text{ min}$ ; pík 1 –glukóza, pík 2 – kyselina L-jablečná

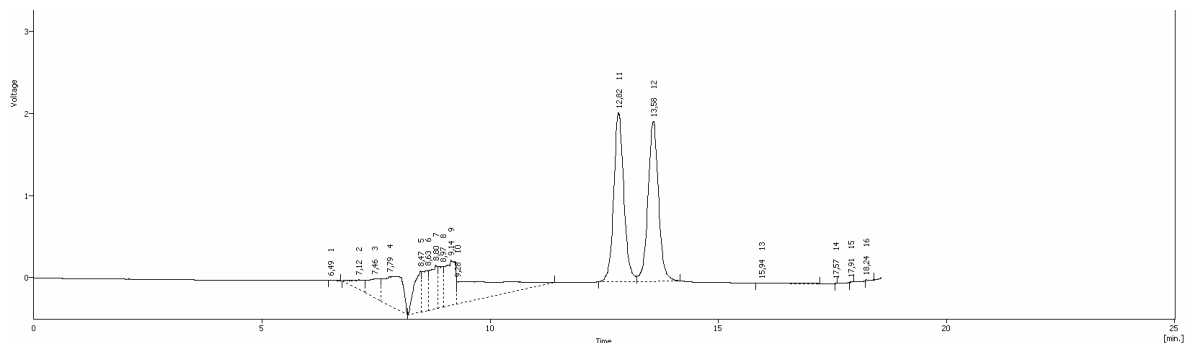
Za stejných podmínek jako při stanovení kyseliny jablečné byl analyzován také standard glukózy. Retenční čas tohoto sacharidu byl 12,08 minut (Obr. 22).





**Obr. 22** Standard glukózy, Rezex Roa, RI detektor,  $t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $R_t=12,08\text{ min}$

Dalším krokem byla analýza standardů kyseliny jablečné a glukózy vedle sebe. Píky měly odlišné retenční časy a nedošlo zde k jejich smísení viz Obr. 23.



**Obr. 23** Směs standardů glukózy (pík vlevo) a kyseliny L- jablečné (vpravo), Rezex Roa, RI detektor,  $t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

Také po nástřiku reálného vzorku došlo k úspěšnému oddělení obou látek. Kolona Rezex – ROA byla tedy vybrána jako vhodná kolona pro analýzu extracelulárních polysacharidových produktů kultury *A. pullulans*. Veškerá měření probíhala na této koloně za stejných podmínek (teplota  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , průtok mobilní fáze  $0,5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , RI detekce).

Za těchto podmínek byly také proměřeny standardy glukózy a L-jablečné kyseliny. Z naměřených data byly získány rovnice kalibrační křivky pro kvantifikaci glukózy:  $y = 1275,6 \cdot x$ ,  $R^2 = 0,9999$  a kyseliny L-jablečné:  $y = 1177,8 \cdot x$ ,  $R^2 = 0,9999$ .

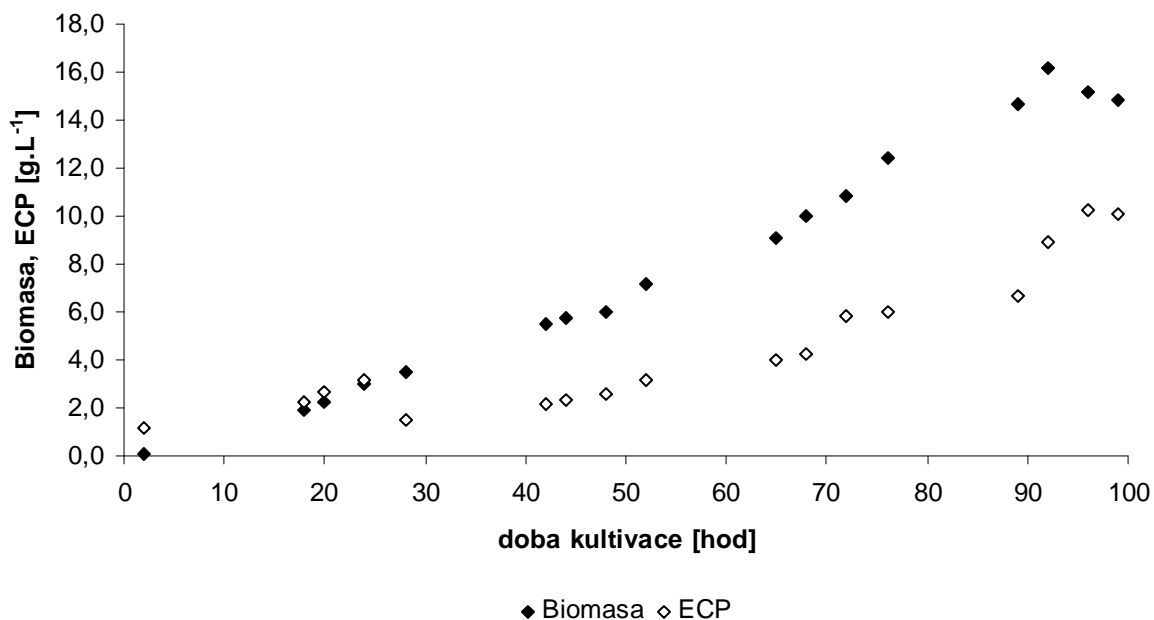
#### 4.5 Stanovení růstové křivky a produkce exopolymerů *A.pullulans*

Při měření růstové křivky mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* CCM 8182 byl sledován přírůstek biomasy stanovením sušiny a produkce ECP. Na základě naměřených a vypočtených dat, která jsou uvedena v tabulce 7, byla vynesena růstová křivka do grafu 4. Stacionární fáze nastala kolem 90. hodiny.

**Tabulka 7** Naměřená data pro vynesení růstové křivky *A. pullulans* CCM 8182, kultivace na minerálním médiu obsahujícím glukózu jako zdroj uhlíku

čas odběru	biomasa	ECP	čas odběru	biomasa	ECP
[hod]	[g.L <sup>-1</sup> ]		[hod]	[g.L <sup>-1</sup> ]	
2	0,11	<b>1,18</b>	65	9,09	<b>3,96</b>
18	1,90	<b>2,22</b>	68	10,03	<b>4,24</b>
20	2,23	<b>2,68</b>	72	10,87	<b>5,80</b>
24	3,00	<b>3,14</b>	76	12,40	<b>5,96</b>
28	3,48	<b>1,46</b>	89	14,63	<b>6,68</b>
42	5,53	<b>2,18</b>	92	16,18	<b>8,88</b>
44	5,72	<b>2,36</b>	96	15,17	<b>10,22</b>
48	5,98	<b>2,56</b>	99	14,87	<b>10,07</b>
52	7,13	<b>3,18</b>			

**Graf 4** Růstová křivka *A. pullulans* CCM 8182



K nejvyšší produkci biomasy a zároveň nejvyšší produkci ECP došlo v 96. hodině, po této době došlo k odumírání buněk i ke snížení obsahu ECP. K podobnému výsledku dospěli i jiní autoři, např. Thirumavalavan a kol. [47]. Vzhledem k tomuto faktu byly veškeré následné kultivace ukončeny po 96 hodinách.

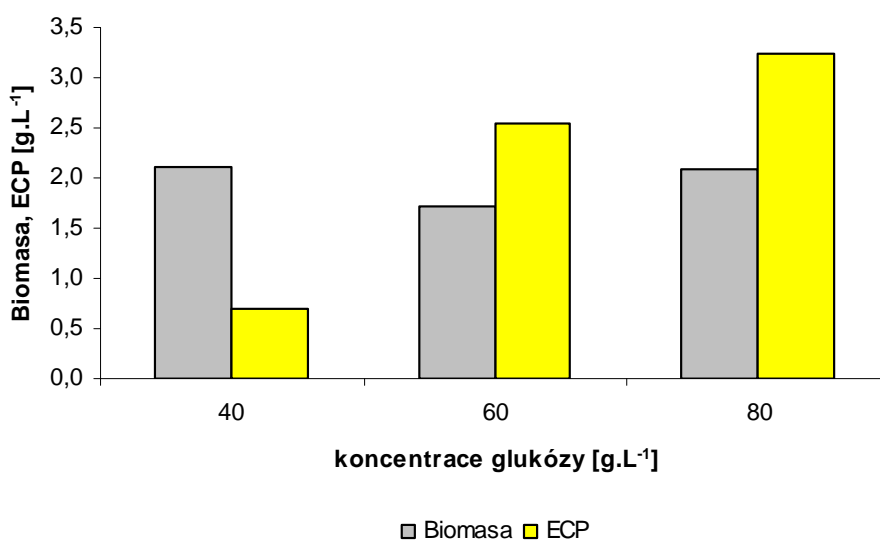
#### 4.6 Vliv koncentrace zdroje uhlíku

V této části práce byl zjišťován vliv koncentrace zdroje uhlíku na růst *A. pullulans* a produkci extracelulárních polymerů. Byla provedena kultivace (96 h) v médiu obsahujícím jako zdroj uhlíku glukózu o třech různých koncentracích, a to 40, 60 a 80 g.L<sup>-1</sup>. Získaná data jsou uvedena v tabulce 8 a vynesena do grafu 5.

**Tabulka 8** Naměřená data pro určení optimální koncentrace zdroje uhlíku

	c [g.L <sup>-1</sup> ]		
	40	60	80
Biomasa	2,10	1,71	2,08
ECP	0,70	2,54	3,24

**Graf 5** Grafické znázornění obsahu biomasy a extracelulárních polymerů v závislosti na různé koncentraci glukózy



Z naměřených hodnot je patrné, že nejvhodnější koncentrace pro produkci extracelulárních polymerů z testovaných hodnot byla koncentrace 80 g.L<sup>-1</sup>, kdy bylo získáno 3,24 g ECP a obsah biomasy činil 2,08 g.L<sup>-1</sup>. K vysokému nárůstu biomasy došlo také při koncentraci 40 g.L<sup>-1</sup>, a to 2,10 g.L<sup>-1</sup>, ovšem s nízkou produkcí ECP (0,70 g.L<sup>-1</sup>). Pro další práci proto byla zvolena koncentrace glukózy 80 g.L<sup>-1</sup>. Tato hodnota koresponduje s výsledky práce autorů Chi a Zaa [9], kteří prováděli kultivaci na médiu s obsahem glukózy od 40 do 100 g.L<sup>-1</sup>, s nejvyšší produkcí pullulanu při hodnotě 80 g.L<sup>-1</sup>. Existují i studie, kdy byla u kmenů získaných z listů rostlin zaznamenána významná produkce pullulanu (66,79 g.L<sup>-1</sup>) při koncentraci glukózy až 150 g.L<sup>-1</sup> [48]. Nejvhodnější koncentrace zdroje uhlíku se liší v závislosti na daném kmenu *A. pullulans*.

## 4.7 Vliv použitého zdroje uhlíku

Tento experiment byl proveden za účelem testování vhodného zdroje uhlíku pro růst a produkci ECP u kmene *A. pullulans* CCM 8182. Bylo testováno pět sacharidů; sacharóza, fruktóza, glukóza, laktóza, maltóza a 3 odpadní substráty: syrovátka (laktóza), odpadní olej, technický glycerol samotný a v kombinaci s glukózou v poměru 1:1. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 9 a vyneseny do grafu 6. Na obr. 24 je zobrazena kultura *A. pullulans* kultivovaná na různých médiích v Erlenmayerových baňkách.



**Obr. 24** Horní řada zleva: glukóza, sacharóza, laktóza, fruktóza, maltóza; dolní řada: syrovátka, glycerol, glycerol-glukóza, odpadní olej

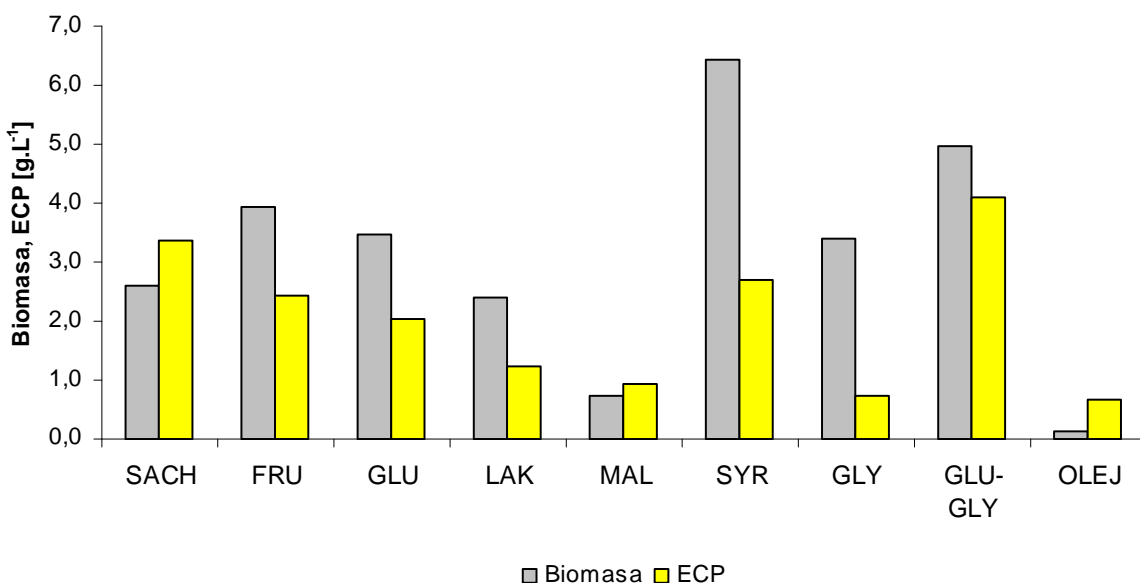
**Tabulka 9** Naměřená data pro určení nejvhodnějšího zdroje uhlíku pro růst *A. pullulans* CCM 8182 a produkci ECP, hodnoty jsou uvedeny v g·L<sup>-1</sup>

	SACH	FRU	GLU	LAK	MAL	SYR	GLY	GLU-GLY	OLEJ
<b>Biomasa</b>	2,59	3,94	3,46	2,41	0,73	6,42	3,41	4,97	0,13
<b>ECP</b>	3,36	2,44	2,02	1,22	0,92	2,7	0,75	4,1	0,67

K nárůstu biomasy *A. pullulans* došlo u všech testovaných zdrojů uhlíku, kdy se koncentrace biomasy pohybovala od 0,13 do 6,42 g·L<sup>-1</sup>, k nejvyššímu nárůstu došlo v médiu obsahujícím syrovátku (6,42 g·L<sup>-1</sup>) a technický glycerol s glukózou v poměru 1:1 (4,97 g·L<sup>-1</sup>), zatímco k nejmenšímu nárůstu došlo u média obsahujícího odpadní olej (0,13 g·L<sup>-1</sup>). Koncentrace biomasy však ve většině případů přímo nekoresponduje s množstvím produkovaných extracelulárních polymerů, což je patrné z naměřených dat (graf 6), kdy při kultivaci s nejvyšším obsahem biomasy na syrovátkovém médiu nebyla také nejvyšší produkce ECP.

Je pravděpodobné, že produkce extracelulárních polymerních látek je proces, který se řídí jinou dynamikou než růst kultury a ovlivňují jej jiné faktory. K nejvyšší produkci ECP došlo při kultivaci na technickém glycerolu v kombinaci s glukózou, a to v množství 4,1 g·L<sup>-1</sup>, následně na médiu obsahujícím sacharózu jako zdroj uhlíku v množství 3,36 g·L<sup>-1</sup>. K nejmenší produkci ECP došlo při kultivaci na odpadním oleji (0,67 g·L<sup>-1</sup>) a maltóze (0,92 g·L<sup>-1</sup>). Pro produkci ECP u kmene *A. pullulans* 8182 je tedy nejvhodnějším jednoduchým sacharidovým zdrojem uhlíku sacharóza, což je v souladu s poznatky z literatury, kdy sacharóza a glukóza patří mezi nejčastěji používané sacharidické zdroje k produkci ECP [9, 49,50].

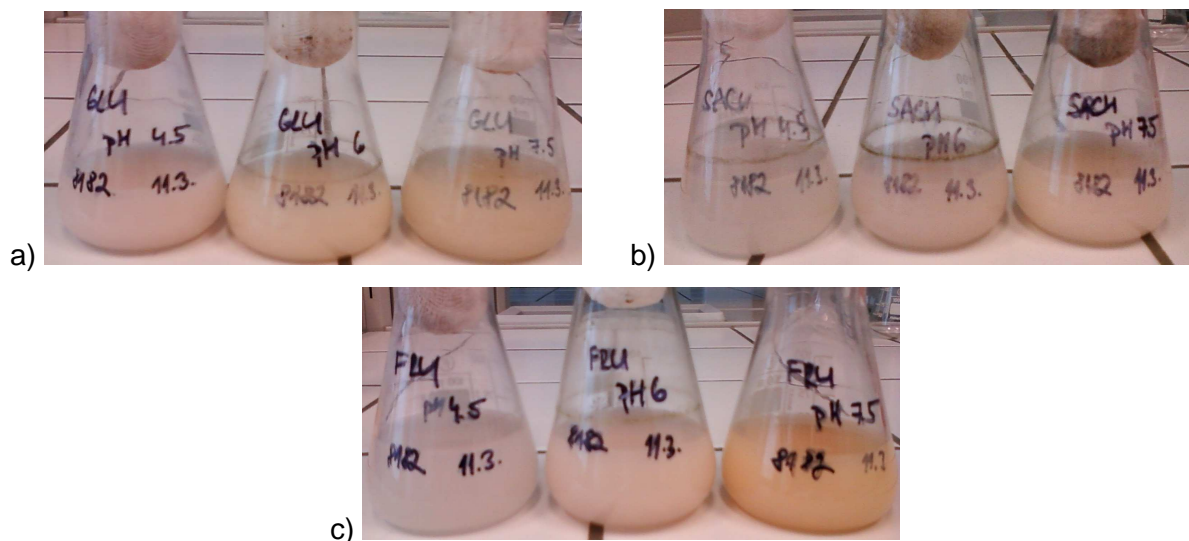
**Graf 6** Produkce biomasy a extracelulárních polymerů v závislosti na různém zdroji uhlíku



Z hlediska ekonomické bilance procesu mohou být vhodnými substráty i levné odpadní substráty jako jsou syrovátka nebo glycerol – vedlejší produkty potravinového, kosmetického a chemického průmyslu. Námi testovaná kultura prokázala schopnost utilizace těchto substrátů, přičemž se zdá, že z pohledu růstu kultury i produkce ECP je komplexní složení těchto odpadních substrátů pozitivní faktor. Na základě těchto výsledků bylo pro scale-up kultivaci ve fermentoru zvoleno médium obsahující syrovátku a glycerol-glukózové médium.

#### 4.8 Vliv počátečního pH média

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst *A. pullulans* a produkci ECP je hodnota počátečního pH média. V tomto experimentu byla provedena kultivace na 3 různých zdrojích uhlíku, a to glukóze, fruktóze a sacharóze, vše o koncentraci 80 g.L<sup>-1</sup>. pH bylo upraveno na hodnotu 4,5; 6 a 7,5. Po ukončení kultivace byla zvážena biomasa a vysráženy ECP. Získaná data jsou uvedena v tabulce 10 a vyneseny do grafu 7 a grafu 8. Vzhled kultury po ukončení kultivace je zobrazen na obrázku 25.



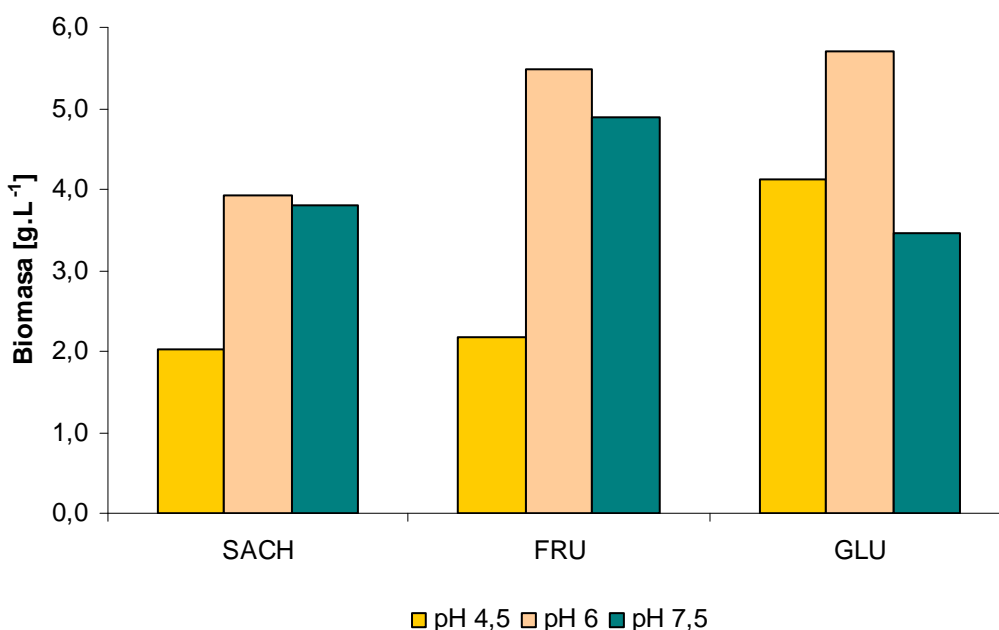
**Obr. 25** Vzhled kultury *A. pullulans* kultivované na daném sacharidu v závislosti na pH; zleva pH 4,5; 6; 7,5; a) glukóza, b) sacharóza, c) fruktóza

**Tabulka 10** Naměřená data pro zjištění vlivu počátečního pH na růst a produkci, hodnoty jsou uvedeny v g·L<sup>-1</sup>

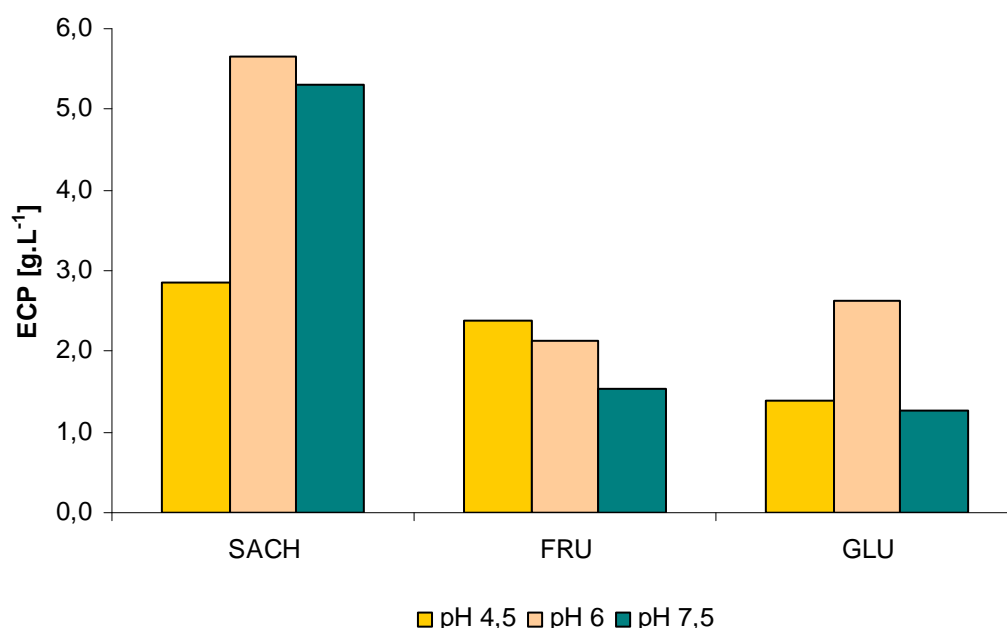
	pH 4,5			pH 6			pH 7,5		
	SACH	FRU	GLU	SACH	FRU	GLU	SACH	FRU	GLU
<b>Biomasa</b>	2,03	2,18	4,12	3,93	5,49	5,70	3,81	4,89	3,45
<b>ECP</b>	2,84	2,38	1,38	5,66	2,12	2,64	5,30	1,54	1,26

K největšímu nárůstu biomasy (5,49 g·L<sup>-1</sup>) došlo při kultivaci na médiu obsahujícím fruktózu při počátečním pH 6, zatímco k nejmenšímu nárůstu došlo u média obsahujícího sacharózu (2,03 g·L<sup>-1</sup>) při pH 4,5, kdy však došlo ke třetí nejvyšší produkci ECP (2,84 g·L<sup>-1</sup>). Nejvyšší produkce ECP (5,66 g·L<sup>-1</sup>) byla zaznamenána u média obsahujícího sacharózu při počátečním pH 6. Nejnižší obsah ECP (1,26 g·L<sup>-1</sup>) byl zjištěn u glukózového média při pH 7,5. Vzhledem k naměřeným datům při tomto experimentu můžeme opět potvrdit, že sacharóza je pro produkci ECP nejvhodnějším substrátem, a to při všech třech hodnotách počátečního pH. Pro kultivaci na glukózovém médiu je nejvhodnější počáteční pH 6 s největším nárůstem biomasy i produkcí ECP. Ke stejné hodnotě optimálního pH dospěli také autoři Gao a kol. [51]. Vzhledem k dobrému nárůstu biomasy a produkce ECP bylo pro další práce zvoleno pH 6 a 7,5.

**Graf 7** Grafické znázornění obsahu biomasy v závislosti na různém zdroji uhlíku a různém pH



**Graf 8** Grafické znázornění obsahu ECP v závislosti na různém zdroji uhlíku a různém pH



Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že kmen *A. pullulans* 8182 vykazuje dobrý růst a produkci exopolysacharidů při neutrálním až mírně zásaditém pH.

## 4.9 Kultivace na odpadních substrátech

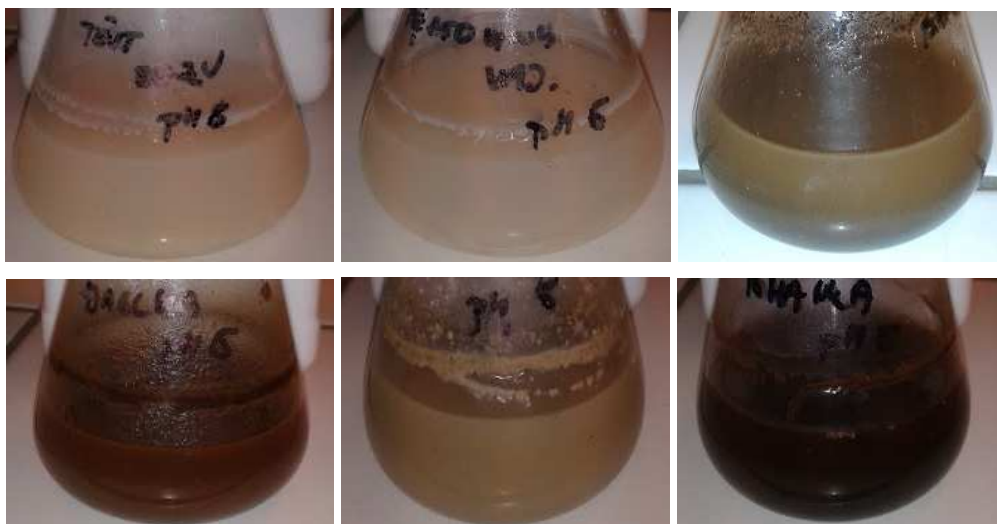
### 4.9.1 Kultivace bez úpravy substrátu

V této části byla provedena kultivace na odpadních substrátech jakožto ekonomicky výhodných surovinách. Použité substráty byly vaječné a bezvaječné těstoviny, jablečná vláknina, jablečné slupky, ovesné otruby a pohankové slupky. S odkazem na kapitolu 4.8 byla kultivace provedena při dvou hodnotách počátečního pH, a to pH 6 a pH 7,5 na produkčním médiu (kap.3.2.2) bez přídavku glukózy (jako zdroj uhlíku sloužily odpadní substráty). Po ukončení kultivace provedené dle postupu v kapitole 3.5.1, byly kvantifikovány redukující sacharidy, celkové sacharidy, glukóza, kyselina L-jablečná a ECP v supernatantu získaném dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1 před a po kyselé hydrolýze. Veškerá data jsou uvedena v následujících tabulkách: pro počáteční pH 6 v tabulkách 11–13 a pro počáteční pH 7,5 v tabulkách 14–16 .

### 4.9.2 Kultivace bez úpravy substrátu při počátečním pH 6

V tabulce 11 jsou uvedeny hodnoty analyzovaných parametrů, které slouží ke stanovení obsahu jednotlivých exopolymerů. Celkový obsah ECP stanovený gravimetricky (ECP grav.) je uveden v tabulce 13, kde je uveden také celkový obsah ECP po korekci na znečišťující látky, jejichž obsah je uveden v tabulce 12. Dále je v této tabulce uveden celkový obsah extracelulárních polymerů (ECP - HPLC) a obsah jednotlivých ECP (pullulan, PMLA) stanovených metodou HPLC/RI. Pro lepší přehlednost byly hodnoty také vyneseny do grafu 9. Na obrázku 26 je zobrazen vzhled kultury *A.pullulans* kultivované na jednotlivých substrátech. Vzhled kultury v Erlenmayerových baňkách se lišil zejména zbarvením ovlivněným zbarvením použitého substrátu.





**Obr. 26** Vzhled kultury *A.pullans* v závislosti na substrátu; Zleva; horní řada: bezvaječné těstoviny, vaječné těstoviny, jablečná vláknina; dolní řada: jablečné slupky, ovesné otruby, pohankové slupky.

**Tabulka 11** Parametry produkčních vlastností kultury rostoucí na odpadních substrátech bez úpravy při pH 6; obsah jednotlivých látek v supernatantu před a po aplikaci kyselé hydrolyzy; hodnoty jsou uvedeny v g.L<sup>-1</sup>

substrát	redukující sacharidy		celkové sacharidy		glukóza		kys. L-jablečná	
	před H	po H	před H	po H	před H	po H	před H	po H
TĚST. BEZ. VAJ.	0,61	6,70	11,68	12,44	0,15	6,83	ND	2,02
TĚST. VAJ.	0,31	9,55	15,40	11,31	0,10	9,76	ND	1,16
JABL. VLÁK.	0,72	4,62	9,47	4,83	0,16	1,29	ND	1,86
JABL. SLUPKY	2,24	3,35	7,36	4,66	0,50	1,80	ND	2,89
OVESNÉ OTRUBY	1,59	16,42	15,70	18,52	1,39	12,69	ND	1,75
POHAN. SLUPKY	0,20	2,56	0,97	3,75	0,04	2,56	ND	0,89

H – hydrolyza; ND – nebylo detekováno

**Tabulka 12** Obsah redukujících sacharidů a bílkovin ve vzorku exopolysacharidů - vyjádření míry znečištění vysrážených ECP; hodnoty jsou uvedeny v g.L<sup>-1</sup>

substrát	TĚST. BEZ. VAJ.	TĚST. VAJ.	JABL. VLÁK.	JABL. SLUPKY	OVESNÉ OTRUBY	POHAN. SLUPKY
redukující sacharidy	0,04	0,07	0,12	0,15	0,08	0,03
proteiny	0,14	0,12	0,33	0,35	0,31	0,10

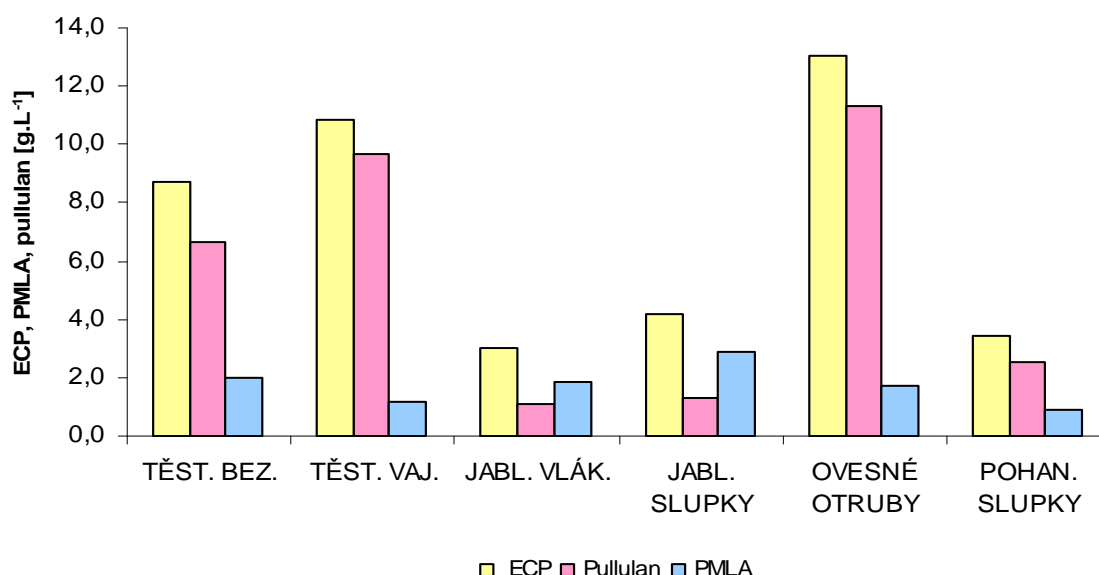


**Tabulka 13** Vyhodnocení celkového obsahu ECP a zastoupení jednotlivých extracelulárních polymerů pro kultivaci substrátů při pH 6; hodnoty jsou uvedeny v g.L<sup>-1</sup>

substrát	ECP grav.	ECP po korekci	ECP HPLC	Pullulan	PMLA
TĚST. BEZ.	6,28	6,10	8,70	6,68	2,02
TĚST. VAJ.	10,80	10,61	10,82	9,66	1,16
JABL. VLÁK.	5,78	5,33	2,99	1,13	1,86
JABL. SLUPKY	6,48	5,98	4,19	1,30	2,89
OVESNÉ OTRUBY	16,30	15,91	13,05	11,30	1,75
POHAN. SLUPKY	1,82	1,69	3,41	2,52	0,89

K nejvyšší produkci ECP došlo při kultivaci na ovesných otrubách - 13,05 g.L<sup>-1</sup>, obsah ECP na ostatních substrátech se pohyboval od 2,99 g.L<sup>-1</sup> u kultivace na jablečné vláknině do 10,82 g.L<sup>-1</sup> u vaječných těstovin. Při kvantifikaci jednotlivých extracelulárních polymerů byla největší produkce pullulanu zaznamenána u ovesných otrub (11,30 g.L<sup>-1</sup>), následně u vaječných těstovin (9,66 g.L<sup>-1</sup>) a u dalších substrátů v rozmezí 3,34 – 6,22 g.L<sup>-1</sup>. K nejvyšší produkci β-poly-L-jablečné kyseliny došlo při kultivaci na jablečných slupkách - 2,89 g.L<sup>-1</sup>. U ostatních substrátů se obsah PMLA pohyboval od 0,89 g.L<sup>-1</sup> do 2,02 g.L<sup>-1</sup>.

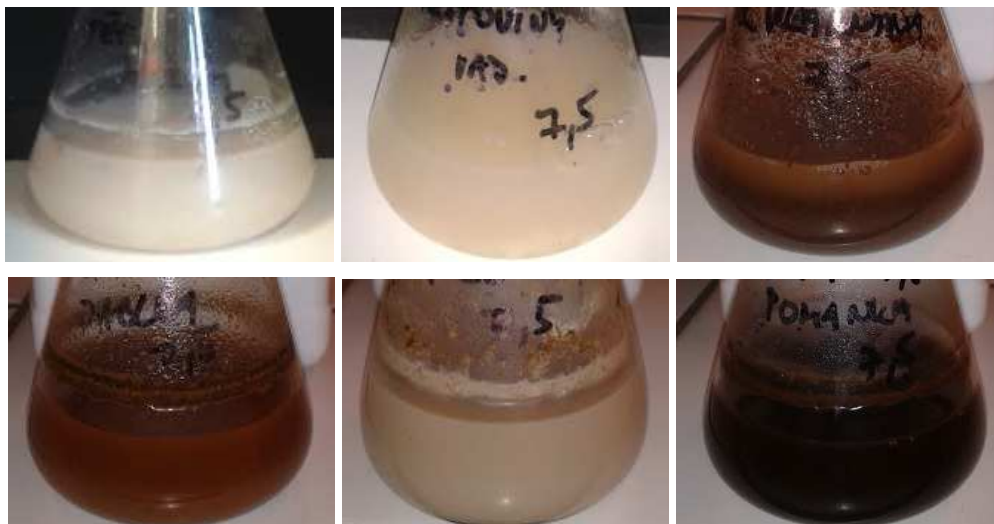
**Graf 9** Závislost celkového obsahu ECP na daném substrátu a zastoupení jednotlivých polymerů při pH 6



Hodnoty celkového obsahu ECP získané gravimetrickým stanovením byly v porovnání s hodnotami získanými metodou HPLC v některých případech vyšší, což mohlo být způsobeno vysrážením balastních látek, které jsou ve vodě rozpustné a sráží se i v ethanolu. V některých případech však byly hodnoty získané metodou HPLC nižší než u gravimetrického stanovení, což mohlo být způsobeno naopak nedokonalým vysrážením ECP.

#### 4.9.3 Kultivace *A.pullulans* bez úpravy odpadního substrátu při počátečním pH 7,5

V tabulce 14 jsou uvedena data, která slouží ke stanovení obsahu jednotlivých polymerů. Celkový obsah ECP stanovený gravimetricky (ECP grav.) je uveden v tabulce 16, kde je uveden také celkový obsah ECP po korekci na znečišťující látky, jejichž obsah je uveden v tabulce 15. Dále je v této tabulce uveden celkový obsah extracelulárních polymerů (ECP HPLC) a obsah jednotlivých ECP (pullulan, PMLA) stanovených metodou HPLC RI. Pro lepší přehlednost byly hodnoty také vyneseny do grafu 10. Vzhled (zbarvení) kultury *A. pullulans* CCM 8182 v Erlenmayerových baňkách se lišil dle použitého substrátu, jak je vidět na Obr. 27.



**Obr. 27** Vzhled kultury *A.pullulans* v závislosti na substrátu. Zleva; horní řada: bezvaječné těstoviny, vaječné těstoviny, jablečná vláknina; dolní řada: jablečné slupky, ovesné otruby, pohankové slupky.

**Tabulka 14** Parametry produkce exopolymérů při pH 7,5; obsah jednotlivých látek v supernatantu před a po aplikaci kyselé hydrolýzy; hodnoty jsou uvedeny v g.L<sup>-1</sup>

substrát	redukující sacharidy		celkové sacharidy		glukóza		kys. L-jablečná	
	před H	po H	před H	po H	před H	po H	před H	po H
<b>TĚST. BEZ.</b>	0,31	7,90	9,84	15,07	0,14	8,51	ND	0,31
<b>TĚST. VAJ.</b>	0,52	11,31	12,25	13,56	0,15	9,85	ND	0,52
<b>JABL. VLÁK.</b>	1,38	4,53	5,68	11,16	0,07	1,45	ND	1,00
<b>JABL. SLUPKY</b>	1,89	4,66	7,36	8,05	0,60	3,14	ND	0,84
<b>OVESNÉ OTRUBY</b>	2,72	18,52	20,94	25,30	0,70	13,73	ND	2,12
<b>POHAN. SLUPKY</b>	0,25	3,75	6,07	4,91	0,31	2,25	ND	0,83

H – hydrolýza; ND – nebylo detekováno

**Tabulka 15** Obsah proteinů a redukujících cukrů ve vzorku ECP - vyjádření míry znečištění vysrážených ECP; hodnoty jsou uvedeny v g.L<sup>-1</sup>

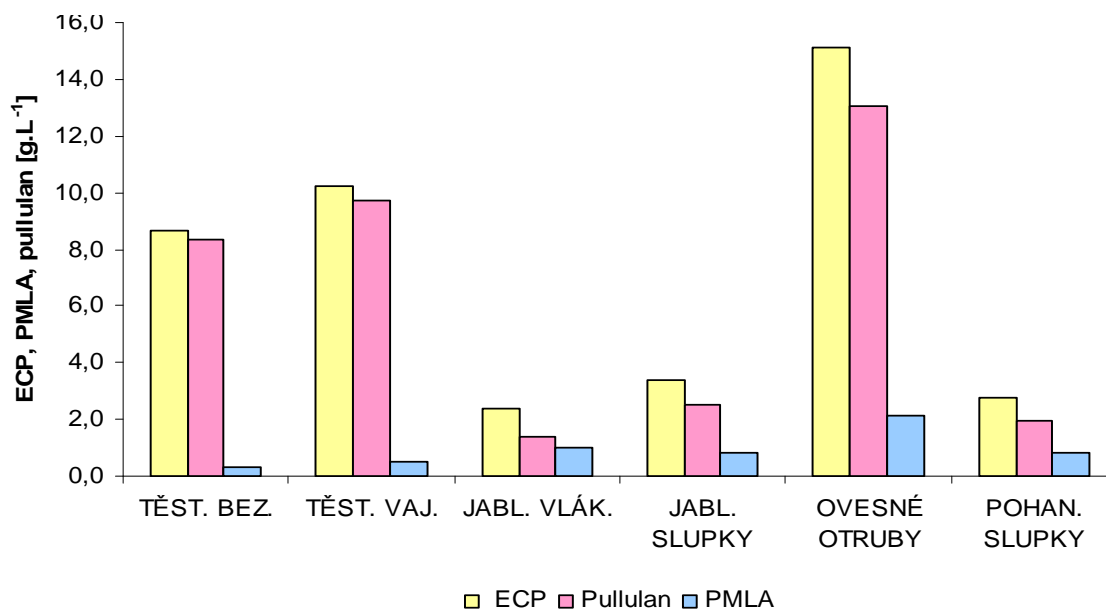
substrát	TĚST. BEZ.	TĚST. VAJ.	JABL. VLÁK.	JABL. SLUPKY	OVESNÉ OTRUBY	POHAN. SLUPKY
redukující sacharidy	0,02	0,02	0,15	0,16	0,06	0,08
proteiny	0,15	0,16	0,35	0,36	0,38	0,58

**Tabulka 16** Vyhodnocení celkového obsahu ECP a zastoupení jednotlivých extracelulárních polymerů pro kultivaci substrátů při pH 7,5; hodnoty jsou uvedeny v g.L<sup>-1</sup>

substrát	ECP grav.	ECP po korekci	ECP HPLC	Pullulan	PMLA
TĚST. BEZ.	8,76	8,59	8,68	8,37	0,31
TĚST. VAJ.	9,88	9,70	10,22	9,70	0,52
JABL. VLÁK.	2,71	2,22	2,38	1,38	1,00
JABL. SLUPKY	3,66	3,12	3,38	2,54	0,84
OVESNÉ OTRUBY	14,98	14,57	15,15	13,03	2,12
POHAN. SLUPKY	2,94	2,28	2,77	1,94	0,83

K nejvyšší produkci ECP došlo při kultivaci na ovesných otrubách s celkovým množstvím 15,15 g.L<sup>-1</sup>, obsah ECP na ostatních substrátech se obsah pohyboval v rozmezí od 2,38 g.L<sup>-1</sup> u kultivace na jablečné vláknině do 10,22 g.L<sup>-1</sup> u vaječných těstovin. Při kvantifikaci jednotlivých extracelulárních polymerů byla největší produkce pullulanu zaznamenána u ovesných otrub (13,03 g.L<sup>-1</sup>), následně u vaječných těstovin (9,70 g.L<sup>-1</sup>), bezvaječných těstovin (8,37 g.L<sup>-1</sup>) a u dalších substrátů v rozmezí 1,38 – 2,54 g.L<sup>-1</sup>.

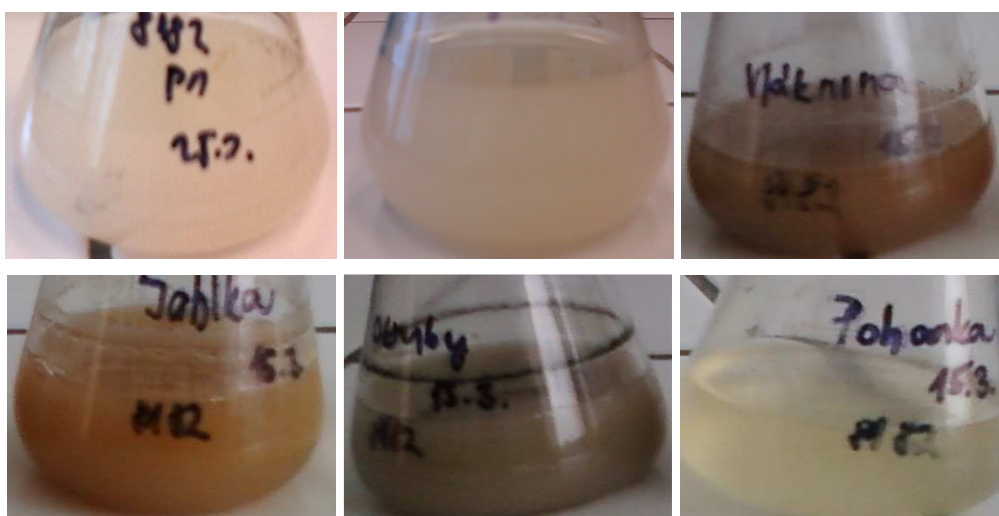
**Graf 10** Celkový obsahu ECP na daném substrátu a zastoupení jednotlivých polymerů při pH 7,5



K nejvyšší produkci  $\beta$ -poly-L-jablečné kyseliny došlo při kultivaci na ovesných otrubách - 2,12 g.L<sup>-1</sup>. U zbylých substrátů se obsah PMLA pohyboval od 0,31 g.L<sup>-1</sup> do 1,0 g.L<sup>-1</sup>. Hodnoty celkového obsahu ECP získané gravimetrickým stanovením byly v porovnání s hodnotami získanými metodou HPLC ve většině případů vyšší, což mohlo být způsobeno vysrážením balastních látek, které jsou ve vodě rozpustné a sráží se v ethanolu. Srovnání kultivací na substrátech za různých podmínek je uvedeno v kapitole 4.9.5.

#### 4.9.4 Kultivace na odpadních substrátech po aplikaci kyselé hydrolyzy

V další části experimentů byly pro kultivaci a produkci exopolysacharidů kmenem *A.pullulans* použity hydrolyzované odpadní substráty, což by mohlo lépe zpřístupnit zdroje uhlíku a vést k vyššímu růstu i produkčním vlastnostem. Vzhled (zbarvení) kultury *A. pullulans* CCM 8182 v Erlenmayerových baňkách se opět lišil v závislosti na použitém substrátu, jak je vidět na obrázku 28.



**Obr. 28** Vzhled kultury *A.pullulans* v závislosti na substrátu; Zleva; horní řada: bezvaječné těstoviny, vaječné těstoviny, jablečná vláknina; dolní řada: jablečné slupky, ovesné otruby, pohankové slupky

Obdobně jako u předchozích kultivací byla naměřená data uvedena v tabulce 19, 20 a 21. hodnoty byly také vyneseny do grafu 11 a 12.

**Tabulka 17** Produkční parametry pro substráty upravené předem kyselou hydrolyzou, obsah jednotlivých látek v supernatantu před a po aplikaci kyselé hydrolyzy; hodnoty jsou uvedeny v g.L<sup>-1</sup>

substrát	redukující sacharidy		celkové sacharidy		glukóza		kys. L-jablečná	
	před H	po H	před H	po H	před H	po H	před H	po H
<b>TĚST. BEZ.</b>	2,16	14,55	1,38	7,70	0,99	15,42	ND	0,82
<b>TĚST. VAJ.</b>	8,41	20,00	9,31	20,00	6,83	22,90	ND	0,90
<b>JABL. VLÁK.</b>	14,20	3,35	9,20	48,05	0,17	3,51	ND	1,27
<b>JABL. SLUPKY</b>	7,05	4,45	11,84	32,16	ND	3,73	ND	1,02
<b>OVESNÉ OTRUBY</b>	0,72	3,81	4,45	4,71	0,65	5,14	ND	1,18
<b>POHAN. SLUPKY</b>	9,38	22,16	10,69	13,56	7,24	13,46	ND	2,66

H – hydrolyza; ND – nebylo detekováno

**Tabulka 18** Obsah proteinů a redukujících sacharidů v preparátu vysřížených ECP; hodnoty jsou uvedeny v g.L<sup>-1</sup>

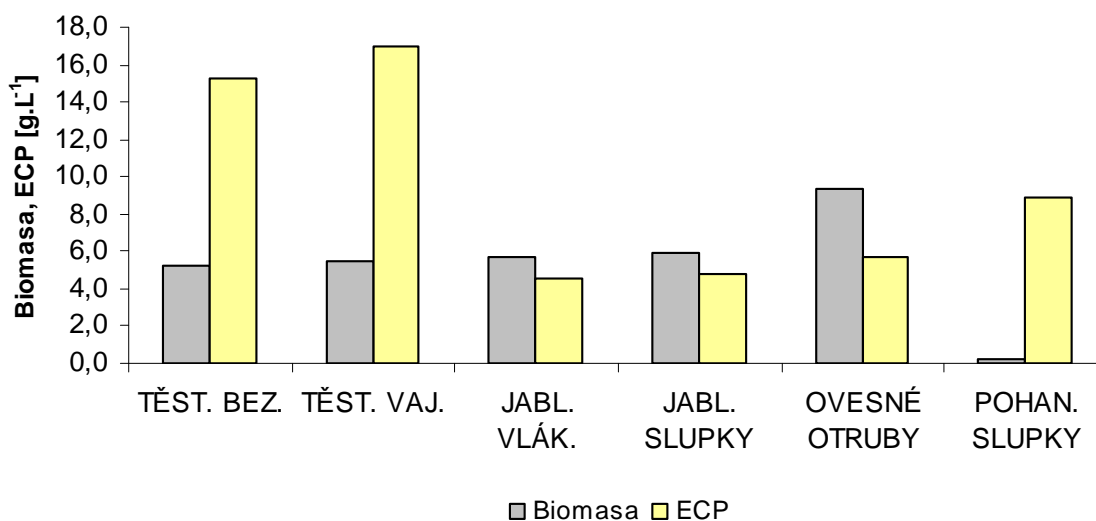
substrát	TĚST. BEZ.	TĚST. VAJ.	JABL. VLÁK.	JABL. SLUPKY	OVESNÉ OTRUBY	POHAN. SLUPKY
redukující sacharidy	0,03	0,17	0,21	0,22	0,09	0,07
proteiny	0,03	0,04	0,06	0,05	0,05	0,01

**Tabulka 19** Vyhodnocení celkového obsahu ECP a zastoupení jednotlivých extracelulárních polymerů; hodnoty jsou uvedeny v g.L<sup>-1</sup>

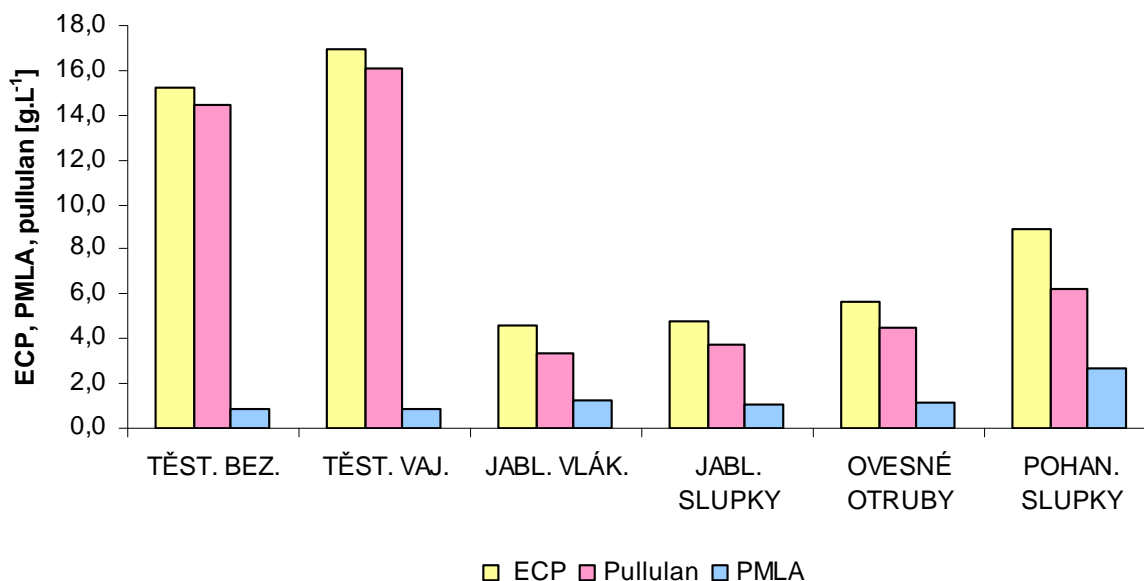
substrát	biomasa	ECP grav.	ECP po korekci	ECP HPLC	Pullulan	PMLA
TĚST. BEZ.	5,21	18,04	17,98	15,25	14,43	0,82
TĚST. VAJ.	2,50	20,82	20,62	16,97	16,07	0,90
JABL. VLÁK.	5,66	17,62	17,35	4,61	3,34	1,27
JABL. SLUPKY	5,97	16,28	16,02	4,75	3,73	1,02
OVESNÉ OTRUBY	9,30	16,48	16,34	5,67	4,49	1,18
POHAN. SLUPKY	0,21	13,76	13,69	8,88	6,22	2,66

Z tabulky 19 je patrné, že k největšímu nárůstu biomasy došlo při kultivaci na ovesných otrubách (9,3 g.L<sup>-1</sup>), u dalších substrátů se nárůst biomasy pohyboval od 0,21 do 5,97 g.L<sup>-1</sup>, kdy nejmenší nárůst byl zaznamenán u pohankových slupek. K nejvyšší produkci ECP došlo při kultivaci na vaječných těstovinách s celkovým obsahem 16,97 g.L<sup>-1</sup>, produkce ECP na dalších substrátech se pohybovalo od 4,61 g.L<sup>-1</sup> u jablečné vlákniny do 15,25 g.L<sup>-1</sup> u bezvaječných těstovin. Při kvantifikaci jednotlivých extracelulárních polymerů byla největší produkce pullulanu zaznamenána u vaječných těstovin (16,07 g.L<sup>-1</sup>), poté u bezvaječných těstovin (14,43 g.L<sup>-1</sup>) a následně dalších substrátů (3,34 – 6,22 g.L<sup>-1</sup>).

**Graf 11** Závislost koncentrace biomasy a ECP na daném substrátu



**Graf 12** Závislost celkového obsahu ECP na daném substrátu a zastoupení jednotlivých polymerů

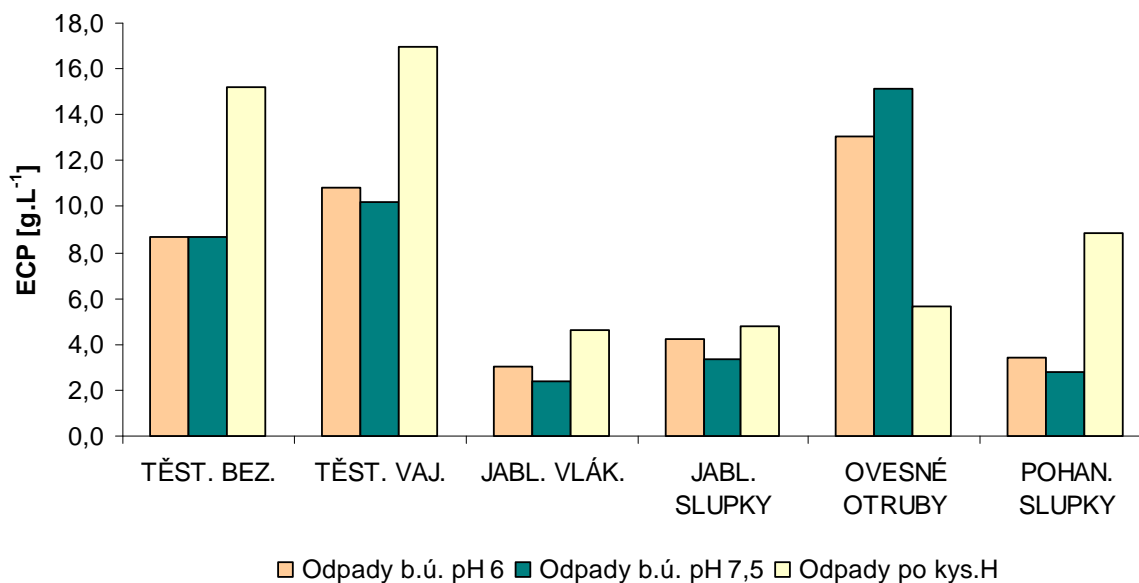


K nejvyšší produkci  $\beta$ -poly-L-jablečné kyseliny došlo při kultivaci na pohankových slupkách s obsahem  $2,66 \text{ g.L}^{-1}$ . U dalších substrátů se množství PMLA pohybovalo od  $0,82 \text{ g.L}^{-1}$  do  $1,27 \text{ g.L}^{-1}$ . Hodnoty celkového obsahu ECP získané gravimetrickým stanovením byly v porovnání s hodnotami získanými metodou HPLC vyšší, což mohlo být způsobeno vysrážením dalších balastních látek (barviva), které se uvolnily do média během kultivace.

#### 4.9.5 Srovnání jednotlivých kultivací na odpadních substrátech při různých podmínkách

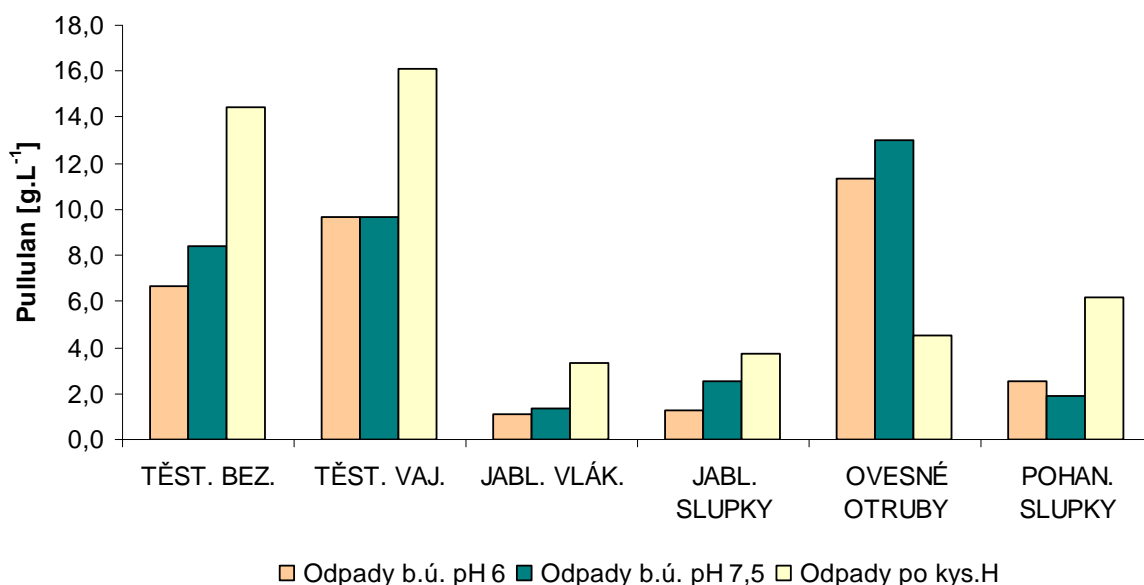
Pro vyhodnocení kultivací na odpadních substrátech byl porovnán obsah celkových ECP, pullulanu a PMLA. Veškerá data byla vynesena do grafu 13, 14 a 15.

**Graf 13** Porovnání produkce cekových ECP na různých substrátech za různých podmínek; odpady bez úpravy pH 6 a 7,5; odpady po aplikaci kyselé hydrolyzy



K nejvyšší produkci extracelulárních polymerů došlo u vaječných těstovin po úpravě kyselou hydrolyzou ( $16,97 \text{ g.L}^{-1}$ ), přičemž tato úprava způsobila zvýšení produkce ECP u všech substrátů s výjimkou ovesných otrub, kdy došlo k nejvyšší produkci na neupraveném substrátu při pH 7,5. Z grafu také vidíme, že se jako nejvhodnější substráty pro produkci ECP jeví vaječné a bezvaječné těstoviny, ovesné otruby a pohankové slupky. Jablečná vláknina a jablečné slupky nejsou pro tento účel příliš vhodné vzhledem k poměrně nízké produkci ECP na těchto substrátech. Lze tedy konstatovat, že substráty upravené kyselou hydrolyzou jsou vhodnějším substrátem pro *A. pullulans* CCM 8182, než substráty nehydrolyzované. Jak již bylo zmíněno, pro produkci ECP na ovesných otrubách je vhodnější použití neupraveného substrátu při pH 6 resp. 7,5. Produkce ECP na neupravených substrátech byla vyšší při použití počátečního pH 6, což je v souladu s výsledky kapitoly 4.8.

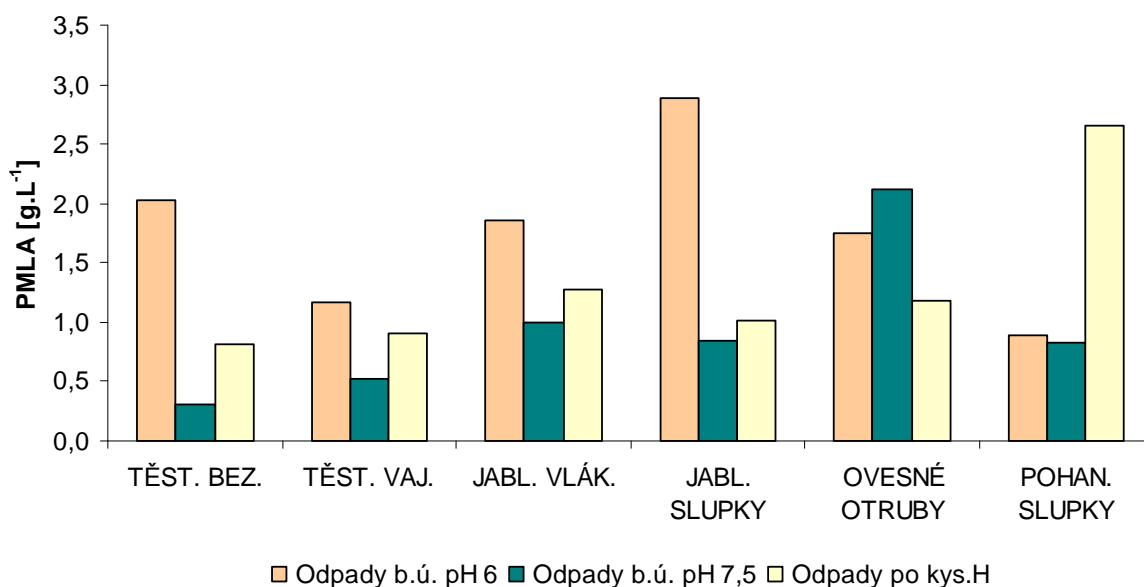
**Graf 14** Porovnání produkce pullulanu na různých substrátech za různých kultivačních podmínek



Pro srovnání obsahu jednotlivých extracelulárních polymerů na různých substrátech a při různých podmínkách jsou hodnoty vyneseny do grafu 14. K nejvyšší produkci pullulanu došlo při kultivaci na vaječných těstovinách upravených kyselou hydrolyzou, obdobně je tomu tak i u dalších substrátů opět s výjimkou ovesných otrub, kdy byl nejvyšší obsah pullulanu ( $13,03 \text{ g.L}^{-1}$ ) zaznamenán u neupravené formy tohoto substrátu při počátečním pH 7,5. V závislosti na počátečním pH se jako vhodnější pro produkci pullulanu jeví pH 7,5.



**Graf 15** Porovnání produkce PMLA na různých substrátech za různých kultivačních podmínek



Ve všech případech s výjimkou ovesných otrub došlo k vyšší produkci PMLA při počátečním pH 6, než při pH 7,5. Nejvyšší produkce PMLA byla zaznamenána u jablečných slupek ( $2,89 \text{ g.L}^{-1}$ ) při kultivaci na neupraveném substrátu a pH 6. K významnému zvýšení produkce PMLA došlo u pohankových slupek při kultivaci na substrátu upraveném kyselou hydrolyzou, z obsahu  $0,89 \text{ g.L}^{-1}$  na  $2,66 \text{ g.L}^{-1}$ , což bylo pravděpodobně způsobeno uvolněním růstových látek po aplikaci kyselé hydrolyzy. V ostatních případech došlo k nižší produkci než u nehydrolyzovaných substrátů.

Celkově lze konstatovat, že pro produkci pullulanu je vhodnější pH 7,5, zatímco pro produkci PMLA je to pH 6. Hodnotu počátečního pH tedy musíme zvolit v závislosti na požadovaném produktu. Dále se na základě získaných výsledků dá usoudit, že pro produkci pullulanu je zřejmě důležitý obsah dusíku v médiu, což vyplývá z významně zvýšené produkce na těstovinách a je i v souladu s některými literárními údaji [52]. Naopak pro produkci PMLA je pravděpodobně důležitý obsah určitých typů méně obvyklých sacharidů, případně fenolických látek, což vyplývá ze zvýšené produkce na pohankových a jablečných slupkách.

Současným trendem je používání odpadních substrátů jako zdroje uhlíku a dalších látek. V literatuře je popsána řada kultivací na odpadních substrátech jako je kokosové mléko, řepná melasa a další [52]. Israilides a kol. používali ke kultivaci *A. pullulans* slupky hroznového vína a vyprodukovali  $22,3 \text{ g.L}^{-1}$  pullulanu při pH 5,5 a dobu 7 dní. Jako substrát použili také hydrolyzovaný bramborový škrob, kde byla produkce pullulanu jen  $12,9 \text{ g.L}^{-1}$ , přičemž při suplementaci média dusičnanem amonným a hydrogenfosforečnanem draselným došlo k nárůstu na obsah  $30,8 \text{ g.L}^{-1}$  [53].

Wu a kol. zjistili, že hydrolyzované sladké brambory jsou velmi vhodným substrátem pro produkci vysokomolekulárního pullulanu ( $29,43 \text{ g.L}^{-1}$ ). Vyprodukovaný pullulan měl větší molekulovou hmotnost, než pullulan produkovaný na glukózovém případně sacharózovém médiu. Kultivace probíhala 96 hodin a hodnota pH byla 5,5 [54]. Thirumavalavan a kol. kultivovali *A. pullulans* na kokosovém mléce při pH 7 s nejvyšší produkcí  $58,0 \text{ g.L}^{-1}$  [55]. Göksungur a kol. kultivovali *A. pullulans* na řepné melase při počátečním pH 7,5



a vyprodukovali  $16,9 \text{ g.L}^{-1}$  pullulanu [56]. Leathers a kol. použili jako substrát pro kultivaci PMLA pšeničnou slámu, kdy maximální produkce byla  $20 \text{ g.L}^{-1}$  [57].

V porovnání s výsledky této práce bylo ve výše uvedených studiích dosaženo vyšších výtěžků exopolymerů, zřejmě vlivem lepšího nastavení kultivačních podmínek a složení média. Vzhledem k tomuto faktu by bylo vhodné v následujících experimentech ověřit další možnosti kultivačního uspořádání. Vhodné by bylo též předem upravit komplexní odpadní substráty enzymovou hydrolýzou. Také by bylo žádoucí zaměřit se na stanovení molekulové hmotnosti pullulanu produkovaného na daném substrátu, například metodou gelové permeační chromatografie. Je sice možné, že nedošlo k významné nadprodukcí extracelulárních polymerů, ale mohlo dojít i k produkci vysokomolekulárních polymerů jako v případě Wu a kol. [54].

## 4.10 Kultivace *A.pullulans* ve fermentoru

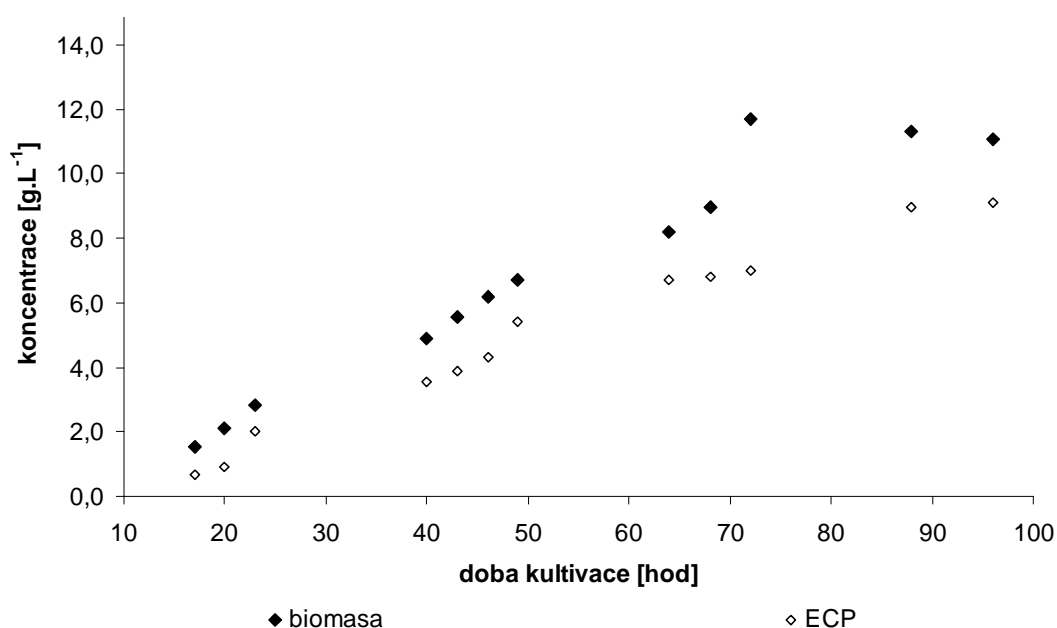
### 4.10.1 Kultivace na glycerol-glukózovém médiu

Cílem následujících experimentů je pokus o scale-up kultivace kvasinkového mikroorganismu *A.pullulans* v laboratorním fermentoru o objemu 1,5 L. Na základě výběru nejvhodnějšího zdroje uhlíku v kapitole 4.7 byla zvolena kultivace na glycerol-glukózovém médiu v poměru 1:1. Získaná data jsou uvedena v tabulce 20 a vynesena do grafu 16 a dále v tabulkách 21 a 22.

**Tabulka 20** Růst kultury a produkce ECP na glycerol-glukózovém médiu ve fermentoru

čas odběru [hod]		17	20	23	40	43	46	49	64	68	72	88	96
biomasa	[g.L <sup>-1</sup> ]	1,55	2,10	2,81	4,91	5,56	6,18	6,72	8,20	8,95	11,70	11,30	11,08
ECP		0,65	0,90	2,00	3,55	3,90	4,30	5,40	6,70	6,80	7,00	8,95	9,10

**Graf 16** Závislost koncentrace biomasy a ECP na době kultivace, glycerol-glukózové médium, fermentor

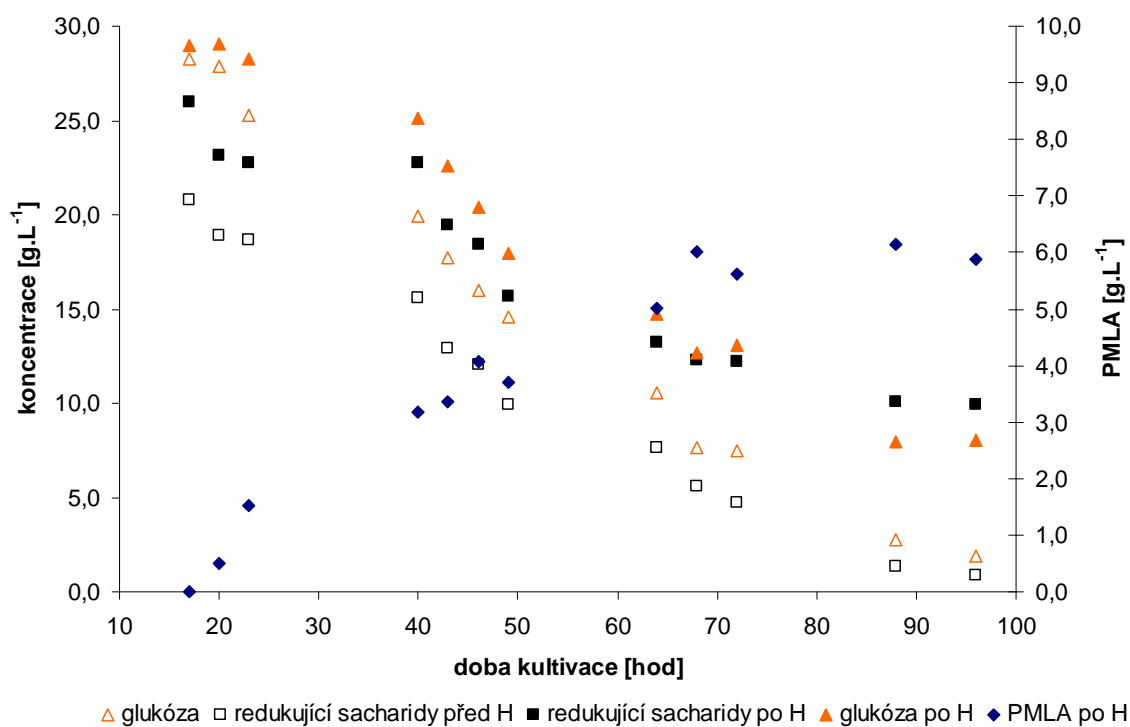


**Tabulka 21** Parametry pro hodnocení produkčních vlastností kmene kultivovaného na glycerol-glukózovém médiu

čas odběru [hod]	redukující sacharidy		celkové sacharidy		glukóza		kys. L-jablečná	
	před H	po H	před H	po H	před H	po H	před H	po H
17	20,80	25,96	20,57	20,46	28,29	29,01	ND	0,82
20	18,92	23,13	17,24	19,77	27,87	29,09	ND	0,49
23	18,64	22,73	14,25	20,80	25,30	28,23	ND	1,53
40	15,63	22,73	13,79	20,11	19,91	25,12	ND	3,18
43	12,90	19,43	18,05	16,21	17,71	22,59	ND	3,36
46	12,05	18,39	11,61	15,86	16,02	20,39	ND	4,06
49	9,94	15,67	14,25	14,94	14,56	17,94	ND	3,71
64	7,61	13,20	8,28	12,41	10,56	14,70	ND	5,02
68	5,57	12,27	6,67	11,49	7,61	12,69	ND	6,02
72	4,72	12,22	4,71	13,68	7,51	13,04	ND	5,61
88	1,31	10,11	5,52	11,61	2,76	7,91	ND	6,14
96	0,87	9,96	4,24	12,51	1,87	8,02	ND	5,89

H – hydrolýza; ND – nebylo detekováno

**Graf 17** Závislost koncentrace redukujících sacharidů, glukózy a L-jablečné kyseliny na době kultivace před a po kyselé hydrolýze



Z grafu 17 je patrné, že došlo k téměř úplnému spotřebování glukózy, kdy byl v čase 96 hodin obsah glukózy  $1,87 \text{ g.L}^{-1}$ . Dále vidíme nárůst redukujících sacharidů a glukózy po kyselé hydrolyze.

**Tabulka 22** Vypočtené hodnoty obsahu jednotlivých ECP v závislosti na čase

čas odběru [hod]		17	20	23	40	43	46	49	64	68	72	88	96
ECP (grav.)	[g.L <sup>-1</sup> ]	0,65	0,90	2,00	3,55	3,90	4,30	5,40	6,70	6,80	7,00	8,95	9,10
ECP (HPLC)		0,72	1,71	4,46	8,39	8,25	8,43	7,09	9,16	11,10	11,14	11,29	12,04
Pullulan		0,72	1,22	2,93	5,21	4,89	4,37	3,38	4,14	5,08	5,53	5,15	6,15
PMLA		0,00	0,49	1,53	3,18	3,36	4,06	3,71	5,02	6,02	5,61	6,14	5,89

Obsah pullulanu byl nejvyšší v čase 96 hodin, a to  $6,15 \text{ g.L}^{-1}$ . Největší koncentrace PMLA byla v čase 88 hodin ( $6,14 \text{ g.L}^{-1}$ ). Celkový obsah ECP stanovený metodou HPLC byl vyšší než v případě gravimetrického stanovení. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben nedokonalým vysrážením extracelulárních polymerů ze supernatantu. K obdobnému zjištění došlo také v případě kultivace na odpadních substrátech. Vzhledem k tomuto faktu by bylo vhodné dalšími experimenty zdokonalit vysrážení ECP a zároveň oddělit jednotlivé polymery (pullulan a PMLA) z vodného roztoku. Jednou z možných cest je vysrážení PMLA ve formě vápenaté soli [54].

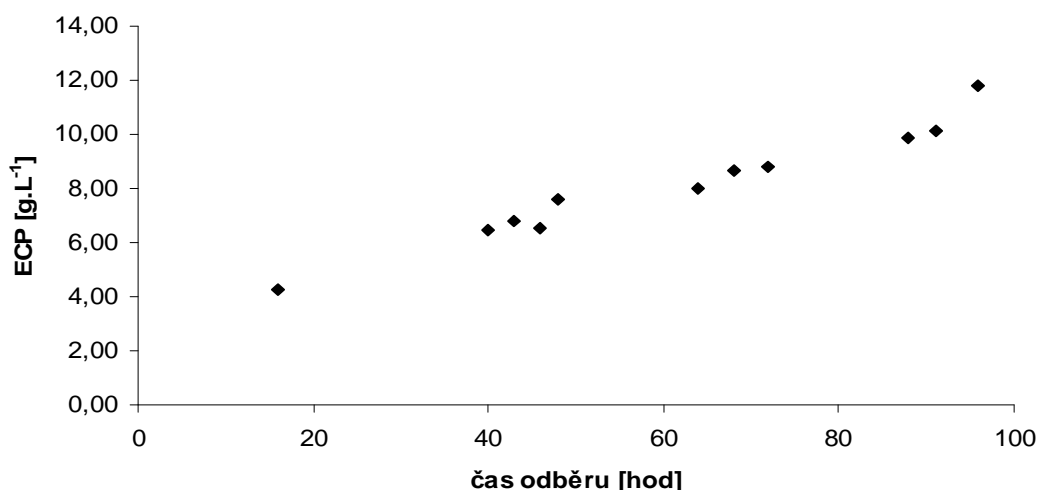
#### 4.10.2 Kultivace *A.pullulans* ve fermentoru na syrovátkovém médiu

Naměřená data pro batch kultivaci ve fermentoru o 1,5 L na syrovátkovém médiu (hlavním zdrojem uhlíku laktóza) jsou uvedena v tabulce 23 a tabulce 24. Do grafu 18 je vynesena závislost gravimetricky stanoveného obsahu ECP na době kultivace.

**Tabulka 23** Naměřená data, kultivace na syrovátce

čas odběru [hod]		16	40	43	46	48	64	68	72	88	91	96
ECP (grav.)	[g.L <sup>-1</sup> ]	4,25	6,45	6,80	6,55	7,60	8,00	8,70	8,80	9,90	10,15	11,80

**Graf 18** Závislost obsahu ECP na čase, kultivace na syrovátce



**Tabulka 24** Parametry pro kultivaci na syrovátkovém médiu, obsah jednotlivých látek v supernatantu před a po aplikaci kyselý hydrolyzy; hodnoty jsou uvedeny v g.L<sup>-1</sup>

čas odběru [hod]	redukující sacharidy		celkové sacharidy		glukóza		kys. L-jablečná, galaktóza	
	před H	po H	před H	po H	před H	po H	před H	po H
16	13,35	24,20	48,85	30,57	3,33	17,71	1,03	16,79
40	16,31	27,73	42,21	47,59	2,06	23,50	1,22	23,48
43	16,65	26,88	51,03	35,52	0,79	21,88	1,41	22,39
46	15,85	32,10	41,61	45,17	ND	20,37	0,81	21,25
48	14,94	33,86	40,00	47,59	ND	22,87	ND	24,24
64	15,28	41,93	50,34	36,21	ND	23,64	ND	25,44
68	13,75	27,05	35,40	27,82	ND	12,75	ND	19,90
72	16,25	37,78	37,47	31,84	ND	16,86	ND	27,64
88	14,83	29,20	38,74	41,03	ND	12,99	ND	22,00
91	16,70	37,22	47,13	39,89	ND	20,25	ND	30,74
96	16,89	31,64	49,56	40,12	ND	20,45	ND	28,48

H – hydrolyza; ND – nebylo detekováno

Při této kultivaci nebylo možné stanovit kvantitativně obsah jednotlivých extracelulárních polymerů, jelikož hydrolyzou supernatantu došlo k rozštěpení laktózy na glukózu a galaktózu, čímž vznikl směsný pík galaktózy a kyseliny L-jablečné. V tomto případě nebylo též možné vyhodnotit obsah pullulanu na základě rozdílu obsahu glukózy před a po kyselý hydrolyze, rovněž s ohledem na rozštěpení laktózy. V další experimentální práci by bylo vhodné provést optimalizaci metody stanovení obsahu glukózy a kyseliny L-jablečné u tohoto média. Nicméně ze získaných dat je patrné, že při kultivaci na syrovátkovém médiu došlo k poměrně vysoké produkci extracelulárních polymerů v množství 11,80 g.L<sup>-1</sup>.

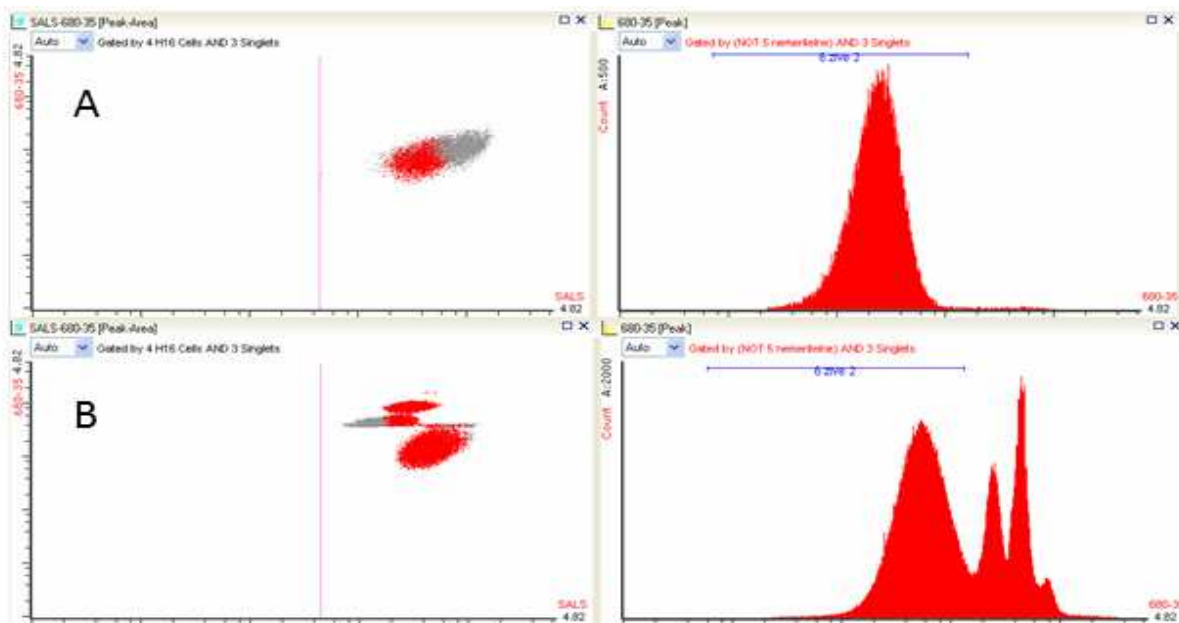
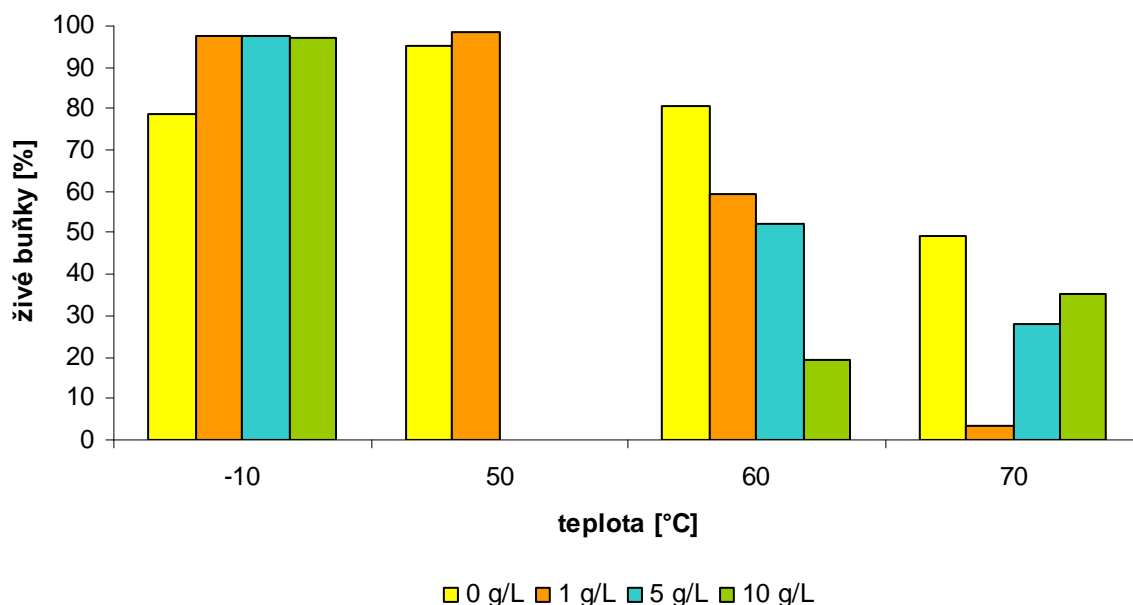
#### 4.11 Využití průtokové cytometrie ke stanovení viability *A.pullulans*

Další část experimentů byla věnována možnosti využití průtokové cytometrie ke sledování viability buněk *A.pullulans*. Současně byl sledován potenciální fyziologický význam produkce pullulanu pro tento kmen. Experimentální uspořádání umožnilo zjistit vliv různé koncentrace pullulanu na viabilitu buněk *A. pullulans* CCM 8182 uchovávaných při různé teplotě (-10, 50, 60 a 70 °C). Teplota zde působila jako exogenní stresový faktor. Naměřená data jsou uvedena v tabulce 24 a pro lepší přehlednost vyneseny do grafu 19. Ukázka grafického výstupu je uvedena na obrázku 29.

**Tabulka 25** Vliv různé koncentrace pullulanu na viabilitu buněk

		koncentrace pullulanu [g.L <sup>-1</sup> ]							
		0		1		5		10	
t [°C]	t [min]	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]	živé [%]	mrtvé [%]
-10	10	78,9	21,1	97,5	2,5	97,8	2,2	97,2	2,8
50		95,2	4,8	98,7	1,3	-	-	-	-
60		80,9	19,1	59,3	40,7	52,3	47,7	19,2	80,8
70		49,3	50,7	3,2	96,8	28,2	71,8	35,1	64,9

**Graf 19** Grafické znázornění závislosti podílu živých buněk na působení teploty



**Obr. 29** a) Cytogram (SALS-Red Channel)(vlevo) a histogram (Red Channel) pro živé buňky, b) Cytogram (SALS-Red Channel)(vlevo) a histogram (Red Channel) pro směs živých a mrtvých buněk

Na základě naměřených dat bylo zjištěno, že v případě působení nízké teploty na kulturu *A. pullulans* má pullulan ochrannou funkci, jelikož při všech koncentracích bylo téměř 98 % buněk živých, zatímco v případě nulového obsahu pullulanu v roztoku došlo k přežití pouze 79 % buněk. V případě působení teploty 50, 60 a 70 °C nebyla ochranná funkce pullulanu prokázána. Naopak měl na buňky spíše negativní vliv, protože nejvíce buněk přežilo v roztoku s nulovým obsahem pullulanu. Možnou fyziologickou rolí pullulanu by tedy mohla být ochrana buněk vůči chladovému šoku.

## 5 ZÁVĚRY

- V rámci teoretické části byla vypracována rešerše na téma využití kvasinkovitého mikroorganismu *Aureobasidium pullulans* v biotechnologiích. V první části je tento mikroorganismus popsán a jsou zde uvedeny možnosti jeho biotechnologického využití. Zvláštní pozornost je v práci věnována produkci, vlastnostem a možnostem využití extracelulárních polymerů produkovaných *A. pullulans*, a to pullulanu a kyseliny poly-L-jablečné.
- V rámci experimentální části práce bylo zjištění optimálních podmínek pro růst *A. pullulans* CCM 8182. Podstatný vliv na růst a produkci extracelulárních polymerů má zdroj a koncentrace zdroje uhlíku a hodnota počátečního pH média. Bylo zjištěno, že nejvhodnějším zdrojem uhlíku je sacharóza a následně glukóza o koncentraci  $80 \text{ g.L}^{-1}$ , kdy byl obsah biomasy  $3,93 \text{ g.L}^{-1}$  a obsah produkovaných extracelulárních polymerů  $5,66 \text{ g.L}^{-1}$ . Z testovaných hodnot počátečního pH bylo určeno jako nejvhodnější pH 6 a pH 7,5.
- Součástí experimentální práce byla také optimalizace stanovení obsahu jednotlivých extracelulárních polymerů metodou HPLC. Cílem byl výběr kolony vhodné k simultánnímu stanovení glukózy a kyseliny L-jablečné. K tomuto účelu byly testovány 4 různé kolony. Na základě provedených testů byla jako nejvhodnější zvolena kolona Rezex ROA Organic acid  $\text{H}^+$ , kdy došlo k dobré separaci jednotlivých látek. Podmínky separace byly: teplota  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , průtok mobilní fáze  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , mobilní fáze 5 mM kyselina sírová, detekce byla provedena refraktometrickým detektorem.
- Další částí práce byla kultivace na různých jednoduchých sacharidech i na komplexních odpadních substrátech (vaječné a bezvaječné těstoviny, jablečné vláknina a jablečné slupky, ovesné otruby a pohankové slupky). Kultivace probíhala při dvou hodnotách počátečního pH média zjištěných v předchozích experimentech.
- V případě kultivace při počátečním pH 6 byla největší produkce pullulanu zaznamenána v médiu s obsahem ovesných otrub, a to  $11,30 \text{ g.L}^{-1}$ . Nejvyšší produkce PMLA  $2,89 \text{ g.L}^{-1}$  byla prokázána na jablečných slupkách. U kultivace při pH 7,5 došlo k nejvyšší produkci pullulanu opět v médiu s obsahem ovesných otrub ( $13,03 \text{ g.L}^{-1}$ ), kde byl zaznamenán též nejvyšší obsah PMLA -  $2,12 \text{ g.L}^{-1}$ .
- Kultivace kmene *A.pullulans* byla také provedena na odpadních substrátech upravených pomocí kyselé hydrolýzy. Zde došlo k nejvyšší produkci pullulanu na hydrolyzovaných vaječných těstovinách o koncentraci  $16,07 \text{ g.L}^{-1}$  a nejvyšší produkci PMLA o koncentraci  $2,66 \text{ g.L}^{-1}$  na pohankových slupkách. Důvodem vysoké produkce pullulanu v médiu s obsahem hydrolyzovaných těstovin je zřejmě vyšší dostupnost dusíku, vyšší produkce PMLA je spojena s dostupností atypických sacharidů, případně fenolických látek. Porovnáním kultivací na odpadních substrátech při různých podmínkách lze dále konstatovat že pro produkci pullulanu je vhodnější počáteční pH 7,5, zatímco pro produkci PMLA je to pH 6.

- V rámci scale-up experimentů v laboratorním fermentoru o objemu...byla provedena kultivace na směsném glycerol-glukózovém médiu a na syrovátce. Na médiu s obsahem směsi glycerol:glukóza 1:1 bylo získáno 6,15 g.L<sup>-1</sup> pullulanu a 6,14 g.L<sup>-1</sup> PMLA. Na syrovátkovém médiu bylo dosaženo produkce 11,80 g.L<sup>-1</sup>.
- Na základě vyhodnocení různých typů izolace ECP a různého způsobu kvantifikace bylo v některých případech zjištěno nedokonalé vysrážení extracelulárních polymerů z vodného roztoku. Další experimentální prací by bylo vhodné zaměřit se na optimalizaci postupu izolace ECP z roztoku a oddělení jednotlivých polymerů z vodného roztoku, dále také např. určení molekulové hmotnosti produkovaných polymerů pomocí gelové permeační chromatografie.
- Dle získaných výsledků lze konstatovat, že kmen *A. pullulans* CCM 8182 za použitých podmínek vykazuje spíše průměrnou produkci obou sledovaných druhů extracelulárních polymerů na testovaných substrátech. Možným řešením zvýšení produkce těchto látek je další modifikace kultivačního uspořádání a složení média, případně využití mutageneze k selekci nadprodukčních kmenů.
- V poslední části práce byl studován potenciální fyziologický význam pullulanu pro produkční kmen *A. pullulans*. Pomocí průtokové cytometrie byla sledována viabilita buněk při nízké a vysoké teplotě v přítomnosti pullulanu o různé koncentraci. Podle získaných výsledků je pullulan produkován s velkou pravděpodobností jako ochrana *A. pullulans* CCM 8182 proti chladovému šoku, nikoli však proti teplotnímu šoku. Pullulan by tedy mohl být kulturou využíván jako kryoprotektant.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GAUR, Rajeeva, Ranjan SINGH, Monika GUPTA a Manogya Kumar GAUR. Aureobasidium pullulans, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2010, roč. 47, č. 9. ISSN 1684-5315. DOI: 10.5897/AJB10.948. Dostupné z: [www.academicjournals.org/AJb](http://www.academicjournals.org/AJb)
- [2] RAVELLA, Sreenivas Rao, Teresa Suárez QUIÑONES, Andy RETTER, Monika HEIERMANN, Thomas AMON, Phil J. HOBBS a Peilin CEN. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus Aureobasidium pullulans. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010, roč. 82, č. 3, s. 728-732. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.05.039. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710004376>
- [3] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. 699 s,
- [4] Aureobasidium pullulans. *Concordia University Fungal genomic project* [online]. 2005, 06.04.2005 [cit. 2013-04-01]. Dostupné z: <http://fungalggenomics.concordia.ca/fungi/Apul.php>
- [5] ZALAR, P., Cene GOSTINCAR, Sybren G. DE HOOG, V. URSIC, Montarop SUDHADHAM a Nina GUNDE-CIMERMAN. Redefinition of Aureobasidium pullulans and its varieties. *Studies in Mycology* [online]. 2008, roč. 61, č. 1, s. 21-38. ISSN 0166-0616. DOI: 10.3114/sim.2008.61.02. Dostupné z: <http://www.studiesinmycology.org/cgi/doi/10.3114/sim.2008.61.02>
- [6] DOMINGUEZ, Ana, Clarisse NOBRE, Lígia R. RODRIGUES, António M. PERES, Duarte TORRES, Isabel ROCHA, Nelson LIMA a José TEIXEIRA. New improved method for fructooligosaccharides production by Aureobasidium pullulans. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, roč. 89, č. 4, s. 1174-1179. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.03.091. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712003190>
- [7] CATLEY, Brian J. Utilization of carbon sources by Pullularia pullulans for the elaboration of extracellular polysaccharides. *Applied microbiology* [online]. 1971, roč. 22, č. 4, s. 641-649. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC376379/#reference-sec>
- [8] CATLEY, Brian J., Alison RAMSAY a Catherine SERVIS. Observations on the structure of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research* [online]. 1986, roč. 153, č. 1, s. 79-86. ISSN 00086215. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)90197-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500901976>
- [9] CHI, Zhenming a Shuangzhi ZHAO. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2003, roč. 33, 2-3, s. 206-211. ISSN 01410229. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00119-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022903001194>
- [10] LEATHERS, Timothy D. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2003, roč. 62, č. 5-6, s. 468-473. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-003-1386-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-003-1386-4>



- [11] KUMAR, Deepak, Nisha SAINI, Vinay PANDIT a Sajid ALI. An Insight To Pullulan: A Biopolymer in Pharmaceutical Approaches. *International Journal of Basic and Applied Sciences* [Online], 2012, roč. 1, č. 3, s. 202-219. Dostupné z: <http://www.sciencepubco.com/index.php/ijbas/article/view/101>
- [12] REKHA, M. R.; Chandra P. SHARMA,. Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: a perspective. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs* [online]. 2007, roč. 20, č. 2, s. 116-121. Dostupné z: <http://www.biomedsearch.com/article/Pullulan-as-promising-biomaterial-biomedical/165363930.html>
- [13] NA, Kun, Kwang Hee LEE a You Han BAE. PH-sensitivity and pH-dependent interior structural change of self-assembled hydrogel nanoparticles of pullulan acetate/oligo-sulfonamide conjugate. *Journal of Controlled Release* [online]. 2004, roč. 97, č. 3, s. 513-525 [cit. 2013-02-02]. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.04.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365904001841>
- [14] RINGSDORF, Helmut. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia* [online]. roč. 51, č. 1, s. 135-153. ISSN 03608905. DOI: 10.1002/polc.5070510111. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/polc.5070510111>
- [15] ZHANG, Haitao, Fei LI, Jun YI, Chunhu GU, Li FAN, Youbei QIAO, Yangchun TAO, Chong CHENG a Hong WU. Folate-decorated maleilated pullulan–doxorubicin conjugate for active tumor-targeted drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2011, roč. 42, č. 5, s. 517-526. ISSN 09280987. DOI: 10.1016/j.ejps.2011.02.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092809871100039X>
- [16] FUNDUEANU, Gheorghe, Marieta CONSTANTIN a Paolo ASCENZI. Preparation and characterization of pH- and temperature-sensitive pullulan microspheres for controlled release of drugs. *Biomaterials* [online]. 2008, roč. 29, č. 18, s. 2767-2775. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.03.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961208001804>
- [17] BORIDY, Sebastien, Haruko TAKAHASHI, Kazunari AKIYOSHI a Dusica MAYSINGER. The binding of pullulan modified cholesteryl nanogels to A $\beta$  oligomers and their suppression of cytotoxicity. *Biomaterials* [online]. 2009, roč. 30, č. 29, s. 5583-5591. ISSN 01429612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209006176>
- [18] SCOMPARIN, Anna, Stefano SALMASO, Sara BERSANI, Ronit SATCHI-FAINARO a Paolo CALICETI. Novel folated and non-folated pullulan bioconjugates for anticancer drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2011, roč. 42, č. 5, s. 547-558. ISSN 09280987. DOI: 10.1016/j.ejps.2011.02.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098711000613>
- [19] CORTESI, Rita a Claudio NASTRUZZI. Delivery systems for DNA-binding drugs as gene expression modulators. *Drug Discovery Today* [online]. 2001, roč. 6, č. 17, s. 893-904. ISSN 13596446. DOI: 10.1016/S1359-6446(01)01893-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644601018931>

- [20] HOSSEINKHANI, Hossein, Teruyoshi AOYAMA, Osamu OGAWA a Yasuhiko TABATA. Liver targeting of plasmid DNA by pullulan conjugation based on metal coordination. *Journal of Controlled Release* [online]. 2002, roč. 83, č. 2, s. 287-302. ISSN 01683659. DOI: 10.1016/S0168-3659(02)00201-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365902002018>
- [21] SHIMADA, Kyo, Kin'ichi MATSUSHIMA, Juichiro FUKUMOTO a Takehiko YAMAMOTO. Poly-(L)-malic acid; A new protease inhibitor from. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1969, roč. 35, č. 5, s. 619-62]. ISSN 0006291x. DOI: 10.1016/0006-291X(69)90449-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X69904495>
- [22] RATHBERGER, Klaus, Hermine REISNER, Bertram WILLIBALD, Hans-Peter MOLITORIS a Eggehard HOLLER. Comparative synthesis and hydrolytic degradation of poly (L-malate) by myxomycetes and fungi. *Mycological Research* [online]. 1999, roč. 103, č. 5, s. 513-520. ISSN 09537562. DOI: 10.1017/S0953756298007680. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756208603056>
- [23] MANITCHOTPISIT, Pennapa, Christopher D. SKORY, Stephen W. PETERSON, Neil P. J. PRICE, Karl E. VERMILLION a Timothy D. LEATHERS. Poly( $\beta$ -L-malic acid) production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial microbiology* [online]. 2012, roč. 39, č. 1, s. 125-132. ISSN 1367-5435. DOI: 10.1007/s10295-011-1007-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-011-1007-7>
- [24] LJUBIMOVA, Julia Y., Manabu FUJITA, Natalya M. KHAZENZON, Bong-Seop LEE, Sebastian WACHSMANN-HOGIU, Daniel L. FARKAS, Keith L. BLACK a Eggehard HOLLER. Nanoconjugate based on polymalic acid for tumor targeting. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2007, roč. 171, č. 2, s. 195-203. ISSN 00092797. DOI: 10.1016/j.cbi.2007.01.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279707000300>
- [25] NAGATA, Naoki, Tadaatsu NAKAHARA a Takeshi TABUCHI. Fermentative production of poly( $\beta$ -L-malic acid), a polyelectrolytic biopolyester, by *Aureobasidium* sp. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* [online]. 1993, roč. 57, č. 4, s. 638-642. ISSN 0916-8451.
- [26] PATIL, Rameshwar, Jose PORTILLA-ARIAS, Hui DING, Bindu KONDA, Arthur REKECHENETSKIY, Satoshi INOUE, Keith L. BLACK, Eggehard HOLLER a Julia Y. LJUBIMOVA. Cellular Delivery of Doxorubicin via pH-Controlled Hydrazone Linkage Using Multifunctional Nano Vehicle Based on Poly( $\beta$ -L-Malic Acid). *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, roč. 13, č. 12, s. 11681-11693. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms130911681. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/9/11681/>
- [27] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biotechnologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991, 182 s. ISBN 80-7080-121-2.
- [28] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vydání. Brno: NEPTUN, 2005. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
- [29] PODSTATOVÁ, Hana. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena*. 1. vyd. Olomouc: EPAVA, 2001. 285 s. ISBN 80-86297-07-1.

- [30] VESELÁ, Mária a Milan DRDÁK. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. přepr. vyd. Brno: VUT, 1999, 88 s. ISBN 80-214-1305-0.
- [31] TODA, Kiyoshi, Yukiko GOTOH, Tomoko ASAKURA, Isamu YABE a Hisamoto FURUSE. Fluid viscosity of *Aureobasidium pullulans* cultures obtained at two different initial pH values. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2000, roč. 89, č. 3, s. 258-261. ISSN 13891723. DOI: 10.1016/S1389-1723(00)88829-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172300888295>
- [32] SHINGEL, Kirill I. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research* [online]. 2003, roč. 339, č. 3, s. 447-460. ISSN 00086215. DOI: 10.1016/j.carres.2003.10.034. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000862150300599>
- [33] CAMPBELL, Bradley S, Abu-Baker M SIDDIQUE, Barbara M MCDOUGALL a Robert J SEVIOUR. Which morphological forms of the fungus *Aureobasidium pullulans* are responsible for pullulan production?. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2004, roč. 232, č. 2, s. 225-228. ISSN 03781097. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00076-X. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097\(04\)00076-X](http://doi.wiley.com/10.1016/S0378-1097(04)00076-X)
- [34] BENDER, Hans, Jochen LEHMANN a Kurt WALLENFELS. Pullulan, ein extracelluläres Glucan von *Pullularia pullulans*. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 1959, roč. 36, č. 2, s. 309-316. ISSN 00063002. DOI: 10.1016/0006-3002(59)90172-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006300259901726>
- [35] KRISHAN, Awtar, H KRISHNAMURTHY a Satish TOTEY. *Applications of flow cytometry in stem cell research and tissue regeneration*. Hoboken, N.J.: John Wiley, c2010, xii, 289 p. ISBN 978-047-0543-986.
- [36] ORMEROD, M, H KRISHNAMURTHY a Satish TOTEY. *Flow cytometry: a practical approach*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2000, xx, 276 p. ISBN 01-996-3824-1.
- [37] SHAPIRO, Howard M., H. KRISHNAMURTHY a Satish TOTEY. *Practical Flow Cytometry: a practical approach* [online]. 4th ed. Hoboken: John Wiley, 2005, xx, 276 p. ISBN 978-047-1434-030.
- [38] BRANSKÁ, Barbora, Michaela LINHOVÁ, Petra PATÁKOVÁ, Leona PAULOVÁ a Karel MELZOCH. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chemické Listy* [online]. 2011, č. 105, s. 586-593. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_08\\_586-593.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf)
- [39] ŽIVA, Jan. Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Ziva* [online]. 2005, roč. 53, č. 1, s. 46-48 [cit. 2013-01-21]. ISSN 0044-4812.
- [40] vscht.cz [online]. [cit. 2013-04-07]. Schéma měřící cely průtokového cytometru. Dostupné z: <http://vscht.cz/document.php?docId=5241>
- [41] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
- [42] SKUTEK, Miroslav. Analýza vybraných biologicky aktivních látek v cereálních výrobcích. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 126 s. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.

- [43] LEE, Bong S. a Eggehard HOLLER. Effects of culture conditions on  $\beta$ -poly( L -malate) production by *Physarum polycephalum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. roč. 51, č. 5, s. 647-652. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s002530051445. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051445>
- [44] CAO, Weifeng, Jianquan LUO, Juan ZHAO, Changsheng QIAO, Luhui DING, Benkun QI, Yi SU a Yinhua WAN. Intensification of  $\beta$ -poly(L-malic acid) production by *Aureobasidium pullulans* ipe-1 in the late exponential growth phase. *Journal of Industrial Microbiology* [online]. 2012, roč. 39, č. 7, s. 1073-1080. ISSN 1367-5435. DOI: 10.1007/s10295-012-1111-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-012-1111-3>
- [45] CHEN Zhan-Guo, Bo-Ti EN, Zhi-Qui ZHANG. Simultaneous determination of eight organic acids in *Fructus mume* by RP-HPLC. *China Journal of Chinese Materia Medica* [online]. 2006; roč. 31, č. 20, s. 1783–1786. ISSN: 1001-5302.
- [46] Rezex. PHENOMENEX. *Phenomenex* [online]. [cit. 2013-01-17]. Dostupné z: <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/rezex>
- [47] THIRUMAVALAVAN, K., T.R. MANIKKANDAN, R. DHANASEKAR, Christian BARNETT, G. BAMBALOV a Bernard SCANLON. Batch Fermentation Kinetics of Pullulan from *Aureobasidium pullulans* Using Low Cost Substrates. *Biotechnology(Faisalabad)* [online]. 2008, roč. 7, č. 2, s. 317-322. ISSN 1682296x. DOI: 10.3923/biotech.2008.317.322. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=biotech.2008.317.322>
- [48] CHOUDHURY, Anirban R., Puja SALUJA a G.S. PRASAD. Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of *Caesulia axillaris*. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010, roč. 83, č. 4, s. 1547-1552. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.10.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710008088>
- [49] GIBSON, Larry H. a Robert W. COUGHLIN. Optimization of High Molecular Weight Pullulan Production by *Aureobasidium pullulans* in Batch Fermentations. *Biotechnology Progress* [online]. 2008, roč. 18, č. 3, s. 675-678. ISSN 8756-7938. DOI: 10.1021/bp0200043. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp0200043>
- [50] YOUSSEF, F., Triantafyllos ROUKAS a Coastas G. BILIADERIS. Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry* [online]. 1999, roč. 34, č. 4, s. 355-366. ISSN 13595113. DOI: 10.1016/S0032-9592(98)00106-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003295929800106X>
- [51] GAO, Wa, Yi-Joon KIM, Chung-Han CHUNG, Jianhong LI a Jin-Woo LEE. Optimization of mineral salts in medium for enhanced production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 using an orthogonal array method. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* [online]. 2010, roč. 15, č. 5, s. 837-845. ISSN 1226-8372. DOI: 10.1007/s12257-010-0042-y. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12257-010-0042-y>
- [52] OGUZHAN Pinar a Filiz YANGILAR. Pullulan: Production and usage in food industry. *African Journal of Food Science and Technology* [online]. roč. 4, č. 3. s. 57-63. ISSN 2141-5455. Dostupné z: <http://interesjournals.org/AJFST>

- [53] ISRAILIDES, Cleanthes J., Alan SMITH, J. E. HARTHILL, Christian BARNETT, G. BAMBALOV a Bernard SCANLON. Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1998, roč. 49, č. 5, s. 613-617]. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s002530051222. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051222>
- [54] WU, Shengjun, Hanqing CHEN, Zhengyu JIN a Qunyi TONG. Effect of two-stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2010, roč. 26, č. 4, s. 737-741. ISSN 0959-3993. DOI: 10.1007/s11274-009-0231-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-009-0231-z>
- [55] Thirumavalavan, K., T.R. MANIKKADAN a R. DHANASEKAR. Pullulan production from coconut by-products by *Aureobasidium pullulans*. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2009, roč. 8, č. 2, s. 254-258. ISSN 1684-5315. Dostupné z: <http://www.academicjournals.org/AJB>
- [56] GOKSUNGUR, Yekta, Asli UCAN a Ulgar GUVENC. Production of pullulan from beet molasses and synthetic medium by *Aureobasidium pullulans*. *Turkish Journal of Biology* [online]. roč. 28, č. 1, s. 23-30. ISSN 1300-0152.
- [57] LEATHERS, Timothy D. a Pennapa MANITCHOTPISIT. Production of poly( $\beta$ -l-malic acid) (PMA) from agricultural biomass substrates by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters* [online]. 2013, roč. 35, č. 1, s. 83-89. ISSN 0141-5492. DOI: 10.1007/s10529-012-1045-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-012-1045-x>

## 7 SEZNAM ZKRATEK

CSL	corn steep liquer – kukuřičný výluh
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOX	doxorubicin
ECP	extracelulární polymery
FFáza	fruktofuranosidáza
FOS	fruktooligosacharidy
HPLC	High performance liquid chromatography, Vysokoučinná kapalinová chromatografie
CHP	cholesteryl-pullulan
kDa	kilodalton, jednotka molekulové hmotnosti proteinů
MP	methyl-pullulan
PDA	„Photo-Diode Array“, fotodiodové pole – detektor HPLC
PHB	polyhydroxybutyrát
PMLA	poly-L-jablečná kyselina
RI	refraktometrický detektor
rmp	„ <i>revolutions per minute</i> “, otáčky za minutu
SALS	„Small Angle Light Scatter“, malý úhel rozptylu světla
UV	Ultraviolet, ultrafialové
UVB	ultrafialové záření
VIS	Visible, viditelný
vvp	průtok vzduchu