

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

CHITOSAN-GLUKANOVÝ KOMPLEX IZOLOVANÝ ZE
SCHIZOPHYLLUM COMMUNE.

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

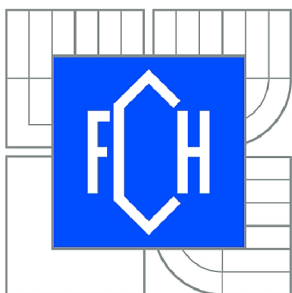
Bc. MARTIN KRČMÁŘ

BRNO 2011



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

CHITOSAN-GLUKANOVÝ KOMPLEX IZOLOVANÝ ZE SCHIZOPHYLLUM COMMUNE.

THE CHITOSAN-GLUCAN COMPLEX ISOLATED FROM SCHIZOPHYLLUM COMMUNE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. MARTIN KRČMÁŘ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2011



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0490/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Martin Krčmář	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	
Konzultanti:	Smirnou Dzionis	

Název diplomové práce:

Chitosan-glukanový komplex izolovaný ze Schizophyllum commune.

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

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

Bc. Martin Krčmář
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Chitosan-glukanový komplex je kopolymerem hub nacházející uplatnění ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Pro jeho izolaci je tradičně využíváno mycelium rodů *Aspergillus* a *Penicillium*, tedy mikromycet, jejichž biotechnologická produkce je v některých případech nežádoucí. Hlavní myšlenkou této práce je ověřit možnost využití biomasy bazidiomycety *Sch. commune*, která by se po submerzní kultivaci stala zdrojem pro průmyslovou izolaci chitosan-glukanového komplexu.

Tato práce se zabývá vlivem kultivačních podmínek (typ a koncentrace zdroje uhlíku v živné půdě, poměr zdroje uhlíku ke zdroji dusíku, počáteční pH živné půdy a intenzita aerace) na růst biomasy, obsah chitosan-glukanového komplexu a produkci exopolysacharidu Schizophyllanu (SCH) u *Sch. commune* #127. Výsledkem je doporučení postupů vedoucích ke zvýšení obsahu chitosan-glukanového komplexu a potlačení produkce exopolysacharidu.

Práce se následně zabývá izolací chitosan-glukanového komplexu z biomasy *Sch. commune* #127 za pomoci alkalické a kyselé extrakce. Je sledován vliv koncentrace hydroxidu a techniky jeho přidání a typ kyseliny na fyzikální a chemické vlastnosti chitosan-glukanového komplexu. Jsou navrženy analytické metody sloužící k mezioperační kontrole a charakterizaci finálního produktu.

ABSTRACT

Chitosan-glucan complex is fungal origin copolymer that finds application in medicine and cosmetics. Traditionally mycelium of *Aspergillus* and *Penicillium* is considered as industrial chitosan-glucan complex source, though utilization of *Micromycetes* in biotechnological productions is sometimes undesirable. The aim of the work was to study the possibility of *Basidiomycete Schizophyllum commune* submerged cultivation for industrial scale chitosan-glucan complex production use.

Within the work there was studied effect of cultivation conditions (type and concentration of carbon sources in nutrient medium, ratio of carbon source to nitrogen source, medium initial pH and aeration intensity) on *Sch. commune* #127 mycelium growth, chitosan-glucan complex formation and exopolysaccharide synthesis. As the result, the method for chitosan-glucan complex production increase and exopolysaccharide synthesis suppression was suggested.

Chitosan-glucan complex from *Sch. commune* #127 submerged mycelium was separated by successive alkali and acid treatments. Effects of alkali concentration and application technique, and type of acid on physical and chemical properties of chitin-glucan complex were described. Analytical methods for in process control and final product characteristics were suggested.

KLÍČOVÁ SLOVA

Schizophyllum commune, basidiomycety, chitosan-glukanový komplex, submerzní kultivace, deacetylace chitinu

KEY WORDS

Schizophyllum commune, Basidiomycetes, chitosan-glucan complex, submerged cultivation, chitin deacetylation

KRČMÁŘ, M. *Chitosan-glukanový komplex izolovaný ze Schizophyllum commune*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 76 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Jiřina Omelková, 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:

Rád bych poděkoval své vedoucí diplomové práce paní doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. za trpělivost, rady a pomoc při řešení této práce. Dále bych chtěl poděkovat zadavateli této práce RNDr. Vladimíru Velebnému, CSc. za zvolené téma a důvěru v mé řešení. Mé díky patří i konzultantovi diplomové práce Dzionisovi Smirnou, PhD. za odborné rady a pomoc při řešení a volbě experimentů a mé kolegyni Ing. Evě Procházkové za pomoc v laboratoři, také dalším kolegům, se kterými jsem výsledky své práce diskutoval.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. CHARAKTERIZACE, ROZMNOŽOVÁNÍ A DĚLENÍ HUB	8
2.2. SLOŽENÍ BUNĚČNÉ STĚNY HUB	10
2.3. PŘEHLED VÝŽIVOVÝCH POŽADAVKŮ HUB	11
2.4. SUBMERZNÍ KULTIVACE HUB	13
2.4.1. Vzdušnění a míchání	13
2.4.2. Složení média a jeho pH	14
2.4.3. Přídavek rostlinného oleje a mastných kyselin	15
2.4.4. Přídavek dalších látek	15
2.5. CHITIN-GLUKAN V BUNĚČNÉ STĚNĚ HUB	16
2.5.1. Analýza buněčné stěny <i>Schizophyllum commune</i>	16
2.5.2. Buněčná stěna kvasinek	18
2.5.3. Biosyntéza β -(1,3)-glukanů	19
2.5.4. Depolymerizace β -glukanů	21
2.6. IZOLACE CHITIN-GLUKANOVÉHO A CHITOSAN-GLUKANOVÉHO KOMPLEXU	23
2.7. INTERAKCE (1,3)- β -GLUKANŮ A SAVČÍCH BUNĚK	26
2.8. TOXICITA β -GLUKANŮ	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1. PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	30
3.2. CHEMIKÁLIE	30
3.3. POUŽITÝ KMEN	31
3.4. PŘÍPRAVA INOKUL	31
3.5. ŽIVNÁ PŮDA PRO BAŇKY A FERMENTOR	32
3.6. PODMÍNKY POKUSŮ	33
3.7. ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ	33
3.7.1. Stanovení množství exopolysacharidu	33
3.7.2. Výtěžek biomasy	33
3.7.3. Stanovení obsahu sacharosy a glukosy	33
3.8. STANOVENÍ MNOŽSTVÍ IZOLOVATELNÉHO CHITOSAN-GLUKANOVÉHO KOMPLEXU	34
3.9. METODY ANALÝZY CHITOSAN-GLUKANOVÉHO KOMPLEXU	35
3.9.1. Stanovení obsahu sušiny a popela	36
3.9.2. Stanovení pH a vodivosti	36
3.9.3. Stanovení nasákavosti a nasávací mohutnosti	36
3.9.4. Stanovení obsahu dusíku	36
3.9.5. Stanovení obsahu glukosaminu	37
3.9.6. Stanovení deacetylace chitinu, určení poměru glukanu a chitinu/chitosanu	38
3.9.7. NMR analýza vzorků	38
3.9.8. FTIR analýza vzorků	38
3.9.9. Analýza struktury vzorků	39
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	40
4.1. KULTIVACE <i>SCHIZOPHYLLUM COMMUNE</i> ZA ÚČELEM PRODUKCE CHITOSAN- GLUKANOVÉHO KOMPLEXU	40
4.1.1. Testování zdroje uhlíku	41
4.1.2. Testování poměru zdroje dusíku ke zdroji uhlíku	43
4.1.3. Testování počátečního pH živné půdy	44
4.1.4. Vliv délky kultivace na tvorbu CHGK <i>Schizophyllum commune</i> #127	46
4.1.5. Testování intenzity vzdušnění při submerzní kultivaci	46
4.1.6. Závěry testování vlivu kultivačních parametrů na produkci CHGK	50

4.2.	IZOLACE CHITOSAN-GLUKANOVÉHO KOMPLEXU	50
4.2.1.	<i>Testování koncentrace hydroxidu a metody jeho přidání</i>	51
4.2.2.	<i>Testování různých kyselin použitých k extrakci</i>	54
4.2.3.	<i>Závěry testování podmínek izolace produktu</i>	55
4.3.	CHARAKTERIZACE VLASTNOSTÍ IZOLOVANÉHO CHITOSAN-GLUKANOVÉHO KOMPLEXU.....	56
4.3.1.	<i>Vzhled produktu</i>	56
4.3.2.	<i>Sušina vzorků</i>	56
4.3.3.	<i>Obsah popela.....</i>	56
4.3.4.	<i>Měření pH a vodivosti.....</i>	56
4.3.5.	<i>Nasákavost vzorků</i>	57
4.3.6.	<i>Stanovení obsahu dusíku</i>	57
4.3.7.	<i>Obsah glukosaminu ve vzorku</i>	58
4.3.8.	<i>Stanovení deacetylace chitinu, určení poměru glukanu a chitinu/chitosanu.....</i>	58
4.3.9.	<i>NMR analýza vzorků</i>	59
4.3.10.	<i>FTIR analýza vzorků</i>	61
4.3.11.	<i>Analýza struktury vzorků</i>	62
4.3.12.	<i>Shrnutí metod doporučených k charakterizaci produktu</i>	63
5.	ZÁVĚR.....	65
6.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	66
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	76

1. ÚVOD

Využití léčivých vlastností hub má velmi dlouhou tradici zejména v Indii a asijských zemích. První písemné záznamy o jejich léčebných vlastnostech se datují do období kolem roku 3000 před n. l. Dlouhou dobu jsou formou tradiční přírodní medicíny využívány zejména v Japonsku, Koreji, Číně, Rusku a na území dnešních USA a Kanady [1, 2].

Mnohé poznatky o pozitivních vlastnostech hub byly vědecky potvrzeny až ve 20. Století. I přes to, že houby obsahují celou řadu biologicky aktivních látek, pouze glukany upoutaly větší pozornost. Vědecký zájem o tyto biopolymery vznikl na začátku 20. století, kdy byla poprvé popsána schopnost kvasinek inaktivovat sérový komplement, toto vedlo k výzkumu nerozpustných částí buněčných stěn kvasinek, nazvaných zymosan [3, 4]. Později bylo zjištěno, že jeho intravenózní aplikace může aktivovat imunitní systém a stimulovat tak imunitní odpověď [5]. U těchto částic, ačkoli byly složeny z glukánů, mannanů, chitinu, proteinů i lipidů, byl za hlavní biologicky aktivní složku označen právě β -glukan [6].

Dalším výzkumem byly objeveny i jiné biologické účinky polysacharidů hub: imunomodulační, imunostimulační, protinádorové, protizánětlivé, antimikrobiální, antivirové, antioxidační, radioprotekční, hepatoprotektivní a také pozitivní vliv na snížení hladiny cholesterolu a glykémii [7-11].

Mimo výše uvedených vlastností z medicínálního hlediska jsou β -glukany, díky své schopnosti udržet optimální hydrataci pokožky a svými protizánětlivým účinkům, součástí celé řady kosmetických přípravků a jsou aktivní složkou lokálně aplikovaných léčiv urychlujících proces hojení ran [12, 13].

Jejich využití není obecně omezeno pouze na farmaceutické a kosmetické prostředky, ale β -glukany jako např. kurdlan jsou využívány v potravinářství jako gelotvorné činidlo, zahušťovadlo a stabilizátor, zlepšuje vaznost vody a viskoelasticitu, použitelný je také k maskování různých pachů, má schopnost tvořit nerozpustné a biodegradovatelné filmy s dobrými bariérovými vlastnostmi [14]. Jejich význam je také např. v technologii výroby piva, zejména kvůli jejich 0,2 – 1 % obsahu ve sladařském ječmeni, kdy během výrobního procesu dochází k jejich enzymatické hydrolýze za vzniku β -glukanových dextrinů, pokud nejsou dostatečně degradovány, mohou způsobovat problémy při sedimentaci kvasinek, komplikují filtraci, tvoří zákaly a sraženiny a ovlivňují pění [15].

Stejně tak jako β -glukany, je i chitosan vyhledávaným biopolymerem, pro vysoký obsah nukleofilních skupin je využíván např. pro sorpci těžkých kovů z odpadních vod, nebo díky své interakci s negativně nabitými složkami jako jsou kůže anebo vlasy je součástí šamponů a zubních past [16, 17]. Protože je biodegradabilní, biokompatibilní a plně rozpustný v kyselém prostředí, je jeho využití i ve tkáňovém inženýrství a řízení distribuci léčiv [18-20]. Chitosan má díky své polykationické struktuře silnou antibakteriální a antifungální aktivitu, efekt je nejsilnější na gram-pozitivní bakterie, ale může inhibovat i některé gram-negativní bakterie, interaguje se součástí buněčných stěn a ovlivňuje tak permeabilitu [21, 22]. Také díky polykationické struktuře je vynikajícím hemostatickým činidlem [23].

K izolaci chitosan-glukanového komplexu, se v průmyslovém měřítku využívá nejčastěji rodů *Aspergillus* a *Penicillium*, jako odpadní biomasy po izolaci průmyslově nebo farmaceuticky významných látek. Jejich kultivace pouze za účelem zisku biomasy bývá ve farmaceuticky zaměřené firmě problematická už jen z důvodu sporulace a kontaminace výrobních prostor. Cílem této práce je ověřit použití submerzně kultivované basidiomycety *Schizophyllum commune* jako možného zdroje biomasy k izolaci chitosan-glukanového komplexu obsaženého v její buněčné stěně.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Charakterizace, rozmnožování a dělení hub

Houby (Fungi, dříve Mycophyta) představují velkou skupinu živých organismů dříve řazenou k rostlinám, ale nyní taxonomicky vyčleněnou jako samostatnou říši. Její zástupce lze nalézt po celé Zemi. Vyskytují se mezi nimi významní saprofyty, parazité, ale také průmyslově a potravinářsky významné druhy. Mnoho z nich patří mezi symbionty cévnatých rostlin nebo řas [24].

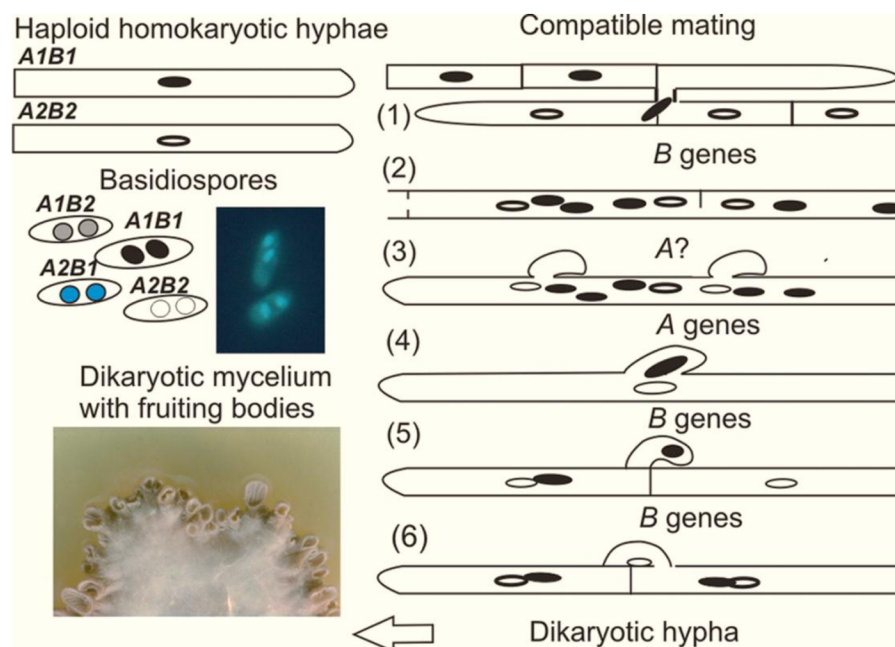
Jako houby byly původně označovány pouze zástupci se zřetelnými plodnicemi, velké dost na to, aby byly viděny pouhým okem a mohly tak být sbírány ručně [25]. Tyto houby představují skupinu 14 – 22 tisíc známých druhů shrnutých v „Dictionary of the Fungi“ [26]. Odhaduje se, že celkový počet druhů může být až 140 tisíc, což by znamenalo, že až 85 % z nich nebylo doposud popsáno [27]. V dnešní době slouží, mimo výživy, především jako cenný zdroj biologicky aktivních látek [28]. Dosud bylo identifikováno a popsáno přinejmenším 270 druhů hub s prokázanými léčebnými účinky, jen asi 25 z nich však našlo komerčního využití [29-31]. Bioaktivní látky produkované různými druhy hub zahrnují sloučeniny se širokými biologickými účinky, přičemž tyto látky mohou být extrahovány z plodnic, mycelia i živné půdy. Tyto sloučeniny jsou odvozeny od terpenoidů, steroidů, fenolů, nukleotidů a jejich derivátů, patří k nim také glykoproteiny a polysacharidy [1, 32].

Houby mohou být charakterizovány jako jednobuněčné a mnohobuněčné heterotrofní organismy, bez chlorofylu, vyživující se saprofyticky nebo paraziticky. Ve svých buňkách postrádají plastidy, a pokud mají barviva, nejsou to fotosyntetické pigmenty. Některé houby žijí v symbióze s autotrofními rostlinami (lišejníky) nebo na kořenech vyšších rostlin (mykorhiza). Stélka hub je u nejjednodušších zástupců nahá a améboidní, u ostatních skupin jsou buňky chráněny buněčnou stěnou. Mikroskopická buněčná vlákna, hyfy, tvoří stélku různé konzistence. Splet' hyf vytváří podhoubí – mycelium, které může po určité době splétat silné provazce, a u některých druhů ztrácejí jednotlivé hyfy svou identitu a tvoří složitější rizomofní provazce. Na nich je patrná např. silná „kůra“ odolná proti nepříznivým vlivům. Hyfy saprofytických hub získávají živiny extracelulárním rozkladem odumřelých rostlinných a živočišných tkání, dostávají se do těsného styku s živným substrátem a k sorpci živin slouží buněčné stěny. Mycelium parazitických hub roste na povrchu nebo uvnitř hostitele a zde žije v mezibuněčných prostorách anebo proniká do nitra buněk. Intercelulární hyfy získávají výživu pomocí haustorií, vytvářených uvnitř buněk hostitele. Houbové hyfy sekretují do prostředí látky, mimo jiné i enzymy, kterými rozkládají složky potravy, které jsou následně pohlceny buňkami [33].

Rozmnožování hub je pohlavní a nepohlavní. Nepohlavní rozmnožování je velmi časté a u některých druhů převládá, během vegetačního období se může i několikrát opakovat. Při nepohlavním rozmnožování se tvoří specializované rozmnožovací buňky anebo části mycelia. Rozlišuje se několik způsobů: a) fragmentace mycelia b) dělení somatických buněk stélky na dceřiné c) pučení somatických buněk nebo spor a d) tvorba spor – četné houby v průběhu vegetační sezóny tvoří jen jeden typ spor, u mnohých je známo až čtyři i pět typů spor. Spory vznikají buď endogenně ve sporangiích (sporangiofory) nebo exogenně na hyfách, případně na speciálních útvarech – konidioforech. U nižších hub, především těch žijících na silně vlhkých až mokřých substrátech, jsou spory obvykle pohyblivé a nazývají se zoospory, u suchozemských hub jsou spory opatřeny buněčnou stěnou a jsou nepohyblivé, nazývají se aplanospory. Při pohlavním rozmnožování hub kopulují gamety (isogamie, anisogamie, oogamie) anebo celá gametangia (gametangiogamie). Pro pohlavní rozmnožování je charakteristické splývání dvou pohlavně různých jader a následující

meióza. Při tomto procesu nastává nejdříve spojení dvou protoplastů a přiblížení jader uvnitř buňky (plasmogamie). Určitým typem pohlavního procesu je splývání protoplastů dvou buněk mycelia, které jsou tvarově rozlišeny (somatogamie), tento způsob se vyskytuje u nejméně organizovaných hub. Splývání jader (karyogamie) následuje zejména u nižších hub téměř bezprostředně po plasmogamii. U vyšších hub jsou tyto procesy prostorově i časově oddálené. Po plasmogamii se k sobě přiblíží haploidní jádra, která se samostatně dělí a přemísťují se do dceřiných buněk, tak dochází k období dikaryofáze. Teprve později dochází ke karyogamii a k meióze, kdy se počet chromosomů redukuje opět na polovinu. Pokud k pohlavnímu rozmnožování stačí jedna stélka, jsou tyto druhy nazývány monotalickými (oboupohlavními) a mycelium, které vyrostlo z jedné spory pak obsahuje jádra obou pohlaví. Jestliže je k rozmnožování potřeba dvou kompatibilních typů stélek, pak jsou tyto druhy nazývány heterotalickými (jednoplavními), mycelium které vyrostlo z jedné spory poté obsahuje jen jádra jednoho pohlaví. Na stejném jedinci se mohou vyskytovat pohlavní orgány samčí i samičí, pokud jsou diferencovány, ale mezi nimi je inkompabilita [34-36].

Schématické znázornění vzniku dikaryotického mycelia *Schizophyllum commune* je na obrázku 1:



Obrázek 1 Životní cyklus *Schizophyllum commune*. Po přiblížení dvou haploidních homokaryotických hyf dochází v případě kompatibility k jejich splnutí a stěhování jader (1). Důsledkem migrace jader je vznik multijaderné hyfy vyskytující se v zóně interakce (2). Dochází k párování jader a tvorbě přezek (3). Po oddělení jader (4) je přehrazena jak přezka, tak hyfa (5). Pokračuje růst přezky směrem k následující přehradce a jejich spojení (6). Jádro s přezky přechází do přepážky za vzniku dikaryotického mycelia [37].

Schizophyllum commune

Čeď klanolístkovité (Schizophyllaceae) obsahuje jen jeden rod; *Schizophyllum*, který je zcela běžný a celosvětově rozšířený. Jedná se o dřevokaznou houbu s nezaměnitelným vzhledem. Je identifikovatelná především díky zvláštní struktuře podobné žábrům (lupínky), která během nepříznivých klimatických podmínek pokrývá rouško-palisádovitě uspořádanou vrstvu basidií. Tato silná struktura se podélně rozštěpuje s oběma okraji silně zvrásněnými [38], obrázek 2:



Obrázek 2 *Schizophyllum commune* [39]

Pro taxonomické zařazení hub existuje celá řada doporučení a také jejich dělení se od tříd dolů stále ještě mění a dochází nejen k přeřazování z jednoho rodu do druhého, ale i z jedné fylogenetické větve do jiné. Dříve se houby do taxonů řadily hlavně díky popisu plodnic, později i spor a mycelia. S rozvojem moderních molekulárně-genetických metod se dnes využívá především porovnávání DNA [40].

Taxonomické zařazení *Schizophyllum commune* podle „Dictionary of the fungi“ [41]:

Říše: Fungi (houby)

Kmen: Basidiomycota (stopkovýtrusné)

Třída: Agaricomycetes (stopkovýtrusé)

Podtřída: Agaricomycetidae (rouškaté)

Řád: Agaricales (pečárkovité)

Čeleď: Schizophyllaceae (klanolístkovité)

Druh: *Schizophyllum commune* Fr. (Klanolístka obecná)

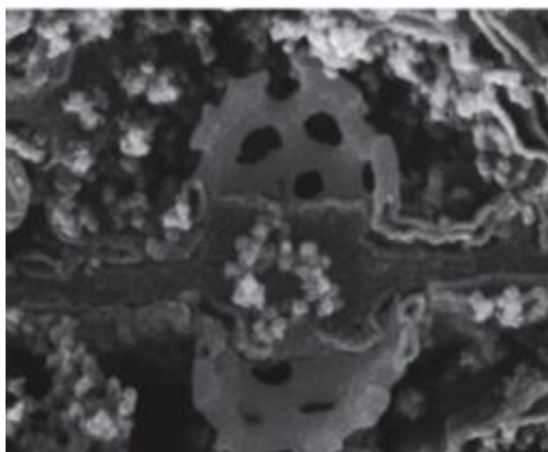
2.2. Složení buněčné stěny hub

Strukturální analýza buněčných stěn hub odhalila komplexní vláknitou síť. Buněčné stěny jsou tvořeny různými polysacharidy, jejich složení je různé u zástupců nižších a vyšších hub. Hlavní složkou jsou nejčastěji chitin a hemicelulózy, obsaženy mohou být i další složky jako jsou proteiny a glykoproteiny, jejich přehled je v tabulce 1. Semikrystalická a mikrofibrilární struktura těchto polysacharidických složek je organizována do matrice ve středu buněčné stěny a je ukotvena takzvanou amorfni matrix, která tvoří vrstvenou strukturu. Propojení těchto dvou hlavních složek buněčné stěny hub ji poskytuje pružnost a pevnost. Toto znamená, že buněčná stěna hub není jen rigidní strukturou, právě naopak, struktura je dynamická a umožňuje značné kvantitativní i kvalitativní změny jak mezi různými druhy, také mezi různými morfologickými formami stejného druhu, např. vlivem stresu nebo během vývoje. Hyfy vyšších hub rostou ve zkřížených útvarech a jednotlivé buňky jsou odděleny septy, která mohou být u některých zástupců perforovaná a umožňují tak komunikaci cytoplazmy, i protoplazmy, mezi jednotlivými úseky [42].

Tabulka 1 Hlavní polymery nacházející se v buněčných stěnách různých hub [42]

	Fibrilární polymery	Matricové polymery	Perforovaná septa
Oomycety	β -(1,3), β -(1,6)-glukan, celulóza	Glukan	Nepřítomna
Chytridiomycety	Chitin; glukan	Glukan	Nepřítomna
Zygomycety	Chitin; chitosan	Polyglukuronová kyselina; glukuronomannoproteiny	Nepřítomna
Askomycety	Chitin; β -(1,3), β -(1,6)-glukan	α -(1,3)-glukan; galaktomannoproteiny	Přítomna
Basidiomycety	Chitin; β -(1,3), β -(1,6)-glukan	α -(1,3)-glukan; xylomannoproteiny	Přítomna
Deuteromycety	Chitin; β -(1,3), β -(1,6)-glukan	α -(1,3)-glukan; galaktomannoproteiny	Přítomna

Mycelium hub jako např. glomeromycet, zygomycet a chytridiomycet je řídké, pokud vůbec, přepážkované [43]. Na rozdíl od toho hyfy hub jako např. askomycet a basidiomycet jsou pravidelně přehrádkovaná septa, která obsahují póry (50 – 500 nm), tyto dovolují proudění nejen cytoplasmy, ale i organel (např. mitochondrií) [44]. Komunikace cytoplasmy přes tyto velké póry (dolipóry) odlišuje významně vyšší houby od rostlin a živočichů. Plasmodesmata živočišných buněk obsahují póry průměru 1,5 – 3 nm, které dovolí proudění maximálně iontům a malým organickým molekulám [45]. U rouškatých hub, mezi které patří *Schizophyllum commune*, mají dolipóry soudkovitý tvar. Bylo zjištěno, že stěna septa neobsahuje, na rozdíl od buněčné stěny, α -(1,3)-glukany, ale pouze chitin a β -(1,3)/ β -(1,6)-glukan [46, 47]. Dolipóra basidiomycet, v případě *Schizophyllum commune*, je kryta membránou s průměrem 450 – 600 nm zobrazenou v mikrofotografii (Obrázek 3), ta obsahuje několik perforací s průměrem kolem 100 nm. Tyto menší otvory zamezují jednak stěhování jádra a jiných organel přes septa mezi přepážkami, ale mohou být podle potřeby uzavřeny např. v odpovědi na poškození hyf, aby se zabránilo ztrátám cytoplasmy [46, 48].

**Obrázek 3** Mikrofotografie dolipóry *Schizophyllum commune* kryté perforovanou membránou [46]

2.3. Přehled výživových požadavků hub

Jako každý jiný organismus, potřebují také houby ke svému optimálnímu růstu a vývoji přísun živin a esenciálních prvků, jak je přehledně uvedeno v tabulce 2. Tyto prvky hrají důležitou úlohu v energetickém metabolismu, převodu a uchování energie, regulaci enzymové aktivity, transmembránových procesech, biosyntéze důležitých intermediátů a produktů metabolismu a jsou také nedílnou součástí buněčné stěny. Jejich nedostatek se

mnohdy projeví jako limitující faktor růstu. Vliv základních složek na růst a produkci metabolitů bude diskutován dále [42].

Tabulka 2 Přehled esenciálních prvků potřebných pro správnou funkci buněk hub [42]

Prvek	Zdroj	Funkce v buňce hub
Uhlík	Sacharidy	Strukturální prvek buněk, zdroj energie.
Vodík	Protony z kyselin	Důležitý pro transmembránový transport živin. Intracelulární kyselé pH (5-6) důležité pro metabolismus.
Kyslík	Vzduch	Substrát oxidačních enzymů. Důležitý pro biosyntézu ergosterolu a nenasycených mastných kyselin.
Dusík	Amonné soli, močovina, aminokyseliny	Strukturální a funkční složka přítomná jako aminodusík protein a enzymů.
Fosfor	Fosfáty	Převod energie, složka nukleových kyselin a membránových struktur.
Draslík	Draselné soli	Iontová rovnováha, enzymová aktivita.
Hořčík	Hořečnaté soli	Enzymová aktivita, struktura buněk a organel.
Síra	Sírany, metionin	Sírné aminokyseliny a vitamíny.
Vápník	Vápenaté soli	Sekundární posel převedení signálů.
Měď	Měďnaté soli	Redoxní pigmenty.
Železo	Železité soli	Hemové proteiny, cytochromy.
Mangan	Manganaté soli	Enzymová aktivita.
Zinek	Zinečnaté soli	Enzymová aktivita.
Nikl	Nikelnaté soli	Ureázová aktivita.
Molybden	Molybdenany	Metabolismus dusíkatých látek, vitamín B ₁₂ .

Celá řada kvasinek a vláknitých hub je schopna využít různé sacharidické substráty [49], jak je uvedeno v tabulce 3:

Tabulka 3 Rozdílnost sacharidických zdrojů uhlíku potřebných pro růst kvasinek a vláknitých hub [49]

Zdroj uhlíku	Příklad	Komentář
Hexosy	D-glukosa, D-galaktosa, D-fruktosa, D-mannosa	Glukosa je metabolizována většinou kvasinek a vláknitých hub. Pokud kvasinka neutilizuje glukosu, často neutilizuje ani jiné sacharidy. Pokud využívá glukosu, často využívá i fruktosu a mannosu, nevyhnutelně galaktosu.
Pentosy	L-arabinosa, D-xyloza, L-rhamnosa	Mnoho hub využívá pentosy lépe než glukosu.
Disacharidy	Maltosa, sacharosa, laktosa, trehalosa, celobiosa	Pokud kvasinka využívá maltosu, často neutilizuje laktosu a naopak. Mnoho kvasinek využívá disacharidy, některé vláknité houby neutilizují sacharosu.
Trisacharidy	Rafinosa, maltotriosa	Rafinosu částečně využívá <i>S. cerevisiae</i> .
Oligosacharidy	Maltodextriny	Metabolizovány amylolytickými kvasinkami.
Polysacharidy	Škrob, inulin, celulóza, hemicelulóza, chitin, pektiny	Polysacharidy fermentující kvasinky jsou ojedinělé, některé druhy využívají rozpustný škrob. Mnoho vláknitých hub může polysacharidy využít díky produkci extracelulárních enzymů.

2.4. Submerzní kultivace hub

Klasické solid state kultivace byly vyvíjeny ve východních zemích během mnoha staletí a široké aplikace a zájmu se těší dodnes. Naopak v západních zemích tato technika musela soutěžit se submerzní kultivací, kvůli rostoucímu tlaku racionalizace a normalizace procesů, ji submerzní kultivace po roce 1940 nahradila. V dnešní době je solid state kultivace výhodná zejména pro produkci potravin, protože má nižší náklady [50]. Solid state kultivace přináší řadu stavebně-technologických problémů kvůli požadavkům na udržení teploty, pH, pO_2 , vlhkosti substrátu. Existují však i nezanedbatelné výhody, které mohou zvýhodnit solid state kultivace narušením od submerzní kultivace: Vyšší produktivita fermentace, vyšší konečná koncentrace produktů a vyšší stabilita, nižší katabolická represe, kultivace specializované pro výrobu produktů z vodonepropustných substrátů a v neposlední řadě nižší požadavek na sterilitu díky nízké vodní aktivitě použití v solid state kultivacích [51]. Při kultivacích vláknitých hub je průmyslově více využíváno submerzní kultivace, protože u produktů vylučovaných do prostředí je výhodnější a je dosahováno vyšších výtěžků, s výhodou je možná regulace hodnoty pH během kultivace, další výhodou je možnost jejího využití k simultánní produkci biologicky aktivních látek [49].

2.4.1. Vzdušnění a míchání

Množství kyslíku ovlivňuje buněčný růst, morfologii, příjem živin a biosyntézu metabolitů. Při kultivacích *Ganoderma lucidum* v míchaném fermentoru bylo zjištěno, že velikost saturace média vzduchem, resp. kyslíkem, má velký vliv na produkci extra- i intracelulárních metabolitů. Byly nastaveny různé podmínky vzdušné saturace: 10 % a 25 %. Experimentálně bylo zjištěno, že buněčný růst byl při saturaci 10 % znatelně pomalejší, kdy po 4 dni se růst takřka zastavil a dosáhl maxima 4,1 g/L suché biomasy, při saturaci 25 % byla rychlost růstu znatelně vyšší, nárůst množství biomasy byl pozorován až do maxima v 10 dnech (14,7 g/L). Byl pozorován vliv na produkci extra- i intracelulárních metabolitů, kdy oba typy metabolitů byly více produkovány při nižší nastavené saturaci, u intracelulárních metabolitů byl ovšem celkový výtěžek vyšší při vyšších hodnotách saturace díky znatelně vyššímu množství biomasy. Dále byl sledován vliv hydrodynamického smykového napětí, byly zvoleny takové podmínky, aby saturace vzduchem byla udržována na 25 %. Obvodová rychlost míchadla byla nastavena od 0,53 – 1,53 m/s, množství biomasy bylo při nejnižší smykové rychlosti v maximu 13,8 g/L, v nejvyšší rychlosti 10,6 g/L. Tyto výsledky signalizují, že vyšší smykové rychlosti potlačují buněčný růst. Během pokusů se měnila také velikost pelet, nízké smykové rychlosti umožnily vznik větších pelet, naopak vysoké smykové rychlosti znamenaly tvorbu malých pelet s krátkým myceliem. Toto mělo vliv i na produkci intra- a extracelulárních metabolitů, pro intracelulární metabolity byly příznivější nižší smykové rychlosti, u extracelulárních metabolitů nebyl vliv pozorován [52].

Vliv míry aerace a rychlosti otáček míchadla na produkci exopolysacharidu a množství biomasy byl sledován při submerzní kultivaci *Paecilomyces sinclairii* ve fermentoru se šesti Rushton turbínami. Byl sledován vliv vzdušnění (0,5 – 3,5 vvm) a míchání (50 – 250 rpm). Výsledky ukazují přímou závislost mezi aerací a množstvím izolované biomasy: 14,15 g/L při 0,5 vvm, 17,15 g/L při 1,5 vvm a 44,9 g/L při 3,5 vvm. Produkce exopolysacharidu byla s vyšším vzdušněním také vyšší (4,46 g/L; 8 g/L a 10,89 g/L). Zdroj uhlíku byl vyčerpán shodně po 14 dnech kultivace. Množství rozpuštěného kyslíku se snížilo z původních 100 % na začátku kultivace na 0 – 10 %: 2 den kultivace při nejnižším vzdušnění; 5 den při obou vyšších vzdušněních. Při nižším vzdušnění byla pozorována malá délka hyf a hustota pelet, která stoupala úměrně s rostoucím vzdušněním. Při testování vlivu rychlosti míchadla byl vliv na množství produkované biomasy následující: 23,35 g/L při 50 rpm, 30,4 g/L při 150 rpm a 30,5 g/L při 250 rpm. Ve všech případech se hladina rozpuštěného kyslíku z původních

100 % snížila během 3 – 4 dnů kultivace na 5 – 10 %. Vliv na produkci exopolysacharidu odpovídal vlivu na množství biomasy (7,75 g/L; 10,75 g/L a 11,5 g/L). Velikost otáček míchadla měla zásadní vliv na velikost pelet. Při vyšších rychlostech otáček míchadla byly pozorovány menší pelety [53].

2.4.2. Složení média a jeho pH

U submerzní kultivace *Phellinus linteus* KCKC 6190 byl sledován vliv počátečního pH živné půdy, zdroje uhlíku a dusíku na množství biomasy a produkovaného exopolysacharidu. Bylo testováno celkem 9 různých zdrojů uhlíku v koncentraci 1 hmotnostní %, nejlepším pro produkci biomasy se jeví použití sorbitolu (3,83 g/L), následované fruktózou (3,39 g/L), laktosou (3,1 g/L) a maltosou (3,0 g/L), protože cena hraje v průmyslovém měřítku důležitou roli, jeví se nejlepší použití sacharosy s výtěžkem biomasy 2,78 g/L, jako nejlepší byla dále ověřena její koncentrace v médiu 50 g/L. Jako zdroje dusíku byly testovány jak organické zdroje, tak anorganické soli. Maximálního výtěžku biomasy bylo dosaženo při použití organických zdrojů: kukuřičného výluhu (5,72 g/L) a sladového extraktu (3,05 g/L), z anorganických zdrojů byl nejvhodnější dusičnan sodný (2,09 g/L). Nejhorším byl maso-peptonový bujón (0,5 g/L) a chlorid amonný (0,61 g/L). Pro kukuřičný výluh byla následně určena optimální koncentrace 3 g/L. Pro růst biomasy se ukázalo jako optimální výchozí pH živné půdy 7,0, pro produkci extracelulárního polysacharidu pH 5,0 [54].

Vliv zdroje uhlíku, dusíku a výchozího pH živné půdy na produkci biomasy a množství a aktivitu exopolysacharidu bylo sledováno i u submerzní kultivace *Flammulina velutipes*. Při sledování vlivu zdroje uhlíku byla jeho koncentrace v médiu 15 g/L, produkované množství biomasy ukazuje tento trend: fruktosa (4,6 g/L) > manitol > škrob > sacharosa (2,9 g/L) = glukosa > galaktosa > laktosa (1,1 g/L). Pro produkci exopolysacharidu a jeho antikomplementovou aktivitu: galaktosa > laktosa > fruktosa > glukosa > manitol > sacharosa > škrob. Výsledky ukazují, že monosacharidy byly lepším zdrojem uhlíku pro produkci biomasy než disacharidy a polysacharidy. Ovšem aktivita exopolysacharidu byla signifikantně vyšší v případě galaktosy a laktosy jako uhlíkového zdroje. Nejvhodnější anorganický zdroj dusíku (5 g/L) byl testován při použití galaktosy jako zdroje uhlíku (15 g/L), jako nejvhodnější pro tvorbu biomasy se ukázalo být použití $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ (3,9 g/L), následované NaNO_3 (2,81 g/L) a KNO_3 (2,79 g/L). Při testování počáteční hodnoty pH živné půdy (rozmezí 3,5 – 7,5) byl nejvyšší nárůst biomasy v oblasti pH 4,5 – 5,5 s nejvyšší aktivitou exopolysacharidu při pH 5,5 [55].

U divokých kmenů *Schizophyllum commune* z různých oblastí Číny a Koreje byly sledovány různé kultivační podmínky (teplota, pH), zdroj uhlíku a dusíku v živné půdě. Bylo testováno celkem 12 různých kmenů a byla sledována rychlost růstu na agarových miskách (nárůst v mm). Jako nejlepší se ukázala teplota 30 °C. Při testování pH živné půdy byl testován rozsah pH 5 -9, kdy obecně v krajních hodnotách byla rychlost růstu nejnižší, růst klesal se zvyšující se hodnotou pH, tedy pro růst mycelia bylo výhodné slabě kyselé pH. Bylo testováno několik zdrojů uhlíku, nejlepšího růstu bylo dosaženo na dextrinu, následovaném fruktózou, sacharosou a glukosou, nejnižší růst byl naopak pozorován na laktose. Ze zdrojů dusíku se ukázal jako nejlepší dusičnan vápenatý, následovaný glycinem a dusičnanem draselným, naopak nejnižší růst byl pozorován na fosforečnanu amonném a histidinu [56].

Další houbou, u které byla provedena optimalizace složení média pro submerzní kultivaci, byl *Agaricus brasiliensis*. Jako zdroj uhlíku, v koncentraci 10 g/L, se ukázala být nejvhodnější, vzhledem k množství produkované biomasy, sacharosa (4,97 g/L), následovaná glukosou (4,91 g/L), škrobem (4,38 g/L), fruktózou (4,17 g/L) a laktosou (3,48 g/L). Dále byl testován vliv koncentrace KH_2PO_4 (0 – 5 g/L), kdy nejlepší pro produkci biomasy byla

koncentrace 2 g/L (maximum; 5,41 g/L), následovaná 3 g/L (5,35 g/L). Přídavek vitamínu B₁ ukázal maximum produkce biomasy při 10 mg/L (5,17 g/L) [57].

2.4.3. Přídavek rostlinného oleje a mastných kyselin

Byl popsán vliv přidavku oleje na produkci exopolysacharidu a množství biomasy při 7 a 14 denní submerzní kultivaci *Schizophyllum commune*. Experiment byl proveden na médiu obsahujícím 1 g/L peptonu, 2 g/L kvasničného extraktu, 1 g/L K₂HPO₄, 0,2 g/L MgSO₄·7H₂O, 5 g/L (NH₄)₂SO₄ a 20 g/L glukosy, výchozí pH média 6,0. Olej měl funkci odpěňovacího činidla a byl sledován jeho přídavek 0,1 – 1 %. Byl studován přídavek olivového, ricinového a pepermintového oleje. Výsledky ukázaly, že při vyšší koncentraci ricinového a olivového oleje byl zvýšen micelární růst, naopak se stoupající koncentrací mátového oleje růst klesal. Nejvyšší nárůst biomasy byl u přidavku 1 % olivového oleje po 14 dnech kultivace (8,2 g/L). Nárůst biomasy s rostoucím přidavkem oleje může být zapříčiněn částečným zabudováním lipidů do buněčné membrány a tedy i usnadněným příjmem živin z média. Produkce extracelulárního polysacharidu byla významně potlačena všemi oleji v koncentraci 1 %, nejvyšší koncentrace (5 g/L) byla dosažena přidavkem 0,5 % ricinového oleje, naopak nejnižší (1,6 g/L) byla dosažena přidavkem 0,1 % olivového oleje. Tato studie ukazuje, že různé mastné kyseliny obsažené v různých koncentracích v olejích budou hrát pravděpodobně významnou roli v produkci polysacharidů [58].

Vliv přidavku rostlinného oleje a mastných kyselin na růst biomasy a produkci polysacharidů byl popsán u *Ganoderma lucidum* při kultivacích v třepaných baňkách při použití tohoto média: 50 g/L glukosa, 0,5 g/L K₂HPO₄, 0,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 g/L kvasničného extraktu a 4 g/L NH₄Cl. Výsledky ukazují, že všechny použité rostlinné oleje vykazovaly v koncentraci 1 % pozitivní vliv na množství produkované biomasy. Nejlepší variantou se jevílo použití olivového oleje, kdy množství biomasy oproti kontrole stoupl o 2 g/L až na 3,3 g/L, ostatní oleje měly tento vliv: sójový (2,32 g/L), arašídový (2,56 g/L), světlíkový (2,78 g/L), kukuřičný (3,06 g/L) a slunečnicový (2,94 g/L). Produkce exopolysacharidu nebyla přidavkem různých olejů signifikantně ovlivněna a pohybovala se mezi 0,44 – 0,65 g/L. Přídavek vyšší koncentrace oleje vedl jak k inhibici růstu biomasy, tak snížení produkce polysacharidu. Při sledování přidavku mastné kyseliny na produkci biomasy se ukázal pozitivní vliv kyseliny palmitové, olejové a stearové; jako nejlepší se jevil přídavek 1,5 g/L kyseliny olejové, kdy byl nárůst množství biomasy z 2 g/L na 4,6 g/L. V kontrastu s tím, při přidavku 1 g/L a vyšším kyseliny linolenové došlo k drastickému potlačení růstu mycelia a v baňce nebyla po 7 denní kultivaci žádná biomasa. Toto ukazuje na pravděpodobnou závislost stupně nasycení mastné kyseliny na růst mycelia. Lze tím také vysvětlit pozitivní vliv olivového oleje, jehož hlavní složkou je právě kyselina olejová [59].

2.4.4. Přídavek dalších látek

U kultivace *Schizophyllum commune* byl testován vliv různých látek s cílem najít optimální složky pro zvýšení růstu biomasy i produkci exopolysacharidu. Složení média: 30 g/L glukosy, 10 g/L prášku ze sojových bobů, 0,5 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 g/L K₂HPO₄ a 0,01 g/L vitamínu B₁, pH média 6,0. Karboxymethylcelulosa, která měla sloužit jako povrchově aktivní látka ovlivňující saturaci média kyslíkem, byla testována v koncentraci 0,2 – 1 %; maximum produkce bylo nalezeno při přidavku 0,6 %, obsah biomasy byl 21,35 g/L, tedy o 19,14 % vyšší než kontrola. Další látkou, při koncentraci 0,5 – 2 mg/L, byla kyselina L-glutamová; maxima bylo dosaženo při přidavku 1 mg/L, kdy množství biomasy 20,51 g/L bylo proti kontrole vyšší o 10,21 %. Přídavek thiaminu (vitamínu B₁), při koncentraci 0,5 – 2,5 mg/L, dosáhl maxima při 0,5 mg/L, kdy množství biomasy 14,33 g/L znamenalo nárůst proti kontrole o 29,62 %. Přídavek kyseliny naftalenocetové, při koncentraci 0 – 0,5 %, znamenalo

maximum v koncentraci 0,2 %, kdy výtěžek biomasy 16,44 g/L znamenal proti kontrole nárůst o 56,04 %. Přídavek kyseliny olejové, při koncentraci 0,1 – 0,5 %, ukázal maximální vliv při přídavku 0,1 % s množstvím izolované biomasy 17,98 g/L, toto znamenalo 56,89 % nárůst proti kontrole. Poslední sledovanou látkou byl přídavek tenzidu Tween 80, při koncentraci 2 – 8 mL/L, maximum růstu při 6 mL/L znamenalo izolaci 23,56 g/L biomasy, tedy nárůst oproti kontrole o 43,24 %. Následně kombinace nejlepších parametrů (0,1 % olejové kyseliny, 0,5 mg/L vitamínu B₁ a 6 mL/L Tween 80) byla ověřena při kultivaci ve fermentoru objemu 7 litrů, zde bylo po 6 dnech kultivace dosaženo výtěžku 19,83 g/L biomasy, tento výtěžek znamenal nárůst oproti kontrole o 22,16 % [60].

2.5. Chitin-glukan v buněčné stěně hub

Chitin-glukanový komplex je součástí buněčné stěny hub, β -glukany jsou kovaletně vázány s chitinem, homopolymerem *N*-acetyl-D-glukosaminu propojeném vazbami β -(1,4)-. Tyto dva vodone rozpustné polymery poskytují buněčné stěně pevnost. U různých zástupců kvasinek a hub je rozdíl ve stupni zesílení mezi β -glukany a chitinem, toto pak v důsledku vede k tomu, že při izolaci jsou získány produkty s různým poměrem těchto složek [61]. Např. odpadní mycelium *Aspergillus niger* při produkci kyseliny citronové obsahuje chitin-glukan s obsahem až 40 % chitinu. Tento komplex může být solubilizován ve vodném prostředí po karboxymethylaci a sulfoethylaci a dvě nízkomolekulární frakce mohou být připraveny působením ultrazvuku. Vzniklé produkty měly radioprotektivní a antimutagenní účinky [62-64].

2.5.1. Analýza buněčné stěny *Schizophyllum commune*

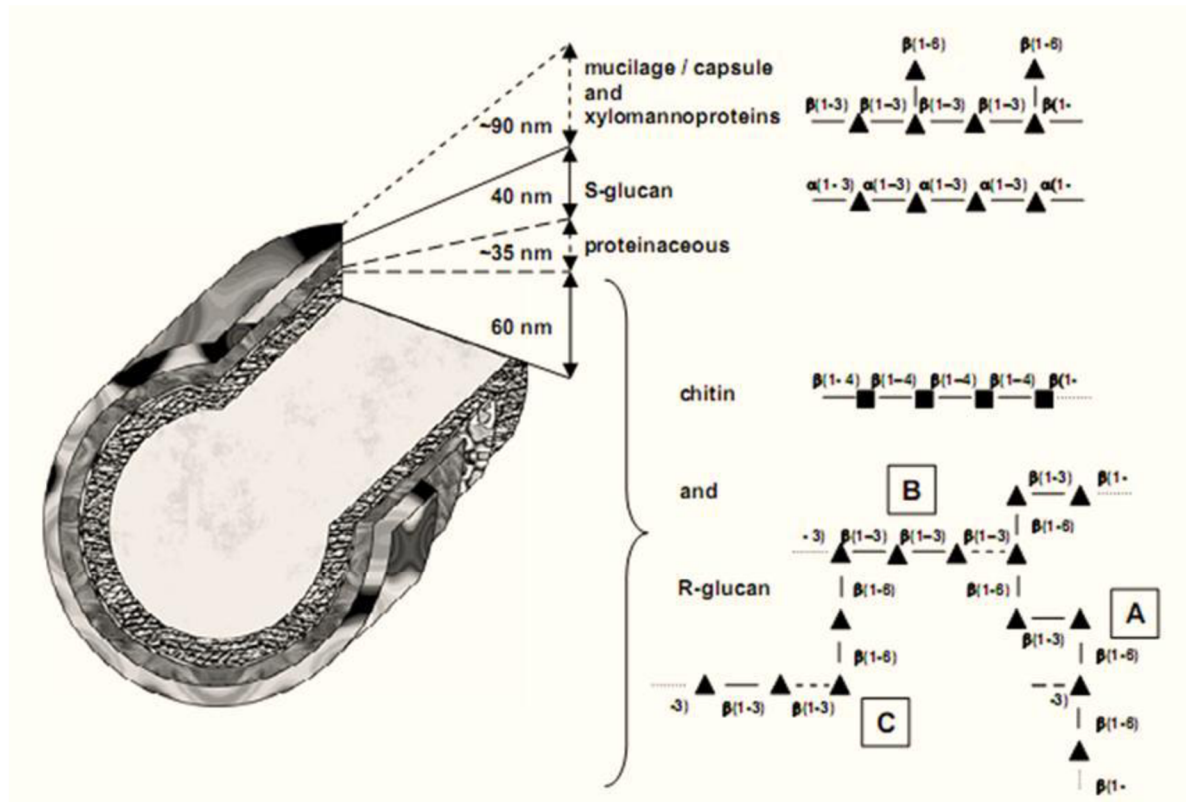
Studie ukazuje, že buněčná stěna je z velké části složena z glukánů a v menší míře chitinu. Vodone rozpustné glukany mohou být dále separovány na základě jejich rozpustnosti v alkalickém prostředí. Alkalicky rozpustné glukany (S-glukany) se častěji nachází na vnější straně buněčné stěny jako mikrokrytalická vrstva složená z α -(1,3)-glukanu. Nerozpustný podíl buněčné stěny je složen z komplexní struktury glukánů vázaných β -(1,3)- a β -(1,6)-vazbami (R-glukan) a chitinem. Analýza byla provedena na S-glukanu a frakcionovaném R-glukanu (HCl rozpustný podíl, NaOH rozpustný podíl zbytku po štěpení HCl a nerozpustný zbytek). Jednotlivé vzorky byly dále štěpeny *exo*- β -(1,3)-glukanázou [65]. Výsledky analýz jsou uvedeny v tabulce 4:

Tabulka 4 Složení buněčné stěny *Schizophyllum commune* po hydrolyze frakcí S- a R- glukánů [65]

Složka	Buněčná stěna (%)	Alkalicky rozpustná frakce		Alkalicky nerozpustná frakce	
		v sušině (%)	v buněčné stěně (%)	v sušině (%)	v buněčné stěně (%)
V sušině	-	-	28,1	-	57,5
Glukosa (-H ₂ O)	67,6	77,7	32,9	67,9	57,7
Manosa (-H ₂ O)	3,4	12,1	100	-	-
Xylosa (-H ₂ O)	0,2	0,7	100	-	-
Acetylhexosamin (-H ₂ O)	12,5	0,2	0,1	22,2	102,1
Aminokyseliny	6,4	2,2	3,0	9,2	88,8
Lipidy (volné)	1	-	-	-	-
Lipidy (vázané)	2	-	-	-	-
Celkem	93,1	92,9	-	99,8	-

Z výsledků těchto analýz je patrné, že mimo sacharidů obsahuje buněčná stěna, respektive oba podíly glukánů, vázané aminokyseliny. V buněčné stěně je přítomno i menší množství vázaných a volných lipidů [65].

Vývoji plodnic předchází nahromadění hyf zprostředkované povrchovými vlastnostmi účastnících se buněk. Tyto vlastnosti jsou dány jednak složením buněčné stěny, tak složením povrchových vrstev. Použitím specifických hydroláz, proteáz a alkálií se podařilo demonstrovat složení, tloušťku a pořadí jednotlivých vrstev v ultrastruktuře buněčné stěny hyf *Schizophyllum commune* za pomoci elektronového mikroskopu (Obrázek 4). Pro basidiomycety jsou typické dva základní typy strukturních polymerů: chitin a β -glukan. Další součástí vnějších vrstev jsou xylo-/galakto-/mannoproteiny a α -(1,3)-glukany [66].



Obrázek 4 Struktura vrstev buněčné stěny *Schizophyllum commune*. Nejspodnější vrstva, přiléhající k plazmatické membráně se skládá z R-glukan/chitosanového komplexu, následovaná vrstvou bílkovinného materiálu. Tato vrstva je pokryta vrstvou alkalicky rozpustného S-glukanu. Na povrchu je slizovitá vrstva tvořená vodorozpustným Schizophyllumem a xylomannoproteiny. Symbol ▲ symbolizuje glukosu a ■ N-acetylglukosamin. (A) představuje smíšené spojení β -glukanu s možnou vazbou k chitinu (B) naznačuje možné křížené spojení s (C) krátkými β -(1,3)-řetězci (s různou délkou) napojenými na β -(1,6)-postranní řetězce, které mohou být propojeny s řetězci (A) [159].

Proteiny, obsažené v buněčných stěnách, jsou známy tím, že jsou kovalentně vázány s β -(1,3)-glukany a mohou být proto považovány za jejich integrální součást. Alkalicky rozpustné glukany se nachází především pod vodorozpustným slizem, ale mohou být součástí i dalších vrstev buněčné stěny. Alkalicky nerozpustný glukan, strukturně a větvením podobný kapsulárnímu polysacharidu, je funkčně velmi rozdílný a je omezen na oblast bohatou na chitin, tedy vrstvu nad plazmatickou membránou. Tyto β -(1,3;1,6)-glukany jsou přítomny jednak jako individuální polymery uvnitř na chitin bohaté vrstvy, kde jsou kovalentně propojeny nejen k sobě vzájemně, ale i k chitinu. Existuje předpoklad, že prekurzory těchto stěnových fibrilárních polymerů jsou tvořeny na rostoucím konci hyfy ještě jako alkalicky rozpustné glukany, následně dochází k prodlužování řetězců, stávají se rozvětvenými

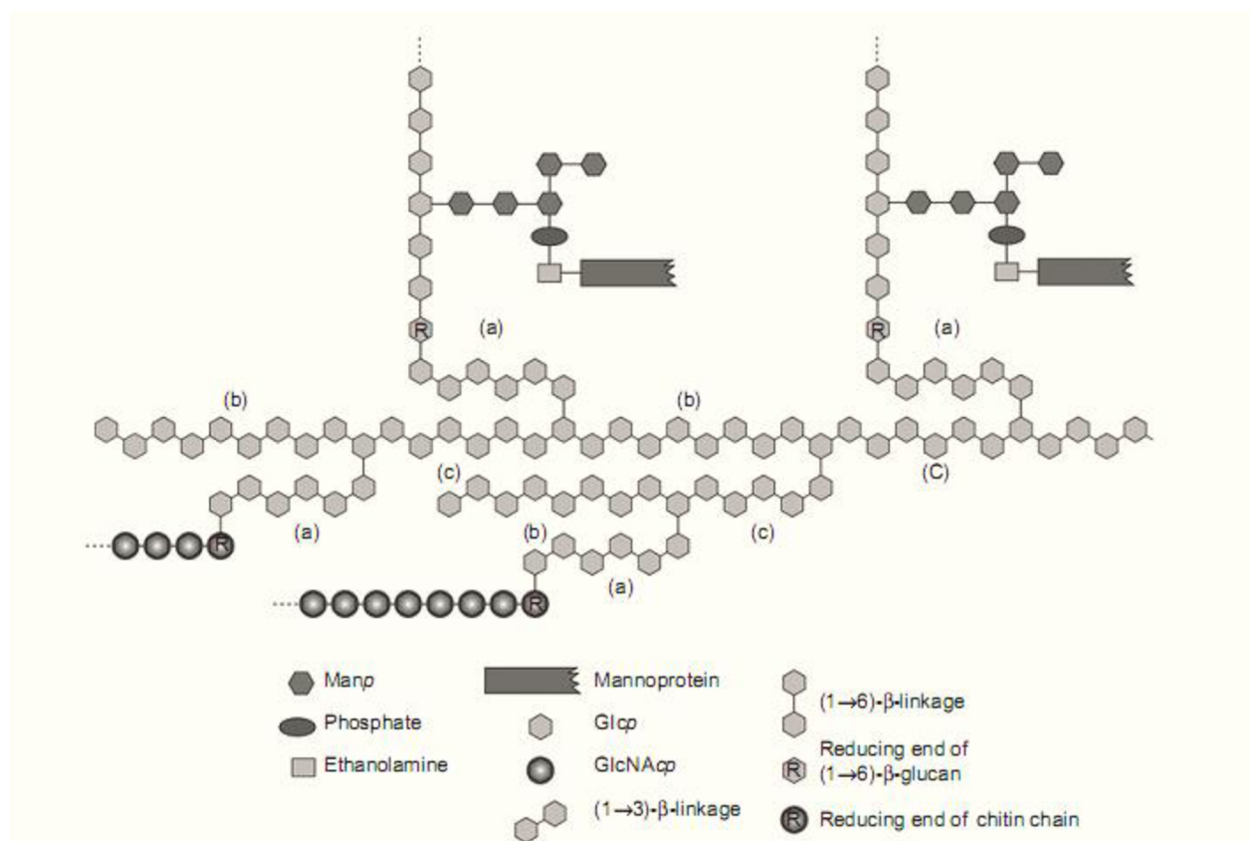
a zkříženým propojováním s transglykosilací dochází k připojení chitinu na tuto glukánovou matici za tvorby nerozpustných mikrofibril [67, 68].

Tento proces síťování je považován za zprostředkovaný aktivitou specifických transferáz umístěných na povrchu a v plazmatické membráně. Z tohoto důvodu se také rigidita buněčné stěny se vzdáleností od rostoucího konce hyfy (vrcholu) zvyšuje. Domnělé síťování bylo potvrzeno u askomycet [69].

Křehká rovnováha mezi syntézou a degradací zesíťovaných propojení, a dokonce celých řetězců, je důležitým předpokladem k tomu, aby byla umožněna plasticita a morfologické změny buněčných stěn, zároveň s tím se ukazuje, že se významně mění relativní zastoupení strukturních polymerů buněčných stěn u mono- a dikaryotického mycelia během morfogeneze struktur a také mezi různými druhy hub [70-73].

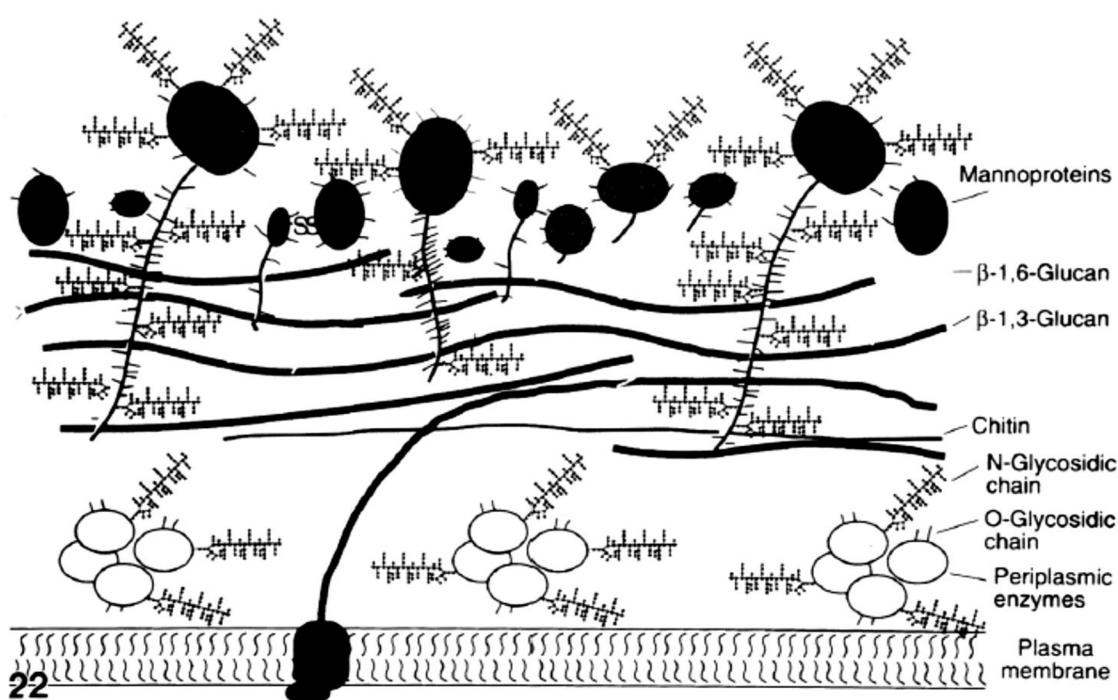
2.5.2. Buněčná stěna kvasinek

Nejdokonaleji strukturně prozkoumaný β -glukan je součástí buněčné stěny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kde tvoří jádro, jehož neredukující konce jsou kovalentně propojeny s chitinem nebo β -(1,6)-glukanem či mannoproteinem, se kterými tvoří 40 - 50% buněčné stěny. Mannoproteiny jsou přítomny hlavně na vnějším povrchu buněčné stěny a s β -(1,6)-glukany jsou propojeny přes zbytky glykosylfosfatidylinositolu. Další proteiny, s vnitřním opakováním, jsou spojeny přímo s β -(1,3;1,6)-glukany. Tento heteropolymerní komplex tvoří trojrozměrnou síť [74], jejíž schéma je znázorněno na obrázku 5:



Obrázek 5 Model fibrilární struktury buněčné stěny *Saccharomyces cerevisiae* [75]

Další znázornění struktury buněčné stěny *Saccharomyces cerevisiae* je na obrázku 6:



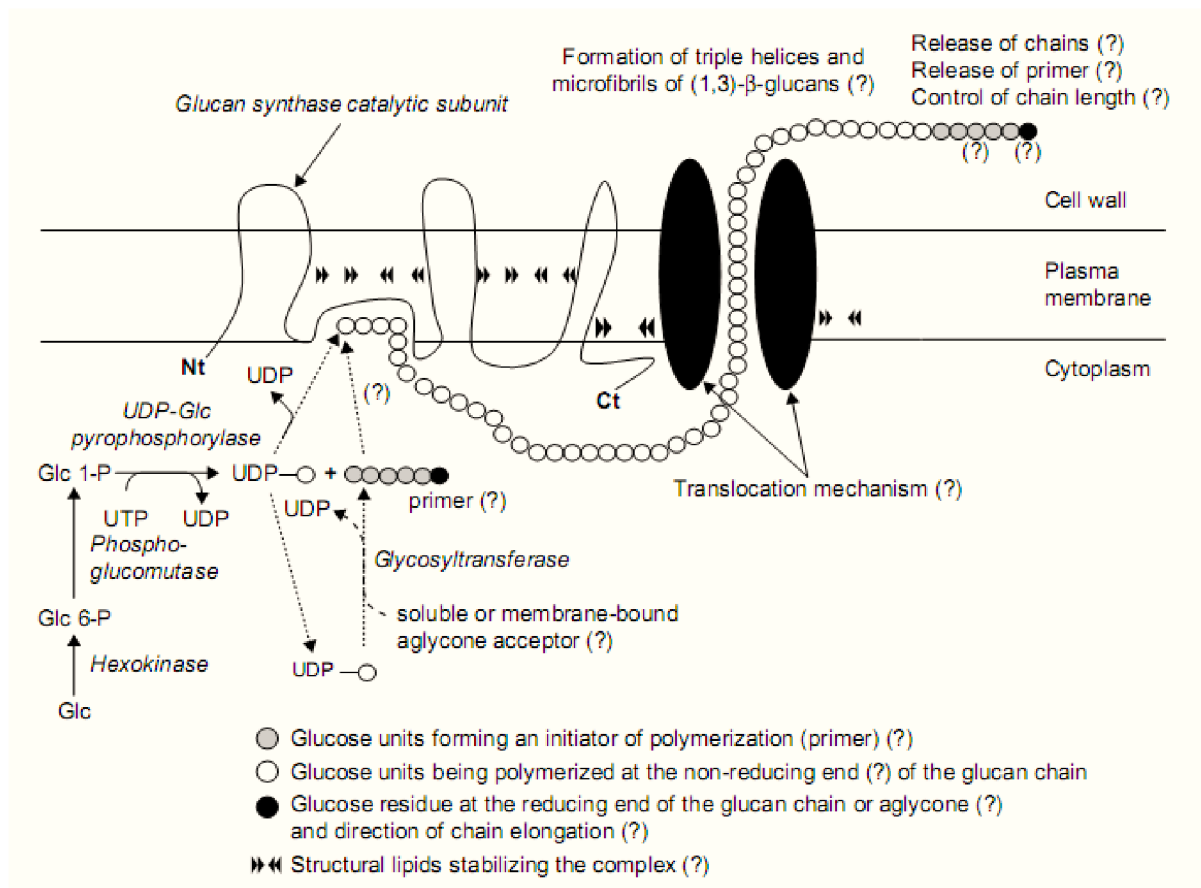
Obrázek 6 Znázornění buněčné stěny *Saccharomyces cerevisiae*. Buněčná stěna, které je umístěna vně buněčné membrány, se skládá ze dvou vrstev: Vnitřní vrstva poskytuje buňce pevnost a je tvořena síťovaným β -(1,3;1,6)-glukanem a chitinem; druhá vrstva na povrchu buňky je složená z mannoproteinů a odpovídá za většinu povrchových vlastností buněk. Většina mannoproteinů je kovalentně propojena s vnitřní chitin-glukanovou vrstvou. Mezi plazmatickou membránou a vnitřní vrstvou jsou uvězněny perioplazmatické enzymy [42].

Kvasinka *Candida albicans* ve své buněčné stěně obsahuje β -(1,3;1,6)-glukan s obsahem 30 – 39% β -(1,3)- a 43% β -(1,6)- vazeb, zatímco v klíčících hyfách je tento poměr obrácený: 67% β -(1,3)- a 14% β -(1,6)- vazeb. Tento β -(1,3;1,6)-glukan je kovalentně spojen s chitinem a β -(1,6)-glukanem [76].

Například β -glukany hub, jako *Aspergillus fumigatus*, obsahují heteropolysacharidový komplex tvořící trojrozměrnou síť podobnou té *S. cerevisiae*, s tím rozdílem, že neobsahuje na matici tvořené β -(1,3;1,6)-glukanem vázaný β -(1,6)-glukan a proteiny, ale má na neredukujících koncích kovalentně vázaný buď chitin a větvený galaktomannan nebo β -(1,3;1,4)-glukan [77].

2.5.3. Biosyntéza β -(1,3)-glukanů

Biosyntéza nejjednodušších, tedy lineárních β -(1,3)-glukanů se skládá z několika navazujících kroků. Proces začíná syntézou tzv. iniciátoru polymerace (primer) a jeho přesunem k membráně vázající β -glukan synthasu. Ten později katalyzuje kroky vedoucí k opakovanému transferu dalších aktivovaných glukosových jednotek z donoru (UDP-Glc) na akceptor vedoucí k prodlužování řetězce až do doby ukončení jeho biosyntézy. Doposud existuje celá řada nedorušených otázek nebo ne zcela jasně ověřených principů. Tato sporná anebo spíše stále ještě diskutovaná místa biosyntézy, ve své podstatě nejjednodušších β -glukanů, jsou na obrázku 7 znázorněna otazníky [75]:



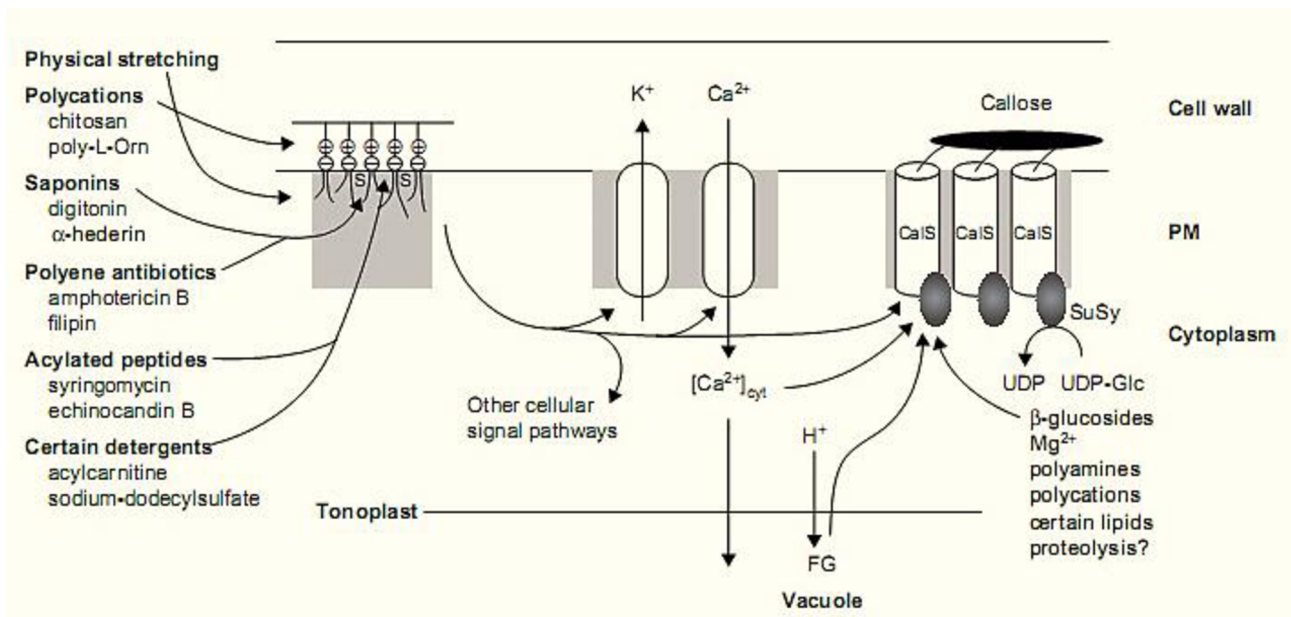
Obrázek 7 Hypotetický model biosyntézy lineárních β -glukanů [75]

U kvasinkových organismů tvoří β -glukany, respektive jejich komplexy s jinými polysacharidy a proteiny, až 50% buněčné stěny, proto i jejich biosyntéza je úzce spojena s buněčným růstem a morfogenezí. Prekurzory tvořící později buněčnou stěnu jsou syntetizovány na povrchu buněk a později polymerovány, jiné jsou tvořeny uvnitř buněčné membrány. Regulace tvorby těchto prekurzorů je pro buňku zásadní a probíhá jak v místě syntézy, tak i regulací transkripce příslušných genů. Obdobný případ nastává při syntéze těchto složitých komplexů u hub. Jak bylo zmíněno, glukany kvasinek patří vazbami k typu β -(1,3;1,6)- a tvoří polymerní prostorovou síť s mannoproteiny a chitinem. Klíčový enzym β -(1,3)-glukan synthasa je lokalizována v plazmatické membráně a skládá se ze dvou podjednotek, jedna obsahuje vazebné místo pro katalytickou podjednotku, druhá je regulační [78].

Proces biosyntézy a její regulace je mnohem složitější než v předchozím případě, základem jsou stejně tak aktivované UDP-glukosové jednotky, které jsou přenášeny specifickými transferázami a spojovány β -(1,3)-glukan synthasou [79]. Sekundárním glukánem buněčné stěny *S. cerevisiae*, kde tvoří až 12 % stěnových polysacharidů, je β -(1,6)-glukan. Zatímco β -(1,3)-glukany tvoří mikrofibrilární strukturu, struktura β -(1,6)-glukanů je amorfni, díky tomu v buněčné stěně slouží jako struktura spojující jednotlivé komponenty. I přes mnohé pokusy nebyl doposud objeven enzym katalyzující syntézu β -(1,6)-glukanů. Existuje předpoklad, že bude také součástí plazmatické membrány, o těchto biosyntetických krocích není ale doposud mnoho známo. Následně po syntéze glukánových řetězců a mannoproteinů, dochází ke složitým posttranslačním modifikacím za tvorby komplexů tvořících vlastní matici buněčné stěny [80].

Biosyntéza chitinu probíhá za aktivity chitin synthasy, která je odpovědná za syntézu lineárních řetězců β -(1,4)-*N*-acetylglukosaminu ze substrátu UDP-*N*-acetylglukosaminu, je transportována v neaktivní formě do plasmatické membrány, kde je aktivována [81, 82]. Regulace syntézy chitinu hub je pod kontrolou PKC, HOG a kalcineurinové dráhy [83].

U vyšších rostlin plní β -glukany řadu rolí, mimo jiného jsou součástí speciálních pletiv, resp. specifických buněčných stěn. Mezi těmito glukany se vyskytuje celá řada strukturních typů od jednoduchých β -(1,3)- až po složité spojené a větvené β -(1,3;1,6)-glukany. Např. hojně se vyskytující kalóza, přítomná během vývoje rostliny na rozhraní dělicích se buněk reprodukčních tkání a v místech odpovědi na fyziologický stres jako sucho, přítomnost toxických kovů nebo napadení škůdci [84]. Stejně jako u kvasinek, je i u rostlin β -(1,3)-glukan synthasa lokalizována na plasmatické membráně a jako substrát využívá aktivovanou UDP-glukosu, každá enzymová jednotka obsahuje své vazebné i regulační místo. Model složitěho multienzymového komplexu včetně regulace je zobrazen na obrázku 8. Při jeho studiu se během *in vitro* pokusů ukázalo, že enzymový komplex pro svou optimální aktivitu vyžaduje přítomnost iontů Ca^{2+} , glykosidy a cellobiosu. Syntéza β -glukanů může být zvýšena přítomností sloučenin obsahujících kladně nabitě skupiny (polyaminy, chitosan), sloučenin jako jsou saponiny (digitonin), polyenová antibiotika, acylované pesticidy a detergenty. Mezi inhibitory se řadí chelatační činidla, ionty La^{3+} , F^- , různé nenasycené mastné kyseliny (např. kyselina olejová a arachidonová). Jako u kvasinek, ani zde není biosyntéza β -(1,6)-glukanů doposud zcela objasněna a vyřešena [85, 86].



Obrázek 8 Model multienzymového komplexu kalóza syntázy a jeho regulace [75]

2.5.4. Depolymerizace β -glukanů

β -glukany jsou široce rozšířeny v rostoucích řasách, houbách, prvocích a bakteriích, kde jsou spojeny se strukturami buněčné stěny a mají řadu biologických funkcí. Ve vyšších rostlinách se nachází zpravidla během fyziologického růstu a vývoje rostliny. V houbách se vyskytují jako složky buněčných stěn v kombinaci s řadou jiných polysacharidů, včetně chitinu, celulosy a mannanů; navíc mohou sloužit jako extra- a intracelulární zásobní polysacharidy. U mnoha organismů se během vývoje mění i jejich množství, toto signalizuje přítomnost β -(1,3)-glukan hydroláz. Díky tomu, že existuje široká skupina strukturně odlišných β -glukanů a jejich komplexů s jinými polysacharidy a proteiny, musí existovat i celá řada enzymů zodpovědných za jejich depolymerizaci. Existují proto enzymy schopné endo-

a exo- depolymerizace β -(1,3)-glukopyranosových zbytků, případně β -(1,3;1,4)-oligoglukosidových zbytků, obě skupiny enzymů jsou souhrnně nazývány β -D-glukosidázami. Pro úplné rozštěpení těchto polysacharidů je často potřebná kombinace více různých enzymů. V některých případech je k rozštěpení řetězce mezi β -D-glukopyranosovými zbytky řetězce β -(1,3)-D-glukanu potřeba fosforylázové aktivity [75].

Endohydrolázy

Glukan endo-1,3- β -D-glukosidasa

Tyto enzymy byly zařazeny do rodiny EC 3.2.1.39. Vyskytují se ve vyšších rostlinách, kde se účastní přeměny β -(1,3)-glukanů během růstu a vývoje, mají ochrannou úlohu před patogenními houbami hydrolýzou β -glukanů jejich stěny [87].

Glukan endo-1,3;1,4- β -D-glukosidasa

Patří sem enzymy řazené do rodiny EC 3.2.1.73 (licheninasy) a stejně jako předchozí skupina jsou omezeny především na vyšší rostliny, zejména čeledi lipnicovité. Ojediněle jsou nalézány také v nižších rostlinách [88].

Ve vyšších rostlinách se účastní degradace buněčných stěn jako součást vývoje, např. při degradaci obalů zrn ječmene [89].

Všechny tyto enzymy jsou specifické pro β -(1,3;1,4)-glukany nacházející se v buněčných stěnách příslušných rostlin. Produkty štěpení jsou tri- a tetrasacharidy [90].

Glukan endo-1,6- β -D-glukosidasa

Enzymů patřících k této rodině EC 3.2.1.75 bylo izolováno relativně málo. Patří sem např. enzym izolovaný z vláknité houby *Acremonium persicinum*, který hydrolyzuje β -(1,6)-glukany pustulan a lutean a jejichž produktem jsou β -gentiobiosa a β -gentiotriosa. Enzymy této skupiny hydrolyzují také β -(1,3;1,6)-glukan laminarin za tvorby glukosy, β -gentiobiosy a množství vyšších oligoglukosidů v důsledku štěpení β -(1,6)- a β -(1,3)- vazeb [91].

Exohydrolázy

K exohydrolázám patří dvě nejvýznamnější skupiny patřící do rodin GH1 a GH3 glykosid hydroláz, dělení je založeno na klasifikaci CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) [88]:

β -D-glukosidázy rodiny GH1

Do této rodiny řadíme velkou skupinu čítající až 2200 enzymů, které produkují eubakterie, archea, houby, rostlinami i živočichové. Jejich široký výskyt ukazuje na to, že tyto enzymy hrají klíčovou roli v mnoha základních biologických procesech. Například rostlinné β -glukosidázy ječmene, rýže, ovsa nebo kukuřice katalyzují produkci oligosacharidů z buněčných stěn obsahujících β -(1,3;1,4)- a β -(1,3)-glukany a slouží tak k jejich přeměně během vývoje, mohou sloužit také jako aktivátory tvorby obranných sloučenin – fytohormonů a ligninu [92].

β -D-glukosidázy rodiny GH3

Tato skupina obsahuje asi 1700 různých enzymů, které produkují eubakterie, houby a rostliny, velmi vzácně archea a živočichové. Stejně jako předcházející rodina enzymů, i tato díky svému rozšíření potvrzuje, že se jedná o klíčové enzymy metabolismusu. Jejich funkce zahrnují například mikrobiální degradaci rostlinných zbytků, modifikace struktury glykosidů, důležitou roli hrají při syntéze antibiotik a fungicidních molekul, remodelování struktury buněčných stěn a také hrají úlohu během mikrobiálních infekcí rostlin. Např. enzymy ječmene hrají důležitou úlohu během klíčení a růstu [92, 93].

2.6. Izolace chitin-glukanového a chitosan-glukanového komplexu hub

Schizophyllum commune je basidiomyceta, využívaná především pro svou produkci exopolysacharidu schizophyllanu (SCH). Tato houba se vyznačuje dobrým růstem v submerzní kultuře, kde dosahuje dobrých výtěžků biomasy. Při studiu jeho buněčné stěny bylo prokázáno, že *Sch. commune* obsahuje chitin-glukan jako jednu z hlavních složek [94].

Di Mario a kol. [95] se zabývali studiem obsahu chitinu a chitosanu u basidiomycet, popsali metodu izolace, spolu s porovnáním výtěžků biomasy, který monitorovali po dobu 5 týdnů. Byly porovnány: *Agaricus bisporus*, *Auricularia auricula-judae*, *Lentinula edodes*, *Trametes versicolor*, *Armillaria mellea*, *Pleurotus ostreatus* a *Pleurotus eryngii*. Výsledky obsahu sledovaných látek po 21 denní kultivaci, jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 Výtěžek biomasy a obsahu chitinu, obsahu glukosaminu a glukanu v chitinu [95]

Zdroj	Biomasa (g/L)	Chitin (% suchého mycelia)	Glukosamin (% v chitinu)	Glukany (% v chitinu)
<i>Agaricus bisporus</i>	3,5	8,5	51,1	16,9
<i>Auricularia auricula-judae</i>	6,8	19,6	64,5	19,5
<i>Lentinula edodes</i>	3,2	10,1	46,3	18
<i>Trametes versicolor</i>	4,2	13,1	26,4	12,6
<i>Armillaria mellea</i>	6,4	11,1	38,1	16,8
<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,9	15,3	30,7	26,7
<i>Pleurotus eryngii</i>	4,6	8,7	44,8	30,1

Chitin a chitosan byly izolovány následujícím postupem: Biomasa byla oddělena, promyta a lyofilizována. Kvůli odstranění proteinů byly 3 g lyofilizátu míchány přes noc se 100 mL 1 M NaOH při 40 °C a poté odstředěny (5000 x g, 30 minut), precipitát byl resuspendován ve vodě a míchán při 95 °C přes noc a po centrifugaci (5000 x g, 20 minut) bylo k precipitátu přidáno 50 – 100 ml 5 % kyseliny octové a mícháno při 90 °C 3 hodiny a poté odstředěno. Sediment (chitin) byl promýván vodou a lyofilizován, supernatant (chitosan) byl srážen 1 M NaOH, filtrován, promýván a lyofilizován. Chitin byl následně 2 x deacetylován: Lyofilizované vzorky izolovaného chitinu byly inkubovány s 47 % NaOH po dobu 2 hodin při 60 °C pod inertní atmosférou (N₂). Vliv první a druhé deacetylce na % acetylce vzorku chitinu po provedené deacetylaci, určené z IR spektra [95], je uveden v tabulce 6:

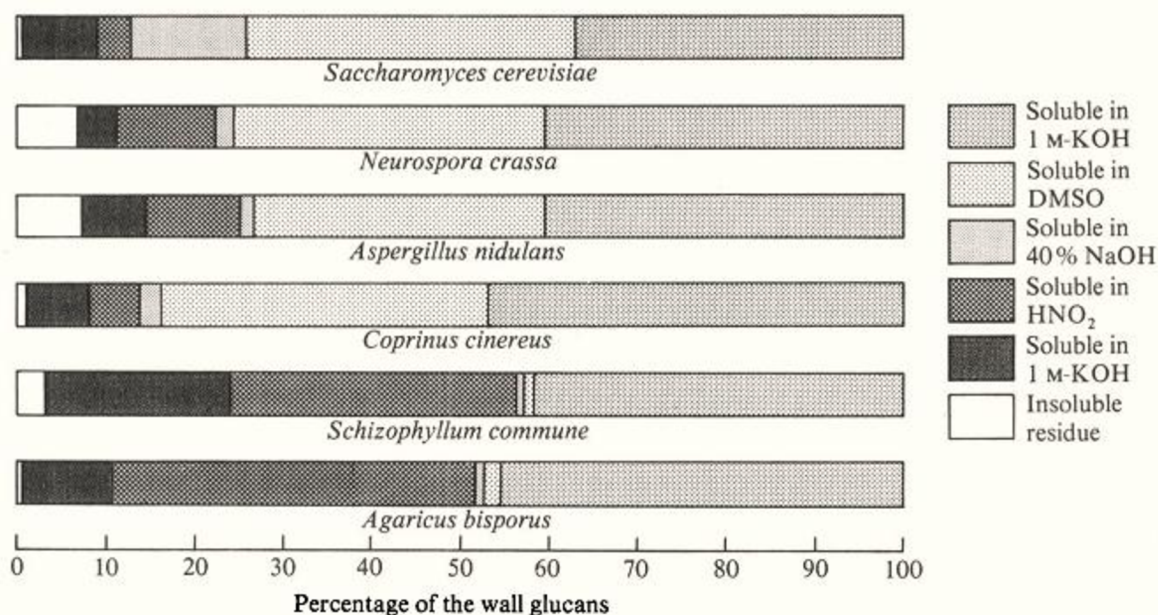
Tabulka 6 Vliv provedené deacetylce na stupeň acetylce chitinu jednotlivých vzorků [95]

Zdroj	Výchozí acetylce chitinu (%)	Acetylce chitinu (%) po první deacetylaci	Acetylce chitinu (%) po první deacetylaci
<i>Agaricus bisporus</i>	91,0	61,5	3,9
<i>Auricularia auricula-judae</i>	95,1	41,5	3,2
<i>Lentinula edodes</i>	92,0	70,5	40,3
<i>Trametes versicolor</i>	97,0	70,6	7,4
<i>Armillaria mellea</i>	92,7	70,6	32,0
<i>Pleurotus ostreatus</i>	98,7	23,3	3,7
<i>Pleurotus eryngii</i>	94,2	30,4	18,7

Výsledky ukazují, že v biomase se obsah chitinu pohyboval mezi 8,5 – 19,6 %, obsah glukosaminu byl mezi 26,4 – 64,5 % a obsah glukanu 12,6 – 30,1 % (Tabulka 5). Takto vysoké rozdíly, nejen v obsahu chitinu, ale i chitin-glukanového komplexu v biomase různých

hub ukazují na velkou rozdílnost složení buněčné stěny, resp. stupně zesílení, mezi různými druhy. Maximální výtěžek chitinu a chitosanu bylo možné získat v pozdní exponenciální fázi růstu [95].

Předpoklad o různém stupni zesílení a jeho vlivu na rozpustnost glukánů u různých askomycet a basidiomycet byl potvrzen ve studii Sietsma a Wesselse [96]. Rozpustnost β -(1,3)/(1,6)-glukanu v buněčné stěně hub předpokládá přítomnost vazeb mezi glukánem a chitinem. Autoři sledovali rozdíl mezi *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Coprinus cinereus*, *Schizophyllum commune* a *Agaricus bisporus* při frakční extrakci složek buněčné stěny působením různých rozpouštědel nebo extrakčních činidel, obrázek 9. Rozpouštění a extrakce probíhaly postupně a jejich účinnost byla vyjádřena jako % odstranění rozpustného podílu v daném rozpouštědle. Vlastní extrakce probíhaly v tomto sledu a v těchto rozpouštědlech: 1 M KOH pod inertní atmosférou při 60 °C po dobu 20 minut; dimethylsulfoxidem (DMSO) při laboratorní teplotě přes noc; 40 % NaOH pod inertní atmosférou při 100 °C po dobu 1 hodiny; HNO₂, jako rozpouštědlem β -glukanů po selektivní depolymerizaci deacetylovaného chitinu; 1 M KOH pod inertní atmosférou při 60 °C po dobu 20 minut [96].



Obrázek 9 Vliv různých rozpouštědel a extrakčních činidel na extrakci glukánů buněčné stěny různých hub [96]

U *Saccharomyces cerevisiae* byly po první extrakci 1 M NaOH odstraněny všechny mannany a mannoproteiny spolu s částí β -(1,3)-/ β -(1,6)-glukanů, většina zbytkových β -(1,3)-/ β -(1,6)-glukanů se extrahovala do DMSO, takže veškeré zbytkové glukany byly odstraněny po extrakci 40 % NaOH. Z výsledků extrakce je možné říct, že jen 15 % glukánů buněčné stěny této kvasinky bylo vázáno na chitin. U *Neurospora crassa*, byly jako alkalicky rozpustné složky zastoupeny hlavně glykoproteiny a α -(1,3)-glukany; u *Aspergillus nidulans* byly alkalicky rozpustnou složkou α -(1,3)-glukany; *Coprinus cinereus* obsahoval jako alkalicky rozpustnou složku především β -(1,3)-/ β -(1,6)-glukany, které byly ovšem, stejně jako u *Saccharomyces cerevisiae* na chitosan vázány pouze z 15 %, takže byly dobře extrahovatelné v alkalickém prostředí a působením DMSO [96].

Buněčné stěny *Schizophyllum commune* a *Agaricus bisporus* byly velmi podobné, jak chemicky tak strukturně. U obou byly v alkalicky rozpustné části identifikovány α -(1,3)-

glukany a také β -(1,3)/ β -(1,6)-glukany. DMSO a 40 % NaOH u obou extrahovaly jen velmi malá množství rozpustných glukánů. Velký vliv 40 % NaOH byl na depolymerizaci a deacetylaci chitinu a rozrušení struktury vzniklého chitosan-glukanového komplexu, uvolněné β -glukany se staly rozpustnými v HNO₂ a 1 M KOH. Toto potvrdilo hypotézu, že u těchto bazidiomycet je chitin s glukánem více provázán [96].

Existuje celá řada patentů popisující izolaci chitosan-glukanového komplexu z různých zdrojů, například:

Muzarelli [97, 98] patentoval postupy na izolaci chitosan-glukanu. Používal mycelium hub rodů *Allomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Phycomyces*, *Choanephora*, *Zygorrhynchus* a jiné. Izolaci provedl 30 – 40 % roztokem hydroxidu při teplotě 118 – 130 °C působením po dobu 4 – 6 hodin. Takto nastavené podmínky umožnily odstranění rozpustných glukánů, a dalších nežádoucích složek (barviva, lipidy, proteiny) a zároveň došlo k deacetylaci chitinu.

Metodu izolace chitosanu a chitosan-glukanu z chitin obsahující biomasy *Aspergillus niger* patentoval Hershberger [99]. Biomasa byla deacetylována v koncentrovaných roztocích NaOH, LiOH nebo KOH v navážce 200 – 500 % vůči navážce suché biomasy při teplotě 60 – 90 °C po dobu nejméně 10 hodin. Chitosan byl získán extrakcí kyselinou octovou, mravenčí, citronovou nebo chlorovodíkovou při pH 3 – 5.

Teslenko a Nikolaewna [100] patentovali čtyřstupňovou izolaci chitosan-glukanu ze zygomycet, askomycet, plektomycet, streptomycet a pyrenomycet. Izolace se skládala z těchto kroků: a) odstranění proteinů 8 % vodným NaOH při teplotě 90 °C po dobu 90 minut, filtrací a opakovaným působením 8 % NaOH a promytí vodou, b) extrakce minerální kyselinou, c) deacetylace pomocí 29 % NaOH při teplotě 125 °C po dobu 90 minut a d) extrakce 4 % HCl po dobu 180 – 240 minut. Po neutralizaci činil výtěžek chitosan-glukanu až 68 %.

Bohlmann a kol. [101] využili k izolaci *N*-acetyl-D-glukosaminu enzymatickou degradaci chitin-glukanu z biomasy hub, rodů *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Absidium*, *Lactarius*, *Saccharomyces* a *Candida*, převážně jako odpadní biomasy po výrobě kyseliny citronové. Metoda byla založena na působení chitinázy, β -*N*-acetyl-glucosaminidázy a glukánázy, tedy enzymů eukaryotických mikroorganismů, působících na chitin-glukanový komplex buněčné stěny hub. Podmínky degradace: pH 4 – 6 a teplota 20 – 45 °C.

Izolaci chitosanu s vysokým stupněm deacetylace (okolo 85 %) patentoval Fan [102]. Jako výchozí biomasu použil *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Candida guilliermondii*, *Lactarius vellereus*, *Mucor rouxii*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium notatum* a *Saccharomyces cerevisiae*. Nejprve na biomasu působil 4 % NaOH po dobu 30 min při 120 °C v autoklávu kvůli odstranění proteinů, lipidů a barviv. Následně ji deacetyloval: 200 g mycelia (85 % vody) míchal se 180 g 50 % NaOH spolu s 60 g pevného NaOH. Směs zahříval 16 hodin při teplotě 120 °C, potom zfiltroval a promýval vodou do pH 9. Extrakce probíhala ledovou kyselinou octovou a při pH 3,5 po dobu 10 min, a směs byla odstředěna. Roztok supernatantu odstředil a pH upravil na hodnotu 11, produkt odstředil, promyl a lyofilizoval.

Výrobu glukosaminu z mikrobiální biomasy (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*) obsahující chitin patentovali Fan a kol. [103]. Glukosamin izolovali následujícím způsobem: a) Ošetřením biomasy kyselinou o koncentraci 5 – 50 hmotnostních % při teplotě 80 °C a vyšší po dobu 4 – 25 hodin nebo b) Ošetřením biomasy alkalickým roztokem kvůli předčištění (4 % NaOH, 120 °C, 1 hodina), promývání vodou a následnou reakcí s kyselinou v koncentraci vyšší než 5 % a teplotě vyšší než 80 °C po dobu nejméně 4 hodin.

Metodu izolace polysacharidů obsahujících chitosan a kovalentně vázaný glukan z *Agaricus bisporus* patentovali Okazaki a kol. [104]. Biomasu předupravili roztokem hydroxidu při teplotě 60 °C po dobu 20 minut a promyli vodou. K biomase přidali 25 - 50 % roztok NaOH a za míchání suspenzi ohřivali na teplotu 90 - 120 °C po dobu 12 minut až 30 hodin (preferováno 100 – 110 °C po dobu 1 – 10 hodin). Po promytí vodou k pevnému podílu přidali 1 – 20 % vodný roztok organické kyseliny (preferováno 5 – 10 %), např. kyseliny octové, jablečné nebo askorbové, homogenizovali a nechali stát při 5 – 40 °C po dobu 6 minut až 48 hodin. Tím převedli produkt do roztoku, ze kterého ho izolovali úpravou pH do alkalické oblasti nebo vysrážením vhodným rozpouštědlem. Byla popsána i úprava vzorku působením celuláz, glukanáz a proteáz při teplotě 25 – 40 °C působících 2 – 24 hodin.

Přípravu chitosanu z mikrobiální biomasy (*Candida guillermiondii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*) patentovali Fan a kol. [105]. Z biomasy byly odstraněny proteiny, lipidy a barviva, inkubací s 4 % NaOH při 120 °C po dobu 30 minut. Na předčištěnou biomasu působili více než 25 % NaOH při teplotě vyšší než 95 °C po dobu delší než 10 hodin, přitom byl chitin deacetylován na chitosan (podle podmínek z více než 85 – 95 %). Po promytí deacetylované biomasy chitosan extrahovali kyselinou octovou při pH 3,5 – 5 po dobu 10 minut, roztok chitosan acetátu filtrovali a chitosan sráželi úpravou pH na hodnotu 10,5 – 11,5. Po sedimentaci produkt promývali vodou do pH 9 a sušili lyofilizací.

Izolaci základních složek buněčných stěn hub a kvasinek (především rodů *Aspergillus* a *Saccharomyces*), tedy polymeru chitinu (obsahující nad 80 % chitin a pod 20 % β -glukanu) a kopolymeru chitin-glukanu, spolu s přípravou chitosanu, patentovali Versali a kol. [106]. Na biomasu působili 0,1 – 15 % NaOH při teplotě pod 60 °C po dobu až 30 hodin, získali tak alkalicky rozpustnou a nerozpustnou frakci. Z nerozpustného podílu dalším působením NaOH izolovali chitin a chitin-glukan při teplotě 100 – 120 °C působením po dobu 30 – 300 minut s koncentrací NaOH 1 – 20 hmotnostních %. Jako činidlo pro deacetylaci chitinu na chitosan po promytí a neutralizaci v mírně kyselém prostředí popsali použití enzymů – chitin deacetyláz.

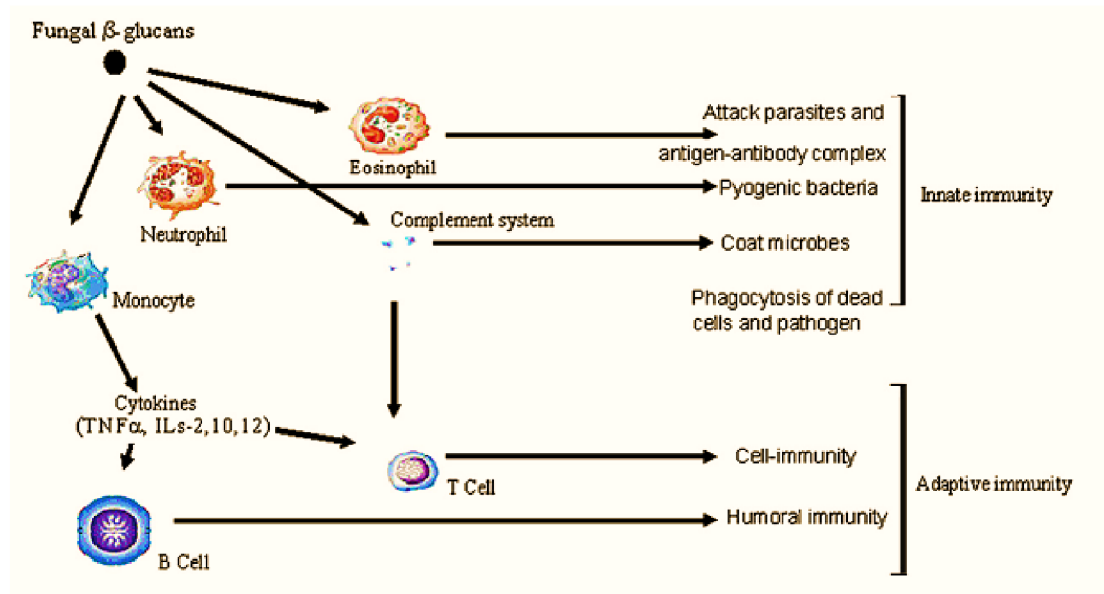
Možnou výrobu glukosaminu dvoustupňovou hydrolyzou z chitin obsahující biomasy (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.*) patentovali Fosdick a kol. [107]. V prvním kroku odstranili proteiny, lipidy a jiné polysacharidy za působení 0,1 – 12 % nebo 0,5 – 5 % HCl, případně kyselinou citronovou ve vyšší koncentraci, při teplotě kolem 60 °C. Po promytí konvertovali chitin na glukosamin druhou hydrolyzou s HCl v koncentraci 9 – 20 % při teplotě nad 80 °C (až 160 °C) po dobu delší než 4 hodiny za možného přetlaku 2 atmosfér a více. Glukosamin izolovali po filtraci reakční směsi a jejím zahuštění na odparce srážením etanolem v poměru 1:1 nebo 1:2. Jako možnou předúpravu biomasy popsali použití 1 – 8 % NaOH při teplotě 100 – 125 °C po dobu 20 – 60 minut.

2.7. Interakce (1,3)- β -glukanů a savčích buněk

Schopnost β -(1,3)-glukanů stimulovat nespecifické imunitní reakce je známa a využívána k léčebným účelům řadu let. Přesný mechanismus účinku nebyl dlouho znám, teprve po objevu rozpoznávacích receptorů β -glukanů jako Dectin-1, bylo možné tyto mechanismy sledovat až k úrovni signálních drah. První receptory rozpoznávající β -(1,3)-glukany byly objeveny na lidských monocytech a později popsány na mnoha dalších imunitních i neimunitních buňkách, včetně neutrofilů, makrofágů, NK buněk, eozinofilů, alveolárních epiteliálních buněk, endoteliálních buněk a fibroblastů. Byly nalezeny celkem čtyři typy receptorů: laktosylceramidový (LacCer, CDw17), scavengerový, pro komplement 3 (CR3) a asi nejvýznamnější - Dectin-1 [108-110].

Interakce β -glukanů s laktosylceramidovými receptory je málo prozkoumaná, v souvislosti s ní ale dochází ke zvýšení produkce cytokinů včetně MIP a TNF a zvýšení antimikrobiální odpovědi leukocytů. Receptor pro komplement 3 (CR3, Mac-1) aktivuje monocyty, makrofágy, neutrofil, eozinofily, ale také dendritické, NK, T- a B- buňky. Tento receptor je nazýván i receptorem pro integriny α /nebo opsonizačním receptorem, má důležitou úlohu v interakci imunitních buněk a buněk extracelulární matrix a také má vliv na intracelulární odpověď, jako je indukce cytotoxicity, fagocytózy, adheze nebo migrace [111, 112].

Nespecifická a specifická imunitní odpověď na β -glukany hub je obecně naznačena na obrázku 10:



Obrázek 10 Imunostimulační efekt β -glukanů hub [110]

Receptor pro Dectin-1 byl poprvé identifikovaný na dendritických buňkách jako receptor pro T-buňky, později bylo zjištěno, že je i receptorem rozpoznávajícím β -(1,3)-glukany. Vyskytuje se jako dvě hlavní a několik méně významných izoform. Je exprimován na leukocytech a myeloidních buňkách jako jsou makrofágy, monocyty, dendritické buňky a neutrofil, také subpopulaci B- a T- buněk, žírných buňkách a eozinofilech [113]. Dectin-1 interaguje s rozpustnými a rozštěpenými β -(1,3)-glukany pocházejícími z různých zdrojů jako bakterie a houby. Reakce na interakci s tímto receptorem jsou rozmanité, patří sem fagocytóza a endocytóza, aktivace enzymů PLA₂ a COX, produkce cytokinů a chemokinů včetně TNF- α (indukce místního zánětu, aktivace endotelií), MIP-2, IL-23 (proliferace paměťových T-buněk, zvýšení produkce IFN- γ), IL-6 (stimulace T- a B- buněk, stimulace sekrece Ig, indukce syntézy proteinů akutní fáze, pyrogenní efekt), IL-2 (růstový faktor T-, B- a NK- buněk) a IL-10 (inhibice T_H1 a makrofágů; indukce diferenciaci na plazmocyty) [114]. Důležitý je fakt, že pro indukci produkce cytokinů jako IL-10 a IL-23 stačí jeden signál, tedy pouze interakce s receptorem Dectin-1, pro indukci prozánětlivých cytokinů a chemokinů je vyžadován druhý signál z receptoru TLR (Toll-Like), především TLR2 (ligandem jsou lipoproteiny G- bakterií, lipoteichová kyselina G+ bakterií, lipoarabinomany mykobakterií, zymosan hub) a TLR6 (ligandem jsou lipopeptidy bakterií, lipoteichová kyselina a zymosan) [115]. Široká škála reakcí spuštěných aktivací Dectin-1 receptoru spolu s TLR receptorem může vysvětlit pozitivní efekt těchto polysacharidů nejen při infekci patogeny obsahujícími na svém povrchu nebo produkujícími do okolí β -(1,3)-glukany (kvasinkové, houbové a některé bakteriální infekce), ale i protinádorové účinky, protože produkcí nejrůznějších cytokinů umožňuje nástup adaptivních imunitních reakcí. Problémem je schopnost některých houbových

patogenů maskovat své β -(1,3)-glukany pomocí mannanů nebo α -glukanů a tím znemožnit interakci s tímto receptorem, toto maskování lze označit za faktor virulence vedoucí k potlačení imunitní odpovědi během infekce [116].

Ačkoli interakce s receptorem Dectin-1 má prospěšnou a ochrannou úlohu, může být zapojena u geneticky vnímavých jedinců do spuštění některých autoimunitních onemocnění, jako např. revmatoidní artritida u geneticky vnímavých myší (β -glukany hub jako curdlan a zymosan) [117] nebo může negativně ovlivnit průběh např. alergického astmatu a odpověď na zánět u myší s maladaptací T_H imunity (vdechování rozpustného β -glukanu ze stěny *C. albicans*) [118]. V rozporu s tímto negativním působením může být naopak zlepšení stavu a inhibiční efekt vodorozpustného nízkomolekulárního β -(1,3;1,6)-glukanu z *Aureobasidium pullulans* na alergické reakce z potravin u myší díky redukcí produkce IL-12 a IFN- γ [119].

Dectin-1 je vysoce specifický pro β -(1,3)-glukopyranosový řetězec, nerozpoznává jiné typy vazeb jako např. α -, β -(1,6)-, β -(1,3;1,6)- a β -(1,3; 1,4)-, i když některé výsledky naznačují, že mohou být rozpoznány i vazby β -(1,3;1,4)-. Ukazuje se ovšem, že ne na všechny β -(1,3)-glukany reaguje stejně, byl pozorován široký koncentrační rozsah nutný k aktivaci receptoru a vedoucí k příslušné odpovědi, tento rozsah byl od 2,6 mM ke 2,2 pM [120]. Řada autorů se domnívá, že minimální délka polymeru potřebná k rozpoznání struktury má být mezi 8 – 11 β -(1,3)- vazbami s jedním postranním řetězcem, respektive 10 – 11 glukosovými jednotkami, je ovšem rozdíl mezi koncentrací vyvolávající interakci s receptorem a množstvím, které vyvolá biologickou účinnost [109].

2.8. Toxicita β -glukanů

Byla sledována i možná toxicita β -glukanů. Během sledování vlivu 28 denní konzumace vysokých dávek koncentráту z ječmene (β -(1,3;1,4)-glukan) krysami kmene Wistar bylo zjištěno, že ani dávka 5,6 g/kg tělesné hmotnosti nemá žádné zřejmé toxické účinky. Znepokojivé by mohlo být pouze zvýšené množství lymfocytů, tento vliv ovšem nebyl závislý na dávce a nebyl pozorován u samic. Tato dávka 100 násobně převyšuje dávku doporučenou pro snížení hladiny cholesterolu v séru (3 g/den) a potvrzuje pravděpodobnou neškodlivost tohoto extraktu [121].

Také testování β -(1,3;1,6)-glukanu, izolovaného ze *Saccharomyces cerevisiae* a převedeného do vodorozpustné formy karboxymethylací ani na jedné z těchto forem, neprokázalo cytotoxicitu ani genotoxicitu. Pouze koncentrace 200 μ g/mL nekarboxymethylovaného β -(1,3;1,6)-glukanu měla po 24 hodinách na testované buňky CHO-k1 (epiteliální buňky křečka) škodlivý vliv [122].

Výrazně negativní efekt, až indukci smrtící toxicity, vyvolala kombinace β -glukanů a nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSAID) jako je indomethacin. Tyto léky potlačují tvorbu prostaglandinů inhibicí cyklooxygenázy. Různé β -glukany mají velmi širokou imunofarmakologickou aktivitu, která jak bylo již zmíněno, závisí na mnoha parametrech a použití β -glukanů, zvláště těch vodorozpustných nemá obecně vedlejší účinky, i když bylo prokázáno signifikantní zvýšení mortality myší léčených indometacinem vystaveným schizophyllanu: Indometacin byl myším perorálně podáván jednou denně po dobu 14 dní, toxicita byla určena jako poměr mrtvých jedinců k celkovému počtu: 0/8 (pro 2,5 mg/kg) a 5/8 (pro 5 mg/kg) indometacinu. Toxicita vzrostla na 3/8 a 8/8 u myší, kterým bylo jednorázově na začátku experimentu do dutiny břišní podáno 250 μ g schizophyllanu. Podobný efekt měly také β -glukan ze *Sclerotinia sclerotiorum* (IFO 9395), grifolan, zymosan A a zymocel. Kombinace β -glukanu a indometacinu zvýšila počet leukocytů, zejména makrofágů a neutrofilů, v různých orgánech a tyto buňky následně aktivovala, stoupla produkce IFN- γ , což vedlo k poškození jater a smrti [123].

V navazujících experimentech byla do břišní dutiny myši přenesena bakteriální střevní mikroflóra, aby zde způsobila zánět pobřišnice. V kontrolní skupině ošetřované pouze různými nesteroidními protizánětlivými léky, nabumetonem a částečně COX-2 selektivními nesteroidními protizánětlivými léky nebyl víceméně pozorován smrtící efekt. V této studii byl, na rozdíl od předešlé, podáván β -(1,3)-glukan z *Sclerotinia sclerotiorum* (IFO 9395) v množství 250 μ g postupně pátý, třetí a první den před podáním léčiva. Stejně jako v první studii se ukázalo zvýšení mortality, pokud byl nesteroidní protizánětlivý lék podáván po dobu 14 dnů (1x denně) myším, kterým byl předem aplikován β -glukan [124], souhrn výsledků studie je uveden v tabulce 7:

Tabulka 7 Nesteroidní protizánětlivá léčiva a mortalita β -glukany ošetřených myší [124]

Léčivo	Ošetření		Počet myší mrtvé/celkový počet po 14 dnech
	NSAID (mg/kg)	β -glukan (μ g/myš)	
Indometacin	5	0	1/5
	5	250	5/5
Aspirin	600	0	0/5
	600	250	3/5
Diklofenak	20	0	0/5
	20	250	5/5
Sulindak	60	0	2/5
	60	250	5/5
Nabumeton	320	0	0/5
	320	250	0/5

Doplněné studie ukázaly, že β -glukany také výrazně ovlivňují vliv lipopolysacharidu v kombinaci s nesteroidními protizánětlivými léky. Zatímco velké množství neléčených myší, kterým zároveň nebyl podáván β -glukan, přežilo dávku 1 mg lipopolysacharidu, citlivost k němu byla zvýšena až 10.000 x ve skupině léčené indomethacinem a zároveň dopované β -glukanem a až 1.000 x zvýšená ve skupině neléčené indomethacinem, ale dopované pouze β -glukanem [125].

Další studie ukazují na negativní vliv β -(1,3)-glukanů při vzniku mikroangiopatie indukované např. houbovou infekcí. Děje se to díky zvýšení produkci hydroxylových radikálů. Tzv. TF-GEN buňky (transformované glomerulární endoteliální buňky) byly vystaveny zvyšující se koncentraci β -(1,3)-glukanů ze stěn hub (115 – 430 pg/mL) po dobu 1 – 3 hodin. Množství vyprodukovaných hydroxylových radikálů při dávkách glukanů 230 – 430 pg/mL odpovídalo množství indukovanému lipopolysacharidem *E. coli* v množství 1 – 10 μ g/mL [126].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístroje a zařízení

- ✓ Autokláv Systec VX-150 (Systec, DE) a Fedegari FVA 3/A1 (Fedegari Autoclavi SpA, IT)
- ✓ Čerpadlo (peristaltické) MasterFlex[®] L/S[®] (77200-12) + hlava Easy-Load 3 (77800-50) (Cole Parmer, USA)
- ✓ Elektronový mikroskop Vega II LSU (Tescan, ČR)
- ✓ Fermentor (+ ovládací software a příslušenství): Techfors S, objem 7,5 L a Techfors S, objem 30 L (Infors HT, CH), software IRIS NT vision 5.34.807.0997 (Infors HT, CH), pH sonda EASYFERM PLUS VP120 (Hamilton Company, USA), pO₂ sonda VISIFERM DO120 (Hamilton Company, USA)
- ✓ Homogenizátor (+ nástavce) T25 digital ULTRA-TURRAX[®] (IKA, DE); S25N-25G, S25N-18G, S25N-10G (IKA, DE)
- ✓ Hřidelová míchačka EUROSTAR Digital (IKA, DE)
- ✓ IR spektrometr FTIR 8400S (Shimadzu, JP)
- ✓ - část textu byla odstraněna z důvodu utajení -
- ✓ Konduktometr WTW Cond 315i (WTW, DE)
- ✓ Laminární box Jouan MSC12 (Jouan, FR) a HERA SAFE KS15, (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ✓ Lyofilizátor PowerDry PL3000 (Heto-Holten, DK)
- ✓ Magnetická míchačka C-MAG HS10 (IKA, DE)
- ✓ Míchačka vícemístná __RO 15 Power (IKA, DE)
- ✓ NMR Bruker Avance[™] III 500 MHz + sonda BBF0 plus (Bruker, USA)
- ✓ Odstředivka Eppendorf Mini Spin (Eppendorf, DE), Jouan KR25i + rotor AKL 500-11 (Jouan, FR) a Beckman J2-21 + rotor JA-10 (Beckman Coulter, USA)
- ✓ pH metr ORION 3 STAR (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ✓ Spektrofotometr HELIOS EPSILON (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ✓ Sušárna Ecocell 55 (BMT, ČR)
- ✓ Sušicí váhy HR 73 Halogen Moisture Analyser (Mettler Toledo, USA)
- ✓ Termostat Incucell 55 (BMT, ČR)
- ✓ Třepačka INNOVA[®] 44 Incubator Shaker Series (New Brunswick Scientific, USA)
- ✓ Váhy Adventurer[™] Pro (Ohaus, CH) a Scout[™] Pro (Ohaus, CH)
- ✓ Vakuová odparka (+ příslušenství) BÜCHI Rotavapor R210, Vacuum Controller V-855, Heating Bath B-491, Distillation Chiller B-741 a Vacuum pump V-700 (vše BÜCHI, CH)
- ✓ Vodní lázeň Memmert WNB 22 s třepací vložkou SV1422 (Mettler, DE)

3.2. Chemikálie

- ✓ Acetylaceton, puriss. p.a., ≥ 99,5 % (Sigma Aldrich, USA)
- ✓ Diethylether, p.a., min. 99 % (Lach:NER, ČR)
- ✓ Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a., min. 99 % (Lach:NER, ČR)
- ✓ Ehrlichovo činidlo, puriss. p.a., Reag. Ph. Eur., ≥ 99 % (Sigma Aldrich, USA)
- ✓ Ethanol, min. 96 %, následně denaturovaný 10 % propan-2-olu (Lihovar Chrudim, ČR)
- ✓ D-(-)-Fruktosa, ≥ 99 % (Sigma, USA)
- ✓ D-(+)-Glukosamin hydrochlorid, ≥ 99 % (Sigma, USA)
- ✓ D-(+)-Glukosa, monohydrát, p.a. (Penta, ČR)
- ✓ GOD-POD reagent (BioVendor, ČR)
- ✓ Hydrogenfosforečnan didraselný, p.a., min. 99 % (Lach:NER, ČR)
- ✓ Hydrogenfosforečnan disodný, dodekahydrát, p.a., min. 98 % (Lach:NER, ČR)
- ✓ Hydroxid sodný, p.a., min. 98 % (Lach:NER, ČR)

- ✓ Chlorid sodný, p.a., min. 99,5 % (Lach:Ner, ČR)
- ✓ Invertasa z *S. cerevisiae*, 200 – 300 jednotek/mg (Fluka, USA)
- ✓ Kvasničný autolyzát (Yeast extract; A. Constantino & C. S.p.A., IT)
- ✓ Kyselina bromovodíková, p.a., 48 % (Lach:Ner, ČR)
- ✓ Kyselina fosforečná, p.a., 84 – 87 % (Lach:Ner, ČR)
- ✓ Kyselina chlorovodíková, p.a., 35 – 38 % (Penta, ČR)
- ✓ DL-Kyselina mléčná, 90 % (Fluka, USA)
- ✓ Kyselina sírová, p.a., min. 95 % (Lach:Ner, ČR)
- ✓ Laktosa, monohydrát, p.a., min. 99 % (Penta, ČR)
- ✓ D-(+)-Maltosa, monohydrát, čistá (Penta, ČR)
- ✓ Metanol, p.a., min. 99,5 % (Lach:Ner, ČR)
- ✓ PDA agar (Potato Dextrose Agar M096, HiMedia, IN)
- ✓ Propan-2-ol – isopropanol (Shell, NL)
- ✓ Sacharosa (Cukrovary TDT, ČR)
- ✓ Síran hořečnatý, heptahydrát (Penta, ČR)
- ✓ Struktol SB 2020 (Struktol, USA)
- ✓ Uhličitan sodný, bezvodý, p.a., min. 99 % (Lach:Ner, ČR)

3.3. Použitý kmen

Schizophyllum commune #127

- původ kmene byl odstraněn z důvodu utajení -

Kmen byl dlouhodobě uchováván ve zkumavkách na šikmých PDA agarech při 4–8 °C a podle potřeby byl přeočkováván na čerstvé Petriho misky s PDA agarem, na kterých byl uchováván při 4-8 °C a používán po dobu maximálně dvou měsíců od naočkování. Kultivace misek probíhala v inkubátoru při 29°C po dobu 7 dnů.

PDA agar

Postup přípravy a složení média byl uveden na obalu. Jednalo se o kompletní živnou půdu, nevyžadující žádnou další úpravu během přípravy pracovních Petriho misek a zkumavek se šikmým agarem.

Složení

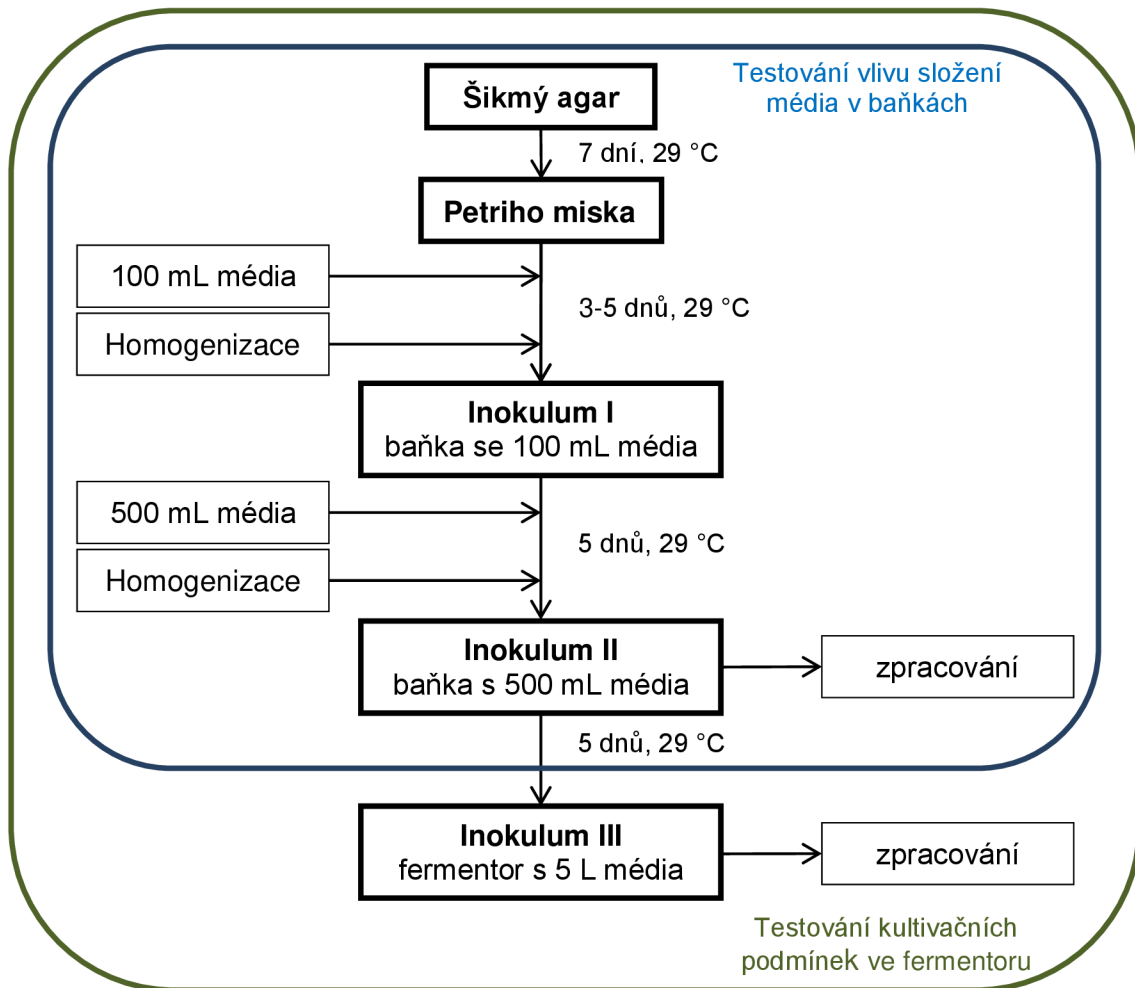
Bramborový extrakt (infuze)	200 g/L
Dextróza	20 g/L
Agar	15 g/L
Finální pH (při 25 °C) = 5,6 ± 0,2.	

PDA médium bylo připraveno v množství 25 mL na Petriho misku o průměru 90 mm a 15 mL na jednu zkumavku (vnitřní průměr 26 mm, délka 155 mm). Navážka práškového PDA (39 g/L) byla rozmíchána v požadovaném objemu demineralizované vody, dle množství připravovaných misek a zkumavek a sterilizována v autoklávu (20 min/121°C). Po sterilizaci byla přelita na sterilní Petriho misky, případně do zkumavky při přípravě šikmých agarů.

3.4. Příprava inokul

Pro všechny kultivace byly ze zásobní kultury ve zkumavkách na šikmých PDA agarech připraveny čerstvé kultury na Petriho miskách tak, že malý kousek narostlé kultury ze šikmého agaru (cca 5 x 5 mm) byl přenesen do středu Petriho misky a ta byla inkubována v termostatu při 29 °C po dobu 7 dní, následně umístěna do chladničky při 4 – 8 °C a používána po dobu maximálně 2 měsíců od naočkování. Příprava inokul I, II a III v Erlenmeyerových baňkách je uvedena ve schématu na obrázku 11. Vždy po naočkování 10 %

inokulem byly baňky umístěny do třepačky s nastavenými otáčkami 140 rpm, po dané době byly uchovávány až do použití při 4 – 8 °C. Podle typu experimentu byla inokula II zpracována buď jako vzorky, nebo použita k zaočkování fermentoru.



Obrázek 11 Schéma postupu přípravy jednotlivých stupňů inokul

3.5. Živná půda pro baňky a fermentor

Média pro přípravu inokul I a II byly sterilizovány 20 minut při 121 °C v Erlenmeyerových baňkách objemu 250 mL (pracovní objem 100 mL) a 1000 mL (pracovní objem 500 mL). Při kultivacích ve fermentoru byla živná půda sterilizována přímo ve fermentoru 20 minut při 121°C a byla vždy doplněna přídatkem odpěňovacího činidla Struktol SB 2020.

Složení základní polosyntetické živné půdy:

Sacharosa 35 g/L, kvasničný autolyzát 3 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, po rozpuštění pH upraveno koncentrovanou HCl na hodnotu 5,5 - 5,8.

Připravená inokula uchovávaná při laboratorní teplotě byla použitelná maximálně jeden týden, uchovávaná v chladničce až jeden měsíc.

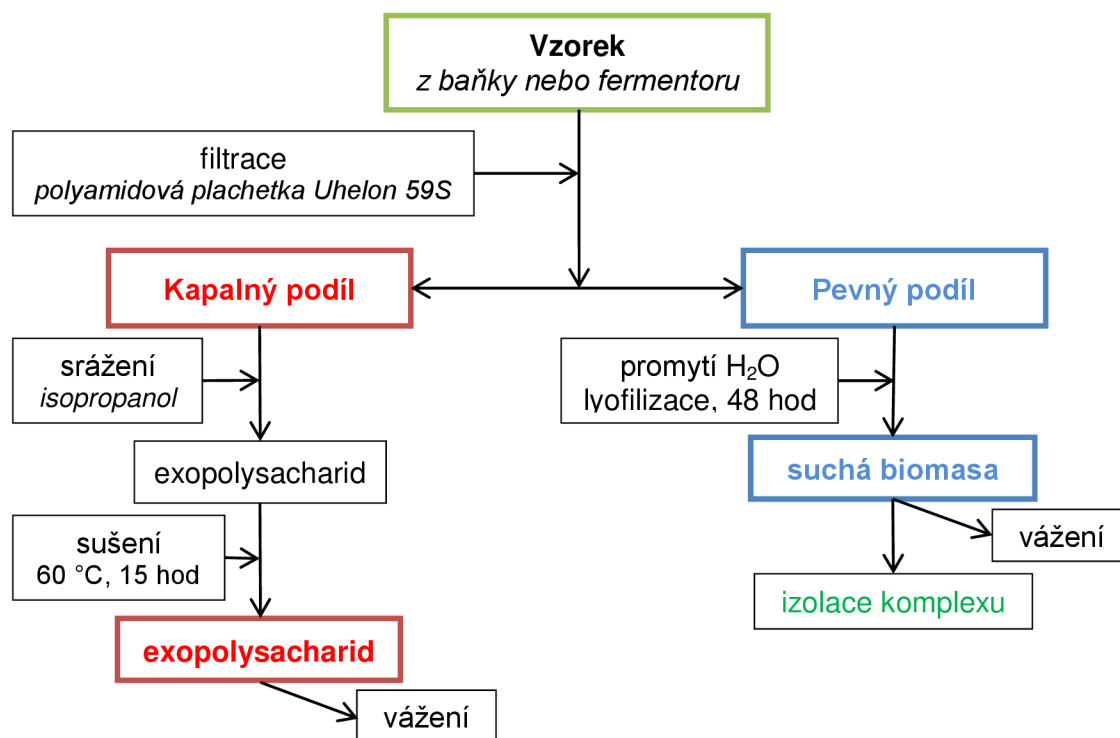
Tato živná půda byla použita pro přípravu inokula I a při experimentech v Erlenmeyerových baňkách sloužila jako standard pro srovnání výtěžku biomasy a produkce exopolysacharidu. Při kultivacích ve fermentoru byla použita pro inokulum II. Při sledování vlivu složení média odpovídalo složení konkrétní živné půdy danému experimentu.

3.6. Podmínky pokusů

Standardní doba kultivace byla pro všechny pokusy 5 dní, teplota kultivace byla 29 °C. Pro pokusy v Erlenmeyerových baňkách byly nastaveny otáčky orbitální třepačky 140 rpm s výkyvem 2,5 cm. Pro kultivace ve fermentoru byly nastaveny otáčky míchadla na 150 rpm s použitím tří míchadel typu Rushton.

3.7. Zpracování vzorků

Po ukončení kultivace byly vzorky z Erlenmeyerových baněk (inokula II) nebo fermentoru dále zpracovány. Stručný postup zpracování vzorků je uveden schematicky na obrázku 12.



Obrázek 12 Schématické znázornění zpracování vzorků

3.7.1. Stanovení množství exopolysacharidu

Kapalný podíl, po filtraci přes polyamidovou plachetku Uhelon 59S, byl srážen isopropanolem (poměr 1 : 1,5). Vysrážený schizophyllan (SCH) byl separován na plachetce Uhelon 59S a sušen v sušárně při 60°C po dobu 15 hodin. Jeho množství bylo následně stanoveno gravimetricky a produkce byla vyjádřena v g/L.

3.7.2. Výtěžek biomasy

Biomasa, po oddělení kapalné části filtrací přes polyamidovou plachetku Uhelon 59S, byla promyta 500 mL demineralizované vody a zfiltrována. Poté byla zamražena a lyofilizována. Množství biomasy bylo následně stanoveno gravimetricky a produkce byla vyjádřena v g/L.

Množství biomasy bylo, spolu s obsahem izolovatelného komplexu, klíčovým parametrem, který určuje výtěžnost chitosan-glukanového komplexu po kultivaci a provedené izolaci.

3.7.3. Stanovení obsahu sacharosy a glukosy

Obsah glukosy byl stanoven biochemickým kitem GOD-POD: Po oxidaci glukosy na glukonovou kyselinu specifickou glukooxidázou reaguje uvolněný peroxid vodíku se

substrátem (4-aminophenazon a fenol) Tinderoou reakcí za vzniku barevného komplexu chinoniminu, jehož absorbance odpovídá množství glukosy.

V kapalném podílu, po filtraci přes polyamidovou plachetku Uhelon 59S, byl stanoven obsah sacharosy a glukosy. Vzorek (0,1 mL) byl vhodně zředěn demineralizovanou vodou a rozdělen na dvě poloviny, k jedné byla přidána invertáza (2 μ L v PBS pufru, 2,44 jednotky) a sacharosa byla štěpena na glukosu a fruktosu (90 minut, 37°C); druhá polovina byla k analýze použita bez úpravy. K 1 mL reagenčního roztoku bylo přidáno 10 μ L vzorku a po 10 minutové inkubaci při 37 °C byla měřena absorbance při 500 nm. Obsah glukosy ve vzorku bez přídavku invertasy byl určen přímo výpočtem z kalibrační křivky. Obsah sacharosy byl vypočítán ze stanoveného množství glukosy, přičemž její koncentrace byla vypočítána z rozdílu absorbancí vzorku štěpeného invertasou a vzorku bez přídavku invertasy. Obsah sacharosy a glukosy byl vyjádřen v g/L.

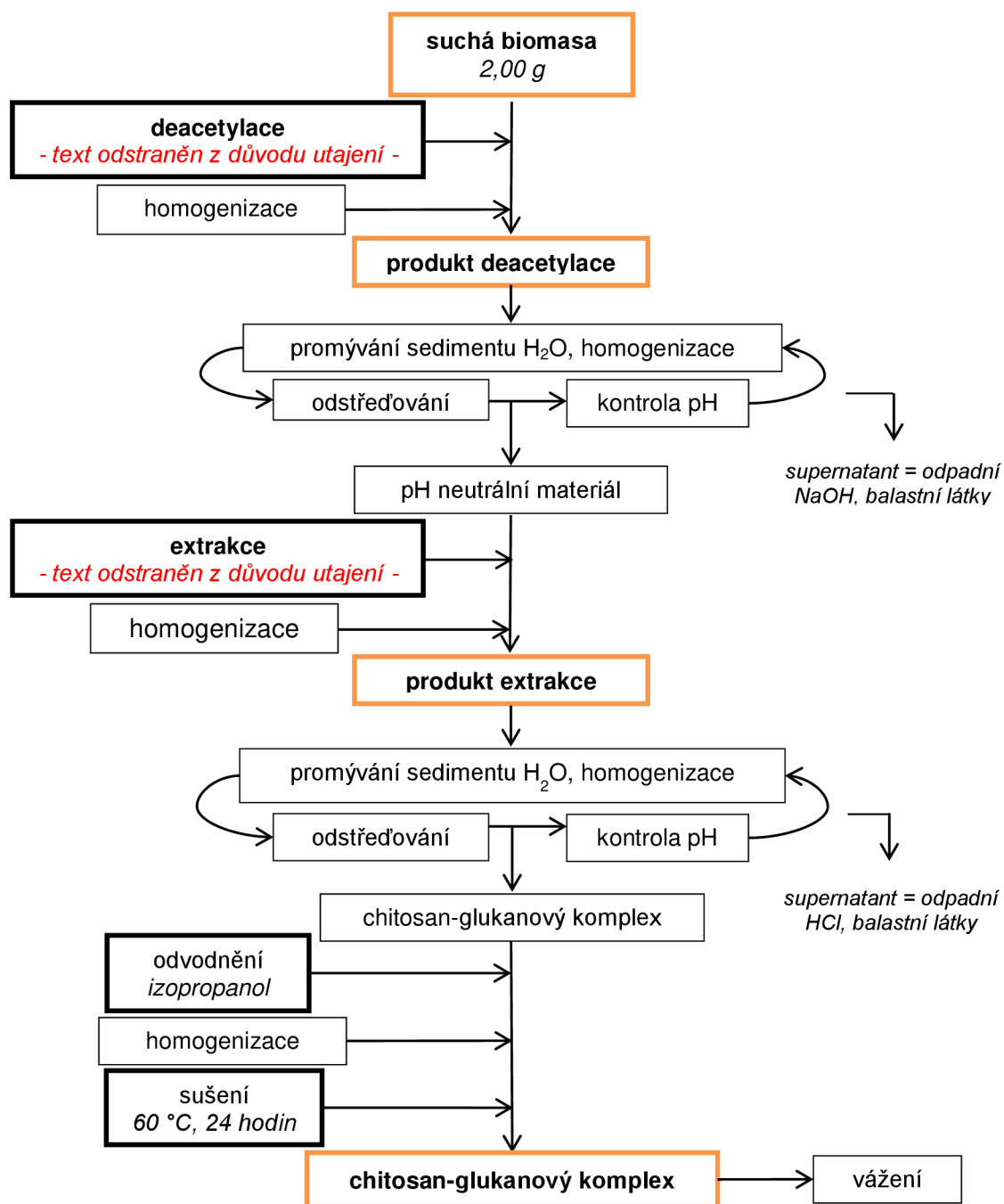
3.8. Stanovení množství izolovatelného chitosan-glukanového komplexu

V principu bylo využito dvou oddělených částí, tyto části jsou schematicky znázorněny na obrázku 13:

1) Deacetylace chitinu obsaženého v biomase použitím horkého hydroxidu s vymytím barevných pigmentů, proteinů a v alkalickém prostředí rozpustných β -glukanů, následovaná čištěním a promýváním demineralizovanou vodou.

2) Extrakce silnou minerální kyselinou za zvýšené teploty, vedoucí k částečnému rozrušení vazeb chitin/chitosan-glukanu, následovaná čištěním a promýváním demineralizovanou vodou. V tomto kroku došlo i ke zlepšení barvy a změně fyzikálních vlastností produktu.

Množství chitosan-glukanového komplexu (CHGK) bylo následně stanoveno gravimetricky a produkce byla vyjádřena v g/g mycelia nebo po vynásobení 100 jako % obsahu v myceliu.



Obrázek 13 Schématické znázornění izolace chitosan-glukanového komplexu z biomasy

3.9. Metody analýzy chitosan-glukanového komplexu

Uvedení produktu do poloprovozního ověřování a později do výroby předchází nejen jeho charakterizace, ale především určení mezi vybraných parametrů a samozřejmě i doporučení a vytvoření standardních zkušebních postupů, které umožní zvolené meze kontrolovat. Protože šlo o produkt, který byl ve vodě i mnoha dalších rozpouštědlech prakticky nerozpustný, nastala při jeho analýze celá řada problémů a omezení. U některých metod bylo možné využít schopnosti produktu vytvořit ve vodném prostředí viskózní suspenzi (pH, vodivost, množství glukosaminu), u jiných metod byla možná analýza v pevné fázi (IČ spektrum, nasákavost, elementární analýza), ale pro některé metody bylo nejprve nutné

provést převedení do rozpustné formy, respektive provést celkovou hydrolyzu vzorku (určení základních složek komplexu ^{13}C NMR), případně bylo výsledek možné určit až kombinací více postupů a metod (stupeň deacetylace chitinu, poměr chitosanu/chitinu a glukanu).

3.9.1. Stanovení obsahu sušiny a popela

Sušina byla stanovena z 500 mg vzorku po 6 hodinovém sušení při teplotě 105 °C. Ztráta hmotnosti v % pak vyjadřovala ztrátu sušením a odečtená od 100 % určovala sušinu vzorku v %. Limit pro sušinu produktu byl určen ≥ 90 %.

Popel byl stanoven z 500 mg vzorku po 6 hodinovém žhání při teplotě 800 °C. Nespalitelný zbytek v % původní hmotnosti pak vyjadřoval množství popela ve vzorku v %. Limit pro obsah popela v produktu byl určen ≤ 1 %.

3.9.2. Stanovení pH a vodivosti

K 450 mg vzorku bylo přidáno 30 mL demineralizované vody, vzorek byl homogenizován na dispergačním zařízení po dobu 3 minut při 5000 rpm a míchán minimálně 15 hodin na magnetické míchačce. Po této době byla ve vzniklé suspenzi měřena hodnota pH a vodivost. Limit pro hodnotu pH byl určen 4,5 – 6,0 a pro vodivost ≤ 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

3.9.3. Stanovení nasákavosti a nasávací mohutnosti

Hodnota nasákavosti a nasávací mohutnosti vyjadřovala schopnost vzorku pojmout do své struktury přidanou vodu nebo PBS pufr. Použity byly dvě metody stanovení – ve fólii (nasákavost) a v práškovém produktu (nasávací mohutnost). Hodnota nasákavosti nebyla závislá na výchozí struktuře vzorku, protože metodě předcházelo vysušení vzorku do tvaru kompaktní fólie. Hodnota nasávací mohutnosti odrážela lépe vliv struktury vzorku.

Metoda stanovení nasákavosti

K 500 mg vzorku bylo přidáno 25 mL demineralizované vody, vzorek byl homogenizován po dobu 5 minut dispergačním zařízením při 5000 rpm a poté míchán minimálně 15 hodin na magnetické míchačce. Část vzniklé gelovité suspenze byla nalita do malých Petriho misek o průměru 3 cm a sušena v sušárně při teplotě 60 °C do úplného vysušení (minimálně 15 hodin). Vzniklý film, nebo jeho část, o hmotnosti 100 mg, byl zvážen (m_1) a ponechán 1 hodinu bobtnat v 5 ml PBS pufru. Poté byl nabobtnalý film jemně osušen netkanou textilií a zvážen (m_2). Rozdíl hmotností ($m_2 - m_1$), po přepočítání na navážku, udávalo kolik PBS pufru je daný vzorek schopen pojmout, vyjadřoval tak hodnotu nasákavosti v g/g. Limit pro získanou hodnotu nebyl definován.

Metoda stanovení nasávací mohutnosti

Do vysušené klíčky z měděného drátu o průměru 45 mm a o známé hmotnosti (průměr drátu 0,1 mm, velikost ok 1 mm) bylo volně vloženo 500 mg vzorku bez pěchování. Klíčka byla zvážena a ponořena do demineralizované vody na 30 sekund. Poté byla vyjmuta, ponechána po dobu 30 sekund volně odkapat a opět zvážena. Stejný postup byl opakován s prázdnou vysušenou klíčkou. Nasávací mohutnost vzorku byla vypočítána z rozdílů hmotností klíčky se vzorkem před ponořením do vody a po nasátí vody (po odečtu množství vody zachycené na povrchu klíčky). Po přepočítání na 1 gram vzorku byla získána informace o nasávací mohutnosti v g/g. Limit pro získanou hodnotu nebyl definován.

3.9.4. Stanovení obsahu dusíku

Samotná znalost obsahu dusíku sama o sobě o poměru chitosanu(chitinu) a glukanu nevyovídala, k tomu bylo potřeba stanovit také obsah glukosaminu. Po zjištění jeho obsahu

bylo možné nejen vypočítat stupeň deacetylce chitinu (acetylce chitosanu), ale i poměr chitosanu/chitinu a glukanu v komplexu.

Elementární analýza

Tato analýza byla provedena na externím pracovišti (Výzkumný ústav organických syntéz, Rybitví, ČR). Vzorek byl spálen a obsah dusíku byl určen z objemu uvolněného plynu. Metoda je univerzální a poskytuje informaci o veškerém přítomném dusíku.

Metoda Elson – Morgan

Metoda byla popsána C. G. Chenem [127] a upravena pro naši potřebu. Stanovení bylo založeno na hydrolyze vzorku 6 M kyselinou chlorovodíkovou (způsobí deacetylaci *N*-acetyl-D-glukosaminu na glukosamin) s následnou kondenzační reakcí glukosaminu s acetyl-acetonem za zvýšené teploty v alkalickém prostředí, kdy vznikl kondenzovaný pyrrolový derivát. Jeho následnou reakcí s *N,N*-dimethyl-*p*-aminobenzaldehydem v kyselém prostředí vznikl růžově zbarvený produkt, jeho množství bylo úměrné množství přítomného glukosaminu. Metodou byl tedy stanoven pouze dusík přítomný ve formě *N*-acetyl-glukosaminu a glukosaminu.

20 mg vzorku bylo hydrolyzováno přidavkem 40 mL 6 M HCl při teplotě 120 °C pod zpětným chladičem. Po dané době byl vzorek při teplotě 60 °C odpařen na vakuové odparce při nastavených 20 mbar a 2x promyt 30 mL demineralizované vody. Odparek byl rozpuštěn v 10 ml demineralizované vody a byl získán pracovní roztok vzorku k analýze.

Kalibrační křivka byla sestavena z vodného roztoku glukosaminu (glukosamin hydrochlorid 8,6 mg/ 100 mL). Do zkumavek bylo napipetováno 250 µL vodného roztoku Na₂CO₃ (26,5 g/ 100 mL), přidáno 12,5 µL acetylacetonu a 1000 µL kalibračního standardu (rozsah 0 – 1000 µL) anebo vhodně naředěného vzorku. Zkumavky byly umístěny do vodní lázně o teplotě 90 °C na 60 minut. Po zchlazení byly přidány 2 mL etanolu, a po promíchání bylo přidáno 250 µL Ehrlichova činidla (1,6 g *N,N*-dimethyl-*p*-aminobenzaldehyd rozpuštěný v 30 ml etanolu a 30 ml 36 % HCl). Po promíchání byl vzorek ponechán 30 minut v temnu, a poté byla změřena absorbance vzniklého barevného produktu při vlnové délce 530 nm. Obsah glukosaminu ve vzorku byl vypočítán z kalibrační křivky a vyjádřen v %.

3.9.5. Stanovení obsahu glukosaminu

Obsah glukosaminu byl důležitou charakteristikou vzorku, která s výsledkem celkového obsahu dusíku sloužila k určení poměru chitosanu/chitinu a glukanu v komplexu. Zároveň umožnila vypočítat stupeň deacetylce chitinu.

Byla zvolena titrační metoda podle T. A. Khana [128] určující množství volných aminoskupin. Přímou metodou, tedy bez hydrolyzy, byl stanoven pouze glukosamin (také odpovídající množství dusíku), bez započítání přítomného *N*-acetyl-D-glukosaminu. Metoda byla založena na přidavku HBr ke vzorku, kyselina se vážala pouze na volné skupiny glukosaminu za vzniku glukosamin hydrobromidu a po vymytí nadbytku nevázané HBr mohl být vzorek titrován NaOH. Množství uvolněné a následně titrované HBr pak přímo odpovídalo obsahu aminoskupin, tedy i obsahu glukosaminu.

500 mg vzorku bylo mícháno 15 hodin se 100 mL 0,2 M HBr. Po této době bylo do suspenze přidáno dalších 50 mL 9 M HBr a ještě 10 minut byl vzorek míchán. Suspenze zorku byla odstředěna (20 minut, 5000 rpm) a sediment byl převeden na fritu (S3 nebo S4), na které byl promýván směsí metanol/dietyléter (1:1) tak dlouho, než bylo dosaženo neutrálního pH. Nerozpustný podíl z frity byl převeden na 4 hodiny do bezvodého dietyléteru a po jeho odfiltrování přes fritu byl sušen při 60 °C po dobu 15 hodin. Z takto upraveného

vzorku bylo naváženo 200 mg, ke kterým bylo přidáno 100 mL demineralizované vody, a vzorek byl na magnetické míchačce míchán 15 hodin. Vzniklá suspenze byla titrována 0,1 M roztokem NaOH do neutrálního pH (měřeno pH metrem). Obsah glukosaminu byl vypočítán ze spotřeby NaOH a byl vyjádřen v % obsahu. Limit obsahu glukosaminu byl určen 4 – 7 %.

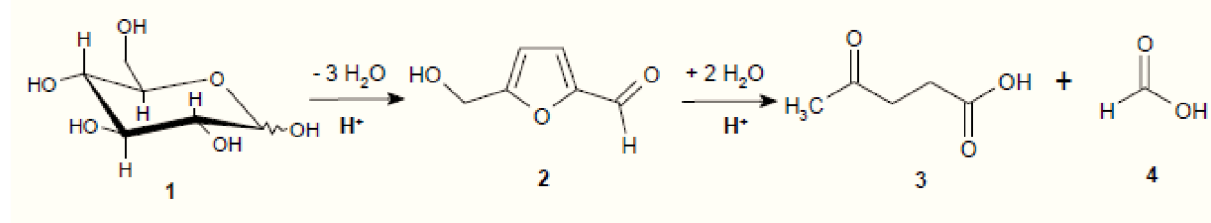
3.9.6. Stanovení deacetylce chitinu, určení poměru glukanu a chitinu/chitosanu

Pro stanovení poměru chitosanu/chitinu a glukanu a stupně deacetylce chitinu bylo nutno zkombinovat výsledky dvou předcházejících analýz, a to metody stanovení obsahu glukosaminu a stanovení obsahu dusíku.

Pokud byl znám obsah glukosaminu z titrační metody, bylo možné vypočítat, jaký byl v tomto známém množství obsah dusíku. Z analýzy celkového množství dusíku bylo známo, jaké množství dusíku odpovídalo součtu dusíku zastoupeného v glukosaminu a *N*-acetylglukosaminu. Rozdíl celkového množství dusíku a množství dusíku glukosaminu pak určoval množství dusíku odpovídající *N*-acetylglukosaminu. Součet hmotností vypočítaného množství glukosaminu a *N*-acetylglukosaminu znamenal zastoupení chitosanu a chitinu ve vzorku. Poměr glukosaminu a *N*-acetylglukosaminu určoval stupeň deacetylce chitinu.

3.9.7. NMR analýza vzorků

NMR analýzy vzorků byla využita ke stanovení základních složek chitosan-glukanového komplexu po kyselé hydrolyze. V čistém vzorku měly být přítomny pouze tyto složky: glukosamin a kyselina levulinová (kyselina 4-oxopentanová), jako degradační produkt kyselé hydrolyzy glukózy [129]. Znázornění degradace glukózy, jako základní složky glukanu, na kyselinu levulinovou je na obrázku 14:



Obrázek 14 Kyselé hydrolyza glukosy na kyselinu levulinovou; 1 = glukosa, 2 = 5-hydroxymethyl-2-furalaldehyd, 3 = kyselina levulinová a 4 = kyselina mravenčí [129]

Přítomnost jiných píků a chemických posunů na ¹³C NMR spektrech by naznačovala, že vzorek obsahoval příměsi. Při této analýze bylo nutné počítat s omezením týkajícím se citlivosti metody, proto tato metoda poskytovala informativní výsledky s jistou mezí detekce. Touto metodou mohly být stanoveny hlavní složky chitosan-glukanového komplexu a mohla být ověřena nepřítomnost jiných monosacharidů, pocházejících ze zbytků buněčných stěn. Limity byly určeny následovně: přítomnost chemických posunů odpovídajících glukosaminu a kyselině levulinové, nepřítomnost jiných chemických posunů.

30 mg vzorku bylo hydrolyzováno 60 mL 6 M HCl pod zpětným chladičem při nastavené teplotě 120 °C. Po 8 hodinách byl vzorek, při teplotě lázně 60 °C, odpařen na vakuové odparce při nastavených 20 mbar a 2x promyt přídávkem 50 mL demineralizované vody. Odparek byl rozpuštěn v deuterované vodě a filtrován přes membránový filtr, následně bylo měřeno ¹³C NMR spektrum.

3.9.8. FTIR analýza vzorků

Měření IR spekter produktů bylo využitelné především pro určení shody s referenčním spektrem chitosan-glukanového komplexu, respektive k vyhledání charakteristik získaných

spekter. Na jejich základě mohlo být rozhodnuto, zda materiál odpovídal nebo neodpovídal referenčnímu spektru. Limit byl tedy určen jako shoda se spektrem referenčního vzorku a přítomnost charakteristických píků.

Infračervené spektrum bylo měřeno v oblasti $500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ze vzorků připravených ve formě tablet: 30 mg vzorku bylo roztíráno spolu s 60 mg KBr v achátové třecí misce. Tableta byla lisována v hydraulickém lisu za tlaku 90 kN po dobu 1 minuty. Vylisovaná tableta byla opakovaně roztírána, tak dlouho, dokud nebyl vzorek dostatečně homogenní.

3.9.9. Analýza struktury vzorků

SEM analýza ukázala mikrostrukturu vzorku. Mikrofotografie vzorků byly pořízeny na elektronovém skenovacím mikroskopu po předchozím pozlacení vzorků, které probíhalo po dobu 120 sekund při intenzitě proudu 18 mA. Vlastní fotografie byly pořízeny při těchto nastavených podmínkách: napětí 2,44 – 10 kV, detektor: SE, zvětšení 300 – 20 000 krát, vakuum: high, vzdálenost mezi objektivem a vzorkem: 4 – 5 mm.

Tato analýza nemá při mezioperační kontrole ani při běžné analýze větší význam. Vzorky byly fotografovány z důvodu jejich charakterizace v pevném stavu, např. kvůli určení struktury a porovnání s obdobnými vzorky.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Kultivace *Schizophyllum commune* za účelem produkce chitosan-glukanového komplexu

Schizophyllum commune je biotechnologicky cennou kulturou, je využíván jako producent biologicky aktivního exopolysacharidu, β -(1,3;1,6)-glukanu, schizophyllanu [130, 131]. Tato houba je známá svým rychlým růstem a produkcí mycelia při submerzní kultivaci, která z této houby dělá potenciálně využitelný zdroj pro produkci chitosan-glukanového komplexu. Existuje však problém, který ze submerzí kultivace *Schizophyllum commune* s cílem izolovat komplex dělá spíše výzvu. Tímto problémem je separace mycelia po kultivaci. Při submerzní kultivaci *Sch. commune* je uvolňován extracelulární polysacharid, který se hromadí v prostředí. Jeho produkce dramaticky zvyšuje viskozitu a tvoří kolem buněk vrstvu, která prakticky znemožní oddělení biomasy z média po kultivaci.

Vzhledem k této skutečnosti předcházela zahájení této studie selekce vhodného kmene *Sch. commune*. Cílem bylo najít takový kmen, který by byl schopný vysoké produkce komplexu, zároveň s nízkou produkcí exopolysacharidu. Byl proveden screening kmenů z několika sbírek (data nejsou uvedena). Screening kmenů *Schizophyllum commune*, provedený na standardní polosyntetické půdě (kapitola 3.5) ukázal, že vybraný kmen *Sch. commune* #127 ze všech testovaných kmenů produkoval největší množství chitosan-glukanového komplexu a byl také nejvhodnější pro separaci mycelia po kultivaci, protože produkoval nejméně exopolysacharidu. Na základě tohoto byl kmen #127 vybrán jako potenciální producent CHGK.

Prvním krokem diplomové práce bylo nalezení takových kultivačních parametrů, pomocí kterých by se dala zvýšit produkce CHGK, a spolu s tím, byly zachovány technologicky vhodné vlastnosti mycelia, teda nízká produkce viskózního exopolysacharidu schizophyllanu.

Pokusy byly provedeny, podle jejich charakteru, buď v Erlenmeyerových baňkách, nebo ve fermentoru. Hodnoty uvedené jako výsledky byly získány průměrem 3 – 6 opakování. Velikost rozptylu hodnot byla dána především kvalitou inokul I, všechny pokusy a opakování nebylo možné z technického důvodu provést z jedné pasáže *Sch. commune* a identického inokula I. Kvalita inokul a viabilita *Sch. commune* byla dána podmínkami očkování, např. vlivem působení střížných sil dispergačního zařízení na inokula I během očkování a přípravy inokul II.

Produkce chitosan-glukanu může být zvýšena dvěma cestami: zvýšením obsahu chitin-glukanu v myceliu anebo zvýšením růstu biomasy. Faktory ovlivňující akumulaci chitin-glukanu v myceliu basidiomycet jsou velmi málo prostudovány a neexistují prakticky žádná dostupná literární data. Mnohem více informací je dostupných o růstu mycelia a regulaci syntézy exopolysacharidů. Množství biomasy basidiomycet a biosyntéza exopolysacharidů je značně ovlivněna složením média, zvláště pak zdrojem uhlíku a dusíku, přísadkami jako aminokyselin, fytohormonů, vitamínů a minerálních látek, rostlinných olejů, je ovlivněna vlivem pH média, velikostí míchání a aerací a dalších [7, 59, 130-137].

Za účelem zvýšení produkce CHGK a zachování technologicky vhodných vlastností mycelia, tedy nízká produkce viskózního exopolysacharidu, byl testován vliv zdroje uhlíku a jeho množství v živné půdě, koncentrace zdroje dusíku, pH média a intenzity aerace na růst mycelia, akumulaci chitosan-glukanového komplexu v myceliu a syntézu schizophyllanu.

4.1.1. Testování zdroje uhlíku

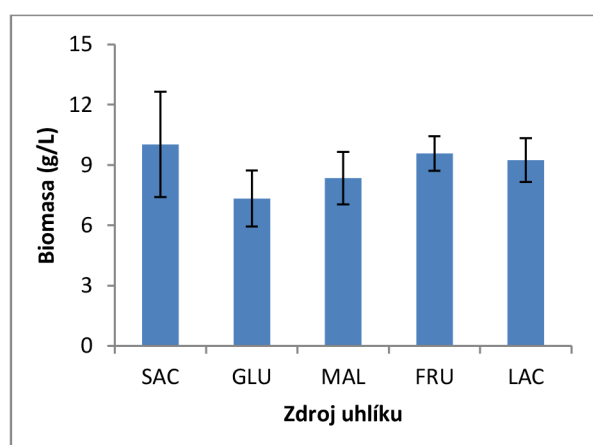
Je známé, že zdroj uhlíku hraje důležitou roli v metabolismu hub. Výběr optimálního zdroje uhlíku podporuje růst mycelia a produkci metabolitů, je také důležitý pro tvorbu specifických produktů sacharidické povahy. Jako nejlepší zdroje uhlíku pro kultivaci některých basidiomycet jsou: U *Coriolus hirsutus* a *Crinipellis schevczenkovi* popsány arabinosa, xylosa, glukosa a galaktosa [138], pro *Pleurotus ostreatus* fruktosa a glukosa [139], *Lentinus edodes* glukosa, laktosa a škrob [140, 141]. Nejlepšího růstu a produkce polysacharidu bylo u *Tremella mesenterica* dosaženo na médiu se sacharosou, maltosou a manitolem [142].

Byl testován vliv různého zdroje uhlíku na produkci CHGK kmenem #127. Jako zdroj uhlíku k testování byly, na základě literatury pro kultivace basidiomycet, vybrány: Sacharosa, glukosa, fruktosa, laktosa a maltosa [54, 56, 57, 143, 144]. Zdroj uhlíku byl testován v kultivacích v Erlenmeyerových baňkách na polosyntetické živné půdě, ve které sacharosa byla nahrazena stejným množstvím jiného sacharidu.

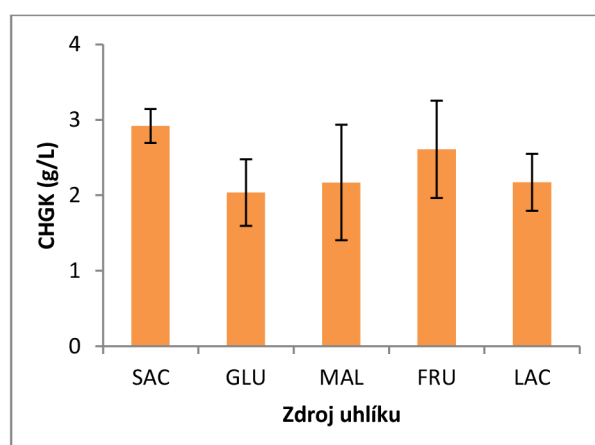
Výsledky ukázaly, že testované zdroje uhlíku výrazně ovlivnily růst mycelia a produkci exopolysacharidu *Sch. commune*. Výtěžky mycelia se pohybovaly mezi $7,3 \pm 1,40$ g/L a $10,02 \pm 2,62$ g/L (Graf 1). Z hlediska produkce biomasy byla nejlepším zdrojem uhlíku v tomto pořadí: sacharosa > fruktosa = laktosa > maltosa > glukosa. Syntéza exopolysacharidu schizophyllanu měla, na rozdíl od biomasy, na testovaných zdrojích uhlíku odlišný trend. Nejvyšší produkce SCH byla zaznamenána na živné půdě s glukosou, zatímco sacharosa a laktosa ukázaly produkci, ze všech testovaných cukrů, nejnižší (Tabulka 8).

Obsah CHGK v biomase se pohyboval v rozmezí 23,5 – 29,1 %. Spolu s tím, ve většině případů, obsah CHGK koreloval s produkcí SCH. Tedy, podobně syntéze SCH, nejnižší tvorba CHGK byla zaregistrována na živné půdě s laktosou. Glukosa zároveň s vyšší tvorbou exopolysacharidu stimulovala i tvorbu CHGK. Nicméně, kultivací na sacharose bylo dosaženo nejvyšší produkce CHGK zároveň s nízkou syntézou SCH (Tabulka 8).

Pokud byl vztažen poměr produkce CHGK a SCH na 1 g biomasy v %, projevilo se nejvíce na laktose, že metabolismus *Sch. commune* #127 byl ve větší míře nasměrován na tvorbu buněčné stěny než na syntézu extracelulárního polysacharidu, kde byl poměr CHGK k SCH 94,76 : 5,24, následovala sacharosa s poměrem 92,69 : 7,31, naopak glukosa měla poměr k tvorbě SCH nejvyšší a to 82,89 : 17:11. Tyto výsledky ukazují na závislost zdroje uhlíku při produkci exopolysacharidu na úkor polysacharidu buněčné stěny (Tabulka 8).



Graf 1 Vliv zdroje uhlíku na růst mycelia



Graf 2 Vliv zdroje uhlíku na produkci CHGK

Výtěžnost kultivace tak, díky relativně malým rozdílům obsahu komplexu v biomase, byla dána především množstvím vyprodukované biomasy (Graf 2). Maximální výtěžnosti CHGK tak bylo dosaženo na médiu se sacharosou.

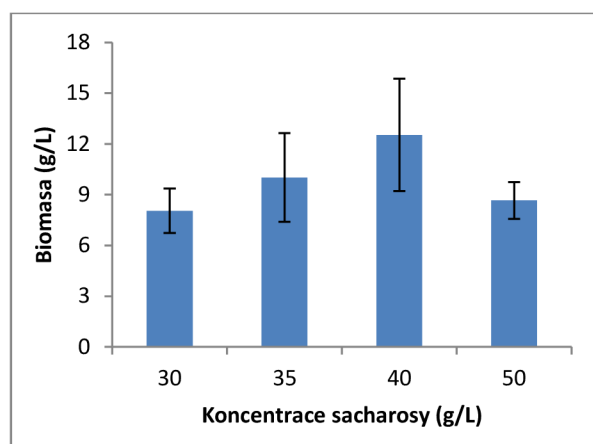
Tabulka 8 Vliv zdroje uhlíku na produkci CHGK a SCH, poměr produkce obou polysacharidů

	Výtěžek na 1 g mycelia		Poměr produkce CHGK a SCH	
	CHGK (g/g)	SCH (g/g)	CHGK (%)	SCH (%)
Sacharosa	0,291 ± 0,023	0,023 ± 0,012	92,69	7,31
Glukosa	0,278 ± 0,060	0,057 ± 0,019	82,89	17,11
Maltosa	0,260 ± 0,092	0,035 ± 0,005	88,20	11,80
Fruktosa	0,273 ± 0,067	0,026 ± 0,004	91,95	8,75
Laktosa	0,235 ± 0,041	0,013 ± 0,004	94,76	5,24

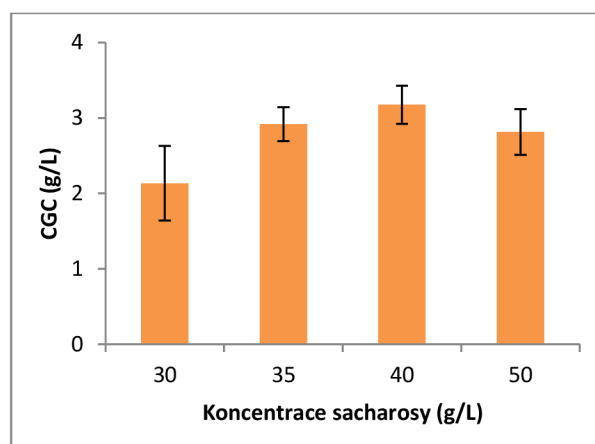
Na základě těchto výsledků byla, jako nejvhodnější zdroj uhlíku pro produkci CHGK *Schizophyllum commune* #127, vybrána sacharosa. Ta způsobila největší nárůst mycelia s nejvyšším obsahem CHGK, zároveň s nízkou syntézou SCH, což je ve výrobě důležité pro dobrou separaci mycelia, kdy tento krok předchází izolaci CHGK.

Následujícím krokem bylo určení vlivu koncentrace sacharosy v živné půdě na výtěžek CHGK a syntézu exopolysacharidu. Sacharosa byla testována v koncentraci 30 – 50 g/L, testována byla v Erlenmeyerových baňkách.

Ukázalo se, že zvýšením koncentrace sacharosy z 30 g/l na 40 g/L, může být produkce mycelia zvýšena více než o 25 % (Graf 3). Další přidání sacharosy mělo na růst houby negativní vliv. Koncentrace sacharosy v médiu měla opačný vliv na produkci schizophyllanu, produkce exopolysacharidu byla maximální při navážce sacharózy 50 g/L, a minimální při 40 g/L (Tabulka 9).



Graf 3 Vliv navážky SAC na růst mycelia



Graf 4 Vliv navážky SAC na produkci CHGK

V závislosti na množství sacharosy v živné půdě byla pozorována i změna množství obsaženého chitosan-glukanového komplexu (Tabulka 9). Obsah CHGK v biomase se měnil v rozmezí 25,3 – 32,5 %. Maxima obsahu CHGK bylo dosaženo při navážce sacharózy 50 g/L a minima v koncentraci 40 g/L. Při přepočítání na výtěžnost CHGK v g/L média, se projevil rozhodující vliv nárůstu mycelia a tak maximální produkce CHGK bylo dosaženo na živné půdě s obsahem 40 g/L sacharózy (Graf 4).

Pokud byl vztážen poměr produkce CHGK a SCH na 1 g biomasy v %, nejvíce CHGK bylo vyprodukováno v koncentraci sacharózy 40 g/L, kde byl poměr CHGK k SCH

94,07 : 5,93, naopak nejmenší produkce CHGK a největší produkce SCH byla nalezena při koncentraci sacharosy 30 g/L 89,39 : 10,61 (Tabulka 9).

Tabulka 9 Vliv koncentrace sacharosy na produkci CHGK a SCH, poměr produkce polysacharidů

SAC (g/L)	Výtěžek na 1 g mycelia		Poměr produkce CHGK a SCH	
	CHGK (g/g)	SCH (g/g)	CHGK (%)	SCH (%)
30	0,265 ± 0,061	0,032 ± 0,004	89,39	10,61
35	0,291 ± 0,023	0,023 ± 0,012	92,69	7,31
40	0,253 ± 0,020	0,016 ± 0,008	94,07	5,93
50	0,325 ± 0,035	0,032 ± 0,007	90,95	9,05

Na základě těchto výsledků byla, jako nejvhodnější pro produkci CHGK vybrána koncentrace sacharosy 40 g/L. Ta způsobila nejvyšší nárůst biomasy ($12,5 \pm 3,32$ g/L) a nejnižší obsah exopolysacharidu ($0,20 \pm 0,10$ g/L), tím zůstala zachována vysoká technologická využitelnost biomasy, tedy schopnost snadné separace mycelia.

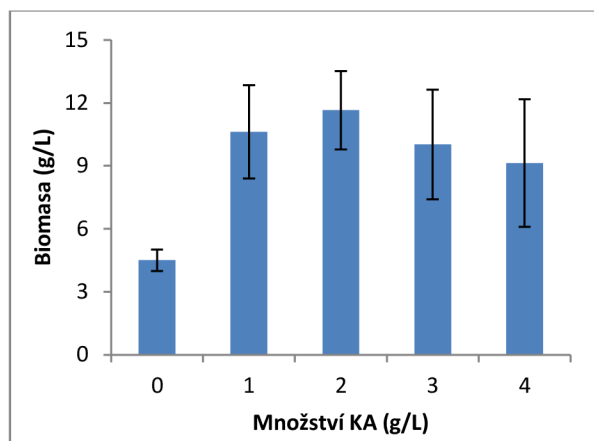
4.1.2. Testování poměru zdroje dusíku ke zdroji uhlíku

Basidiomycety jsou schopny využívat jako zdroj dusíku jak anorganické soli, tak komplexní organické zdroje [140, 145-147]. Při kultivacích basidiomycet se ukazuje, že preferovaným zdrojem dusíku jsou organické látky [148-151]. V používané polosyntetické půdě je kvasničný autolyzát jediným zdrojem dusíku, neslouží tedy pouze jako doplněk, který v médiu hraje roli zdroje esenciálních růstových látek.

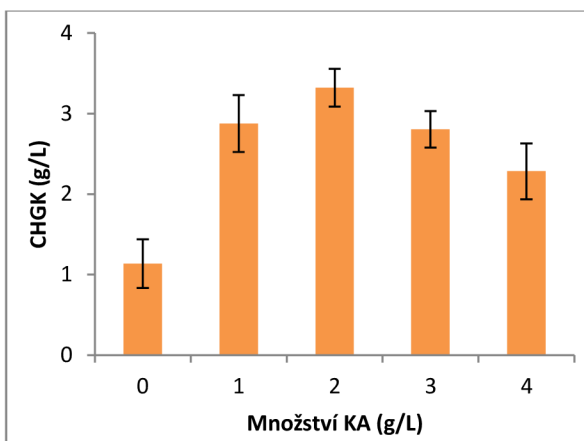
Byl testován vliv koncentrace kvasničného autolyzátu na růst *Sch. commune* #127, produkci CHGK a extracelulárního polysacharidu. KA byl přidáván do média v koncentracích 0 – 4 g/L a testování probíhalo v Erlenmeyerových baňkách.

Jak ukazuje graf 5, množství biomasy bylo na množství přidaného KA závislé. Na živné půdě bez přídavku KA byl jediným zdrojem dusíku KA, který se tam dostal z inokula I při očkování inokula II (inokulováno 10 % inokula I obsahujícím 3 g/L KA), tam byl také nejmenší nárůst mycelia. Zvýšením koncentrace KA na 2 g/L byla produkce mycelia zvýšena o více než 250 %. Další přidání KA inhibovalo růst houby, což bylo pravděpodobně způsobeno vysokou koncentrací esenciálních látek.

Pokus ukázal, že množství KA v médiu mělo větší vliv na produkované množství exopolysacharidu, než koncentrace zdroje uhlíku. Při zvýšení koncentrace KA z 1 g/L na 4 g/L obsah SCH stoupl o více než 485 % (Tabulka 10).



Graf 5 Vliv množství KA na růst mycelia



Graf 6 Vliv množství KA na produkci CHGK

Množství chitosan-glukanového komplexu v myceliu, bylo na množství zdroje dusíku závislé, i když výsledné rozdíly byly velmi malé a to v rozmezí 25 – 28,5 %, maxima bylo dosaženo v koncentraci 2 g/L KA, minima při 4 g/L (Tabulka 10). Maximální výtěžnosti CHGK bylo dosaženo v koncentraci 2 g/l KA, kdy množství CHGK bylo závislé na množství izolovaného mycelia a mělo tak podobnou závislost (Graf 6).

Pokud byl vztažen poměr produkce CHGK a SCH na 1 g biomasy v %, ukázalo se, že se vzrůstající koncentrací KA klesala produkce CHGK na úkor produkce exopolysacharidu schizophyllanu, bez přídavku KA do média nebyl exopolysacharid tvořen vůbec (Tabulka 10).

Tabulka 10 Vliv zdroje dusíku na produkci CHGK a SCH, poměr produkce obou polysacharidů

KA (g/L)	Poměr zdrojů C:N (g:g)	Výtěžek na 1 g mycelia		Poměr produkce CHGK a SCH	
		CHGK (g/g)	SCH (g/g)	CHGK (%)	SCH (%)
0	35:0	0,253 ± 0,067	0,000 ± 0,000	100	0
1	35:1	0,271 ± 0,033	0,007 ± 0,001	97,63	2,37
2	35:2	0,285 ± 0,020	0,015 ± 0,002	94,97	5,03
3	35:3	0,280 ± 0,023	0,023 ± 0,004	92,42	7,58
4	35:4	0,250 ± 0,038	0,038 ± 0,012	86,90	13,10

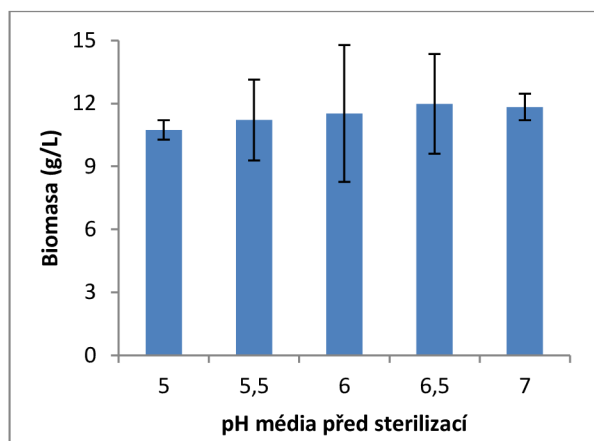
Na základě těchto výsledků byla, jako nejvhodnější koncentrace KA pro produkci CHGK vybrána koncentrace 2 g/L. Tato koncentrace KA odpovídala poměru obsahů zdroje uhlíku k zdroji dusíku 35 : 2. Za těchto podmínek bylo dosaženo nejvyššího nárůstu biomasy (11,65 ± 1,86 g/L) a nízkého obsahu exopolysacharidu schizophyllanu, tím zůstala zachována vysoká technologická využitelnost biomasy.

4.1.3. Testování počátečního pH živné půdy

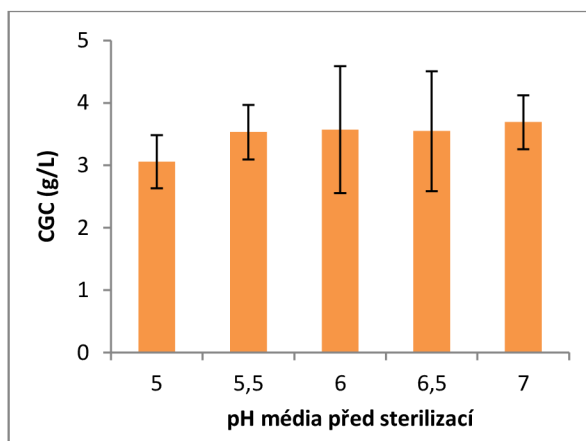
Hodnota počátečního pH média je důležitým faktorem, který u basidiomycet řídí růst i produkci metabolitů během submerzní kultivace, má také vliv na morfologii buněk, resp. velikost pelet [7, 54, 55, 152-154]. Dřevokazné basidiomycety jsou schopny růstu v širokém rozmezí hodnot pH, pro *Sch. commune* jsou příznivější podmínky mírně kyselého pH [56]. Existuje několik prací o vlivu pH na produkci chitosanu izolovaného z mikromycet. Například Amorim a kol. [155] popsali výchozí hodnotu pH jako regulátor produkce chitosanu z *Mucor racemosus* a *Cunninghamella elegans*. Nepodařilo se najít žádné literární informace popisující vliv hodnoty pH na obsah CHGK v biomase basidiomycet.

Vliv počátečního pH média na produkci CHGK a exopolysacharidu byl sledován během kultivací v Erlenmeyerových baňkách. Hodnota pH byla upravena koncentrovanou HCl ještě před sterilizací živné půdy.

Výsledky ukazují, že rozdíl v množství produkované biomasy *Sch. commune* #127 není na výchozí hodnotě pH v testovaném rozmezí výrazně odlišný. S vyšší hodnotou pH produkce biomasy nepatrně stoupala k maximu pH 6,5 (Graf 7). Mnohem výraznější bylo ovlivnění množství vyprodukovaného exopolysacharidu (Tabulka 11), kdy se stoupající hodnotou pH jeho množství stoupalo. Maximalní produkce SCH byla zjištěna při pH 7.



Graf 7 Vliv pH média na růst mycelia



Graf 8 Vliv pH média na produkci CHGK

Ukázalo se, že hodnota pH neměla podstatný vliv na obsah chitosan-glukanového komplexu v biomase, i když jistého maxima bylo dosaženo při pH 5,5, rozdíl jeho obsahu byl malý a pohyboval se v rozmezí 28,5 – 31,5 % (Tabulka 11).

Pokud byl vztažen poměr produkce CHGK a SCH na 1 g biomasy v %, ukázalo se, že byl se změnou pH velmi malý, i když se stoupající hodnotou pH mírně stoupal ve prospěch produkce exopolysacharidu (Tabulka 11).

Tabulka 11 Vliv počátečního pH média na produkci CHGK a SCH, poměr produkce polysacharidů

pH	Výtěžek na 1 g mycelia		Poměr produkce CHGK a SCH	
	CHGK (g/g)	SCH (g/g)	CHGK (%)	SCH (%)
5	0,285 ± 0,040	0,014 ± 0,004	95,32	4,68
5,5	0,315 ± 0,039	0,016 ± 0,002	95,15	4,85
6	0,310 ± 0,088	0,017 ± 0,004	94,70	5,30
6,5	0,296 ± 0,080	0,023 ± 0,004	92,92	7,08
7	0,298 ± 0,080	0,026 ± 0,004	91,92	8,08

Díky tomu, že hodnota pH měla minimální vliv jak na obsah CHGK v biomase tak i na růst mycelia, výtěžnost CHGK při testovaných pH byla velice podobná a pohybovala se v rozmezí $3,06 \pm 0,42$ g/L a $3,57 \pm 1,01$ g/L (Graf 8). Směrem k vyšším hodnotám pH rostlo množství produkovaného exopolysacharidu, to by vedlo k technologickým problémům při separaci biomasy. Z tohoto důvodu, jako nejvhodnější pro produkci komplexu, byla vybrána výchozí hodnota pH 6.

4.1.4. Vliv délky kultivace na tvorbu CHGK *Schizophyllum commune* #127

Z literatury je známé, že proces tvorby buněčné stěny obsahující CHGK u *Sch. commune* probíhá přes prekurzor, kterým je vodorozpustný β -glukan [156]. V rostoucí hyfě je jeho zastoupení vyšší a jen menší část β -glukanů je propojena s chitinem. Z tohoto důvodu se dá předpokladat, že obsah CHGK v myceliu se bude měnit v závislosti na fázi růstu houby.

Pro ověření této teorie byla studována produkce komplexu během kultivace *Sch. commune* #127. Kultivace byla provedena ve fermentoru objemu 30 litrů s 20 litry živné půdy. Vzorky z fermentoru byly odebírány ve 24 hodinových intervalech od zaočkování, a byl stanoven nárůst mycelia, obsahu CHGK a produkce SCH.

Jak ukazují výsledky (Tabulka 12), množství biomasy stoupalo až do 7 dne kultivace, kdy dosáhlo maxima $13,1 \pm 1,82$ g/L, stejně tak stoupalo i množství produkovaného exopolysacharidu, které 7 den dosahovalo maximálních $0,38 \pm 0,09$ g/L. Obsah CHGK v biomase stoupal postupně k maximu 33 % (6 den kultivace), celková výtěžnost komplexu byla maximální 7 den, protože obsah biomasy byl nejvyšší. Rozdíl ve výtěžnosti produktu mezi 5 dnem ($3,70 \pm 0,42$ g/L) a 7 dnem kultivace ($4,19 \pm 0,34$ g/L) byl 13,2 %.

Tabulka 12 Růstová a produkční křivka kultivace *Sch. commune* #127 ve 30L fermentoru

Den kultivace	pH	Sacharosa (g/L)	Biomasa (g/L)	SCH (g/L)	CHGK (g/L)	CHGK v myceliu (%)
1	6,05	37,65	2,22	0,05	-	-
2	5,40	33,83	6,08	0,13	1,28	21
3	5,08	25,57	8,74	0,15	1,97	23
4	4,93	16,46	10,68	0,18	2,94	28
5	5,03	9,86	11,92	0,23	3,70	31
6	5,14	3,62	12,00	0,25	3,96	33
7	5,24	0,50	13,10	0,38	4,19	32

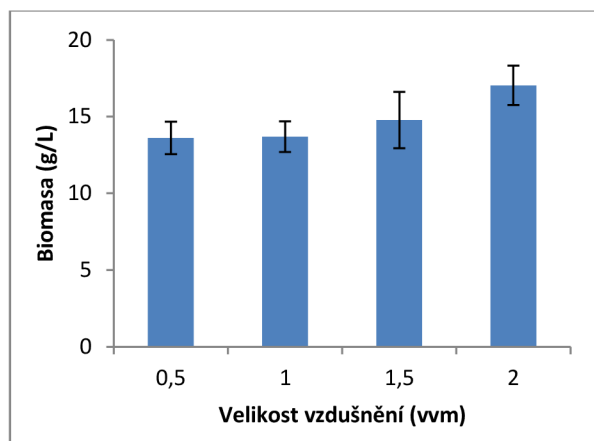
Hodnota pH klesala do 4 dne kultivace, kdy dosáhla minima. Množství sacharosy v médiu postupně klesalo až do 7 dne, kdy byla takřka všechna spotřebována (Tabulka 12).

4.1.5. Testování intenzity vzdušnění při submerzní kultivaci

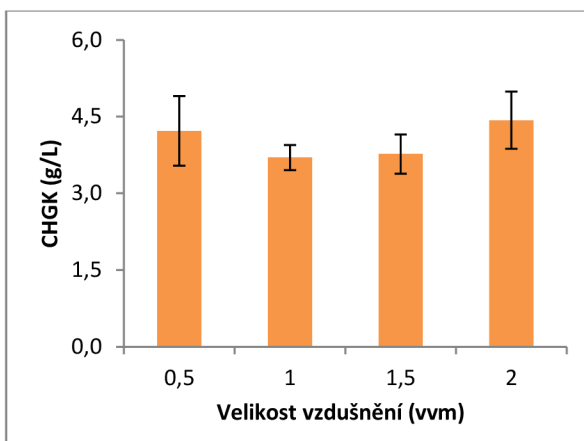
Intenzita vzdušnění má výrazný vliv na produkci biomasy, exopolysacharidů, endopolysacharidů a jiných metabolitů. Má souvislost s hodnotou $K_L a$ – koeficientem přenosu kyslíku (h^{-1}) a ovlivňuje tak jeho saturaci v médiu [52, 53]. Je popsáno, že míra aerace má vliv na tvorbu stěnových glukanů kvasinek [157]. Při submerzní kultivaci *Antrodia cinnamomea* vysoká koncentrace kyslíku podporovala buněčný růst a produkci polysacharidů, inhibovala však tvorbu triterpenoidů [158]. U *Paecilomyces sinclairii* mělo vyšší vzdušnění pozitivní vliv jak na množství biomasy, tak množství produkovaného exopolysacharidu [53].

Vliv intenzity vzdušnění byl studován u kultivací ve fermentoru, byla použita polosyntetická živná půda (kap. 3.5). Do živné půdy byla ještě před sterilizací přidána odpěna v objemu 1 mL. Intenzita vzdušnění byla nastavena mezi 0,5 až 2 vvm.

Výsledky ukázaly závislost intenzity vzdušnění na množství produkované biomasy, s vyšším vzdušněním bylo dosaženo vyššího výtěžku biomasy, rozdíl mezi 0,5 vvm a 2 vvm byl 25 % (Graf 9). Ukázalo se, že ve fermentoru, na rozdíl od Erlenmeyerových baněk, byla produkce exopolysacharidu minimální. Vyprodukované množství exopolysacharidu bylo při všech intenzitách vzdušnění velmi nízké, korelace jeho obsahu na intenzitě vzdušnění nebyla nalezena (Tabulka 13).



Graf 9 Vliv vzdušnění na růst mycelia



Graf 10 Vliv vzdušnění na produkci CHGK

Množství přítomného komplexu v biomase s rostoucí intenzitou vzdušnění fermentoru výrazně klesalo (Tabulka 13). Rozdíl mezi nejvyšším obsahem při 0,5 vvm a nejnižším obsahem při 1,5 vvm byl 18 %. Po započítání rozdílného obsahu komplexu v myceliu a množství mycelia se ukázalo, že nejlepších výtěžků komplexu bylo dosaženo při 2 vvm ($4,43 \pm 1,18$ g/L), i když tento rozdíl nebyl od druhého nejlepšího výsledku při 0,5 vvm ($4,22 \pm 0,38$ g/L) příliš významný, činil zhruba 5 %. Výtěžnost produktu při hodnotách vzdušnění 1 vvm ($3,70 \pm 0,70$ g/L) a 1,5 vvm ($3,77 \pm 0,59$ g/L) byly výrazně nižší, protože klesající obsah komplexu v biomase nebyl dostatečně kompenzován vyšším výtěžkem biomasy.

Pokud byl vztažen poměr produkce CHGK a SCH na 1 g biomasy v %, ukázalo se, že vzhledem k nízké produkci SCH se poměr produkce CHGK a SCH při změně intenzity vzdušnění prakticky neměnil (Tabulka 13).

Tabulka 13 Vliv intenzity vzdušnění na produkci CHGK a SCH, poměr produkce obou polysacharidů

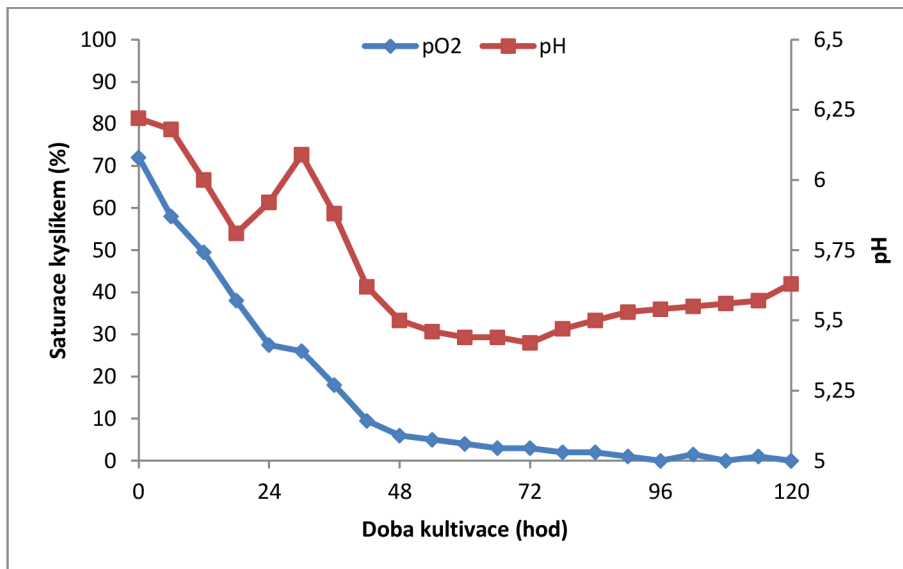
Aerace (vvm)	Výtěžek na 1 g mycelia		Poměr produkce CHGK a SCH	
	CHGK (g/g)	SCH (g/g)	CHGK (%)	SCH (%)
0,5	$0,310 \pm 0,050$	$0,0059 \pm 0,0004$	98,14	1,86
1	$0,270 \pm 0,018$	$0,0044 \pm 0,0005$	98,40	1,60
1,5	$0,255 \pm 0,026$	$0,0068 \pm 0,0003$	97,42	2,58
2	$0,260 \pm 0,033$	$0,0035 \pm 0,0001$	98,66	1,34

Schizophyllum commune, jako aerobní organismus, potřebuje pro svůj efektivní růst a tvorbu buněčné stěny dostatečný přísun kyslíku. Možným vysvětlením poklesu obsahu CHGK v myceliu s vyšším vzdušněním může být krátká doba kultivace. Při vyšším vzdušnění byla houba ve fázi aktivního růstu, výhodné by tedy bylo prodloužit dobu kultivace. Intenzivní vzdušnění a dlouhá doba kultivace nejsou v průmyslovém měřítku akceptovatelné, mimo ekonomických důvodů jsou to i vyšší pění při vyšším vzdušnění a také ztráta objemu média odpařováním.

- text byl odstraněn z důvodu utajení -

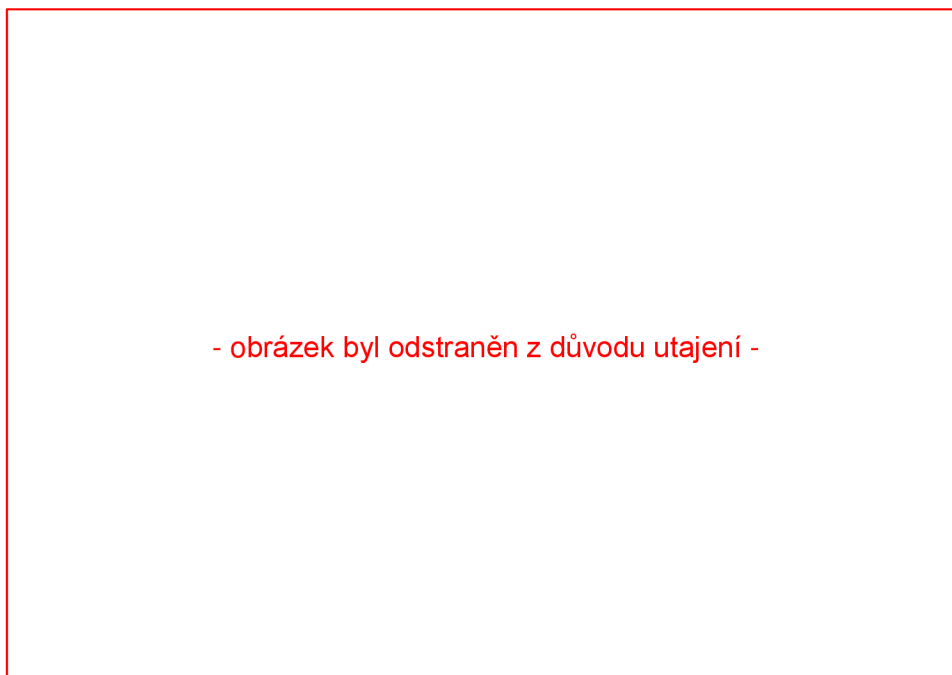
Kultivace - text byl odstraněn z důvodu utajení - byla ověřena ve fermentoru s pracovním objemem 5 litrů a při nastaveném vzdušnění 0,5 vvm. Pro kultivaci bylo použito médium, které bylo změněno pro zvýšení produkce CHGK a potlačení syntézy exopolysacharidu: Sacharosa 40 g/L, kvasničný autolyzát 2 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, pH média před sterilizací 6,0 – 6,3.

Pro porovnání byla provedena kultivace za stejných podmínek, - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Experiment ukázal, že za podmínek kultivace - text byl odstraněn z důvodu utajení - bylo získáno $10,66 \pm 0,66$ g/L biomasy s obsahem komplexu 31 %, což koresponduje s celkovým výtěžkem $3,30 \pm 0,20$ g/L CHGK, dále bylo izolováno $0,30 \pm 0,06$ g/L schizophyllanu. Experiment ukázal, že během prvních 2 dnů kultivace došlo ke snížení hladiny saturace kyslíkem až k nulové hodnotě, kdy tato saturace přetrvává do konce kultivace (Graf 11).



Graf 11 Změna saturace média kyslíkem (pO_2) a hodnoty pH během kultivace

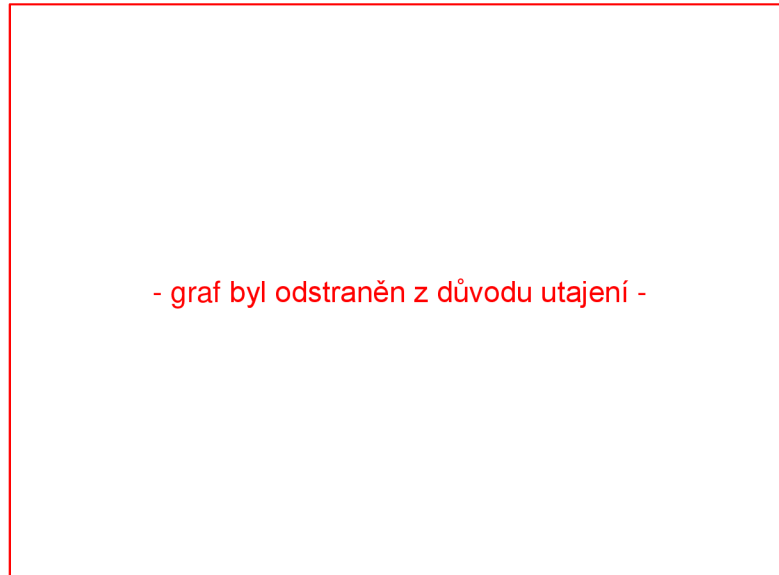
- text byl odstraněn z důvodu utajení - Princip je schematicky znázorněn na obrázku 15:



Obrázek 15 - text byl odstraněn z důvodu utajení -

- text byl odstraněn z důvodu utajení - množství mycelia, které stoupl o 23 % na $13,11 \pm 1,07$ g/L, tak na výtěžnost produktu CHGK která stoupla o 37 % na $4,22 \pm 0,68$ g/L. Zvýšil se také podíl komplexu v myceliu z 31 % na 35 %. Zároveň s tím klesl obsah produkovaného exopolysacharidu o 60 % na $0,12 \pm 0,04$ g/L.

Záznam průběhu kultivace (Graf 12) ukazuje - text byl odstraněn z důvodu utajení -:



raf 12 - text byl odstraněn z důvodu utajení -

Pokus ukázal, že *Schizophyllum commune* #127 pro produkci CHGK potřebuje dostatečný přísun kyslíku, a že - text byl odstraněn z důvodu utajení - je klíčovým faktorem, pomocí kterého může být významně zvýšeno množství biomasy i obsah CHGK v myceliu, a spolu s tím může být potlačena produkce exopolysacharidu. Dá se také předpokladat, že - text byl odstraněn z důvodu utajení - ovlivní intenzitu metabolismu, tedy i potřeby houby s ohledem na množství živin.

- text byl odstraněn z důvodu utajení -

Výsledky kultivací ve fermentoru ukázaly, že - text byl odstraněn z důvodu utajení - vedlo ke zvýšení množství izolovaného mycelia o 28 % ($16,78 \pm 1,21$ g/L), mnohem významnější bylo zvýšení množství izolovaného CHGK, které stoupl o 47 % ($6,63 \pm 0,50$ g/L) CHGK. V myceliu se navíc zvýšil podíl komplexu na 39,5 %. Zároveň s tím ale došlo také k navýšení produkce exopolysacharidu schizophyllanu o 117 % ($0,26 \pm 0,06$ g/L).

Podíváme-li se a srovnáme-li záznam průběhu kultivace obou pokusů, Graf 12 (2 g/L KA) a Graf 13 (4 g/L KA), můžeme si všimnout významné změny:

- text byl odstraněn z důvodu utajení -

- graf byl odstraněn z důvodu utajení -

Graf 13 - text byl odstraněn z důvodu utajení -

- text byl odstraněn z důvodu utajení -

4.1.6. Závěry testování vlivu kultivačních parametrů na produkci CHGK

Výsledky ukázaly, že obsah CHGK v biomase *Schizophyllum commune* #127 při submerzní kultivaci byl vysoce variabilní parametr, který se mohl pohybovat, pod vlivem všech testovaných parametrů, mezi 23,5 až 39,5 %. Menších změn jeho zastoupení v myceliu bylo možné dosáhnout změnou zdroje uhlíku a jeho koncentrace, množstvím kvasničného autolyzátu v médiu a vhodnou úpravou pH. Zásadní, pro jeho obsah v myceliu, bylo však navýšení způsobené - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Každý z testovaných faktorů měl vliv i na syntézu exopolysacharidu.

Studie ukázala, že nejvhodnější z testovaných zdrojů uhlíku pro produkci CHGK *Sch. commune* #127 byla sacharosa. Při testování vlivu koncentrace zdroje dusíku bylo nejlepší produkce komplexu dosaženo na médiu s poměrem navážek zdrojů dusíku a uhlíku 2 : 35. Nejvhodnější pro produkci komplexu byla výchozí hodnota pH média 6.

- text byl odstraněn z důvodu utajení -

Přesto, na základě této práce, byla s ohledem na výtěžnost CHGK navržena tato úprava polosyntetického média: - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Za těchto podmínek *Sch. commune* #127 produkovalo $6,63 \pm 0,50$ g/L CHGK po 5 denní kultivaci, kdy toto množství bylo o 100,1 % vyšší než s použitím polosyntetického média a počátečními podmínkami kultivace. Produkce exopolysaccharidu byla $0,26 \pm 0,06$ g/L, tedy stále minimální a umožňující dobrou využitelnost biomasy.

Existují možnosti zvýšení produkce CHGK. Může jí být například optimalizace přídavku kvasničného autolyzátu a zdroje uhlíku (sacharosy) spolu s - text byl odstraněn z důvodu utajení -.

4.2. Izolace chitosan-glukanového komplexu

Izolace chitosan-glukanového komplexu a dalších složek je v principu obdobná a často patentově chráněná (kap. 2.6). Nejčastěji bývají tyto produkty izolovány během několika kroků, při kterých bývá mycelium nejprve zbaveno bílkovin, lipidů a barviv krátkým působením alkálií nebo kyselin při relativně nízkých teplotách a koncentracích po krátkou

dobu [100, 102-104, 107]. Následuje inkubace biomasy s koncentrovaným roztokem hydroxidu za vysokých teplot při dlouhodobém působení, přičemž dochází k částečné deacetylaci přítomného chitinu na chitosan a rozrušení struktury chitosan-glukanového komplexu [97-99, 104]. Uvolněný chitosan je často extrahován do kyseliny a ve formě rozpustné soli a srážen úpravou pH do alkalické oblasti nebo organickým rozpouštědlem [99, 102, 104, 105]. K degradaci chitin-glukanového nebo chitosan-glukanového komplexu jsou popsány nejen čistě chemické metody, kdy produkty jako *N*-acetyl-D-glukosamin, D-glukosamin a chitosan jsou získávány působením specifických enzymů jako např. chitináz, β -*N*-acetyl-glucosaminidáz, glukanáz apod. [101, 106].

Druhým krokem této práce bylo testování různých podmínek izolace chitosan-glukanového komplexu s ohledem na výtěžek a vlastnosti získaných produktů. Cílem této části práce bylo najít takové podmínky (koncentrace NaOH, metoda přidání NaOH a typ kyseliny při extrakci), které by byly realizovatelné ve výrobě a vedly by k přípravě vyhovujících produktů.

Hodnoty uvedené jako výsledky byly získány průměrem 3 – 6 opakování.

4.2.1. Testování koncentrace hydroxidu a metody jeho přidání

Deacetylace suché biomasy byla prováděna standardně pomocí NaOH při teplotě - text byl odstraněn z důvodu utajení - za míchání po dobu - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Po několikanásobném promytí demineralizovanou vodou byla pasta extrahována HCl po dobu - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Pro všechny tyto experimenty bylo vstupní surovinou vysušené a homogenizované mycelium *Schizophyllum commune* #127 ve formě tzv. digestovaného mycelia, aby bylo možné sledovat závislost výtěžku a fyzikálně-chemických vlastností produktů na zvolených parametrech. Podmínky deacetylace a extrakce byly voleny na základě předchozích experimentů (data nejsou uvedena).

Příprava digestovaného mycelia: Zamražená biomasa, po kultivaci ve fermentoru, byla rozmrazena a následně filtrací přes plachetku Uhelon 59S odvodněna, poté míchána - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Po zchlazení byla odsáta přes Büchnerovu nálevku a promývána demineralizovanou vodou do neutrálního pH, poté odvodněna regenerovaným a absolutním izopropanolem a vysušena. Takto získané digestované mycelium zaručovalo opakovatelnost a reprodukovatelnost výsledků, které by bylo při použití různých šarží biomasy nedosažitelné, zvláště díky testování a ověřování vlivu složek média a parametrů kultivace.

U všech vzorků bylo možné popsat tento obecný postup přípravy: - text byl odstraněn z důvodu utajení - g mycelia bylo buď rozmícháno v demineralizované vodě a následně byl přidán pevný NaOH a po jeho rozpuštění byl objem doplněn na - text byl odstraněn z důvodu utajení -, nebo byla přidána přímo do - text byl odstraněn z důvodu utajení - roztoku NaOH. Průběh zpracování vzorků odpovídal v principu schématu z kapitoly 3.8. Zvolený objem přidaného NaOH (- text byl odstraněn z důvodu utajení - mL/g suchého mycelia) zajišťoval dobrou homogenizaci suspenze a míchatelnost za použití magnetického míchadla a magnetické míchačky.

Spolu s testováním různé koncentrace NaOH, jako množství NaOH na 1 gram suchého mycelia: - text byl odstraněn z důvodu utajení -, byly ověřovány také dvě metody přidavku (NaOH rozpouštěn v suspenzi mycelium/voda a NaOH přidán jako roztok k suchému myceliu), z nichž každý má své výhody a nevýhody:

1) NaOH rozpouštěn v suspenzi mycelia s vodou

- a. **Výhody:** Rychlé dosažení vysoké teploty (rozpouštěcí teplo NaOH), bezpečnost a manipulace ve výrobě (NaOH přisypáván za stálého míchání násypkou), rychlost provedení.
- b. **Nevýhody:** Nutnost použít NaOH bez mechanických nečistot (nečistoty se stávají kontaminanty nerozpustného produktu), požadavek intenzivního míchání suspenze a postupného přisypávání NaOH (riziko sedimentace NaOH na dně nádoby), nárůst viskozity během rozpouštění NaOH (problémy s homogenizací).

2) K biomase přidán připravený roztok NaOH

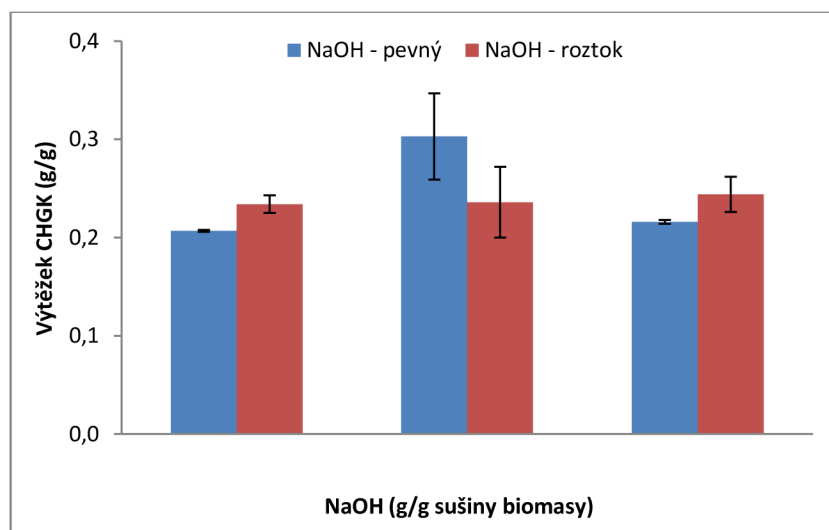
- a. **Výhody:** Minimalizace rizika kontaminace produktu mechanickými nečistotami z NaOH (možnost filtrace roztoku), homogenita suspenze (mycelium přidáváno k roztoku NaOH), nižší viskozita suspenze (oproti přidavku pevného NaOH).
- b. **Nevýhody:** Rizikovost (manipulace s 25 – 30 % roztokem NaOH), náklady na ohřev (není využito rozpouštěcí teplo NaOH), nutnost pořízení dalších zařízení (rozpouštěcí nádoba NaOH, filtrační zařízení a moduly, čerpadlo a příslušné armatury).

Na základě výsledků provedených pokusů (Tabulka 14, Graf 14) bylo patrné, že existoval rozdíl ve výtěžnosti CHGK v závislosti na koncentraci NaOH i na technice jeho přidání. Pokud byl pevný NaOH rozpouštěn v suspenzi mycelia ve vodě, byl výtěžek nejvyšší při použití - text byl odstraněn z důvodu utajení -. V případě přidání roztoku NaOH k suchému myceliu bylo maxima dosaženo v jeho koncentraci - text byl odstraněn z důvodu utajení -.

Podle hodnocení zbarvení izolovaných produktů se ukázalo, že se stoupající koncentrací přidaného NaOH se, bez ohledu na techniku jeho přidání, výrazně zlepšuje barva produktu, přičemž CHGK izolované v nejvyšší koncentraci NaOH byly krémově bílé, barva produktů s klesající koncentrací NaOH byla okrová až světle hnědá.

Tabulka 14 Vliv techniky přidavku a koncentrace NaOH na výtěžek chitosan-glukanového komplexu

NaOH rozpouštěn v suspenzi mycelium/voda	
NaOH (g/g suché biomasy)	Výtěžek CHGK (g/g)
- text byl odstraněn z důvodu utajení -	0,207 ± 0,001
- text byl odstraněn z důvodu utajení -	0,303 ± 0,044
- text byl odstraněn z důvodu utajení -	0,216 ± 0,002
NaOH přidán jako roztok k suchému myceliu	
NaOH (g/g suché biomasy)	Výtěžek CHGK (g/g)
- text byl odstraněn z důvodu utajení -	0,234 ± 0,009
- text byl odstraněn z důvodu utajení -	0,236 ± 0,036
- text byl odstraněn z důvodu utajení -	0,244 ± 0,018



Graf 14 Vliv koncentrace NaOH a metody jeho přidavku na výtěžek chitosan-glukanového komplexu; modře - přidavek pevného NaOH, červeně - přidavek roztoku NaOH

Pokud byly měřeny další charakteristiky izolovaných produktů (Tabulka 15), nasákavost ve fólii, elementární analýza a obsahu popela, ukázalo se, že existují mezi vzorky rozdíly. Bez ohledu na techniku přidání NaOH, nasákavost s vyšší koncentrací NaOH stoupala. Rozdíl hodnot nasákavosti byl patrný zejména v případě přidání NaOH jako roztoku k suché biomase. Množství popela mělo určit, zda stejně promývané vzorky nebudou s vyšší koncentrací NaOH více zasolené, tato obava se však nepotvrdila, mimo přidavku - **text byl odstraněn z důvodu utajení** - pevného NaOH do vodné suspenze mycelia. Zde byl však vyšší i výtěžek produktu (Tabulka 14), existuje tedy předpoklad, že tyto vzorky byly hůře promyty než ostatní.

Tabulka 15 Přehled výsledků analýz vzorků chitosan-glukanových komplexů připravených za různé koncentrace a techniky přidání NaOH

NaOH rozpouštěn v suspenzi mycelium/voda					
NaOH (g/g)	Nasákavost (g/g)	% C	% H	% N	Popel (%)
- text byl odstraněn	2,30	41,14	6,51	1,76	0,35
z důvodu utajení -	2,14	41,02	6,38	1,32	1,60
	2,41	40,92	6,56	1,47	0,10
NaOH přidán jako roztok k suchému myceliu					
NaOH (g/g)	Nasákavost (g/g)	% C	% H	% N	Popel (%)
- text byl odstraněn	1,95	41,35	6,53	1,53	0,20
z důvodu utajení -	2,07	40,96	6,45	1,46	0,40
	2,46	40,96	6,46	1,39	0,45

Z výsledků elementární analýzy vyplynulo, že vlivem koncentrace NaOH se měnilo zastoupení sledovaných prvků ve vzorcích (% C, % H a % N). Protože chitosan-glukanový komplex je tvořen glukosou, glukosaminem a *N*-acetyl-D-glukosaminem, bylo možné usoudit, jaký byl vliv provedené deacetylce na obsah chitosanu(chitinu) v komplexu podle množství přítomného dusíku. Rozdíl mezi glukosaminem a *N*-acetyl-D-glukosaminem by se projevil nepatrně odlišným poměrem uhlíku a vodíku. Jen na základě provedené elementární analýzy nebylo možné určit, jaký byl ve vzorcích poměr glukanu k chitosanu/chitinu, protože ve velké míře záleželo na stupni deacetylce chitinu, který nebyl znám. Z výsledků bylo možné

odhadnout, že zvýšená koncentrace NaOH, bez ohledu na techniku přidání, vedla k přípravě vzorků s nižším zastoupením uhlíku a dusíku, u vodíku nebyl tento trend úplně jednoznačný. Snížení obsahu dusíku s vyšší koncentrací NaOH také může korespondovat s tím, že mohly být lépe odstraněny zbytky aminokyseliny a proteinů buněčné stěny.

- text byl odstraněn z důvodu utajení -

Protože má být finální produkt používán především do přípravků určených k hojení ran, byla nasákavost důležitým parametrem, který ovlivňoval tvorbu gelu ve vodném prostředí a také jeho viskozitu. Z tohoto pohledu je nejvýhodnější použít nejvyšší koncentraci NaOH, s výhodou světlejší barvy výsledného produktu. Nevýhodou tohoto přístupu je nižší obsah celkového dusíku v izolovaném komplexu, jeho nižší obsah nebrání použití izolovaného komplexu do přípravků určených k hojení ran (výsledky nejsou uvedeny).

4.2.2. Testování různých kyselin použitých k extrakci

Pro izolaci vzorků během sledování vlivu kultivačních podmínek na obsah CHGK a exopolysacharidu, ale i pro určení vhodné koncentrace NaOH pro deacetylaci byla vždy používána HCl. Použití této kyseliny ve výrobě, v relativně vysoké koncentraci - text byl odstraněn z důvodu utajení -, by u nerezových zařízení a rozvodů vedlo ke korozi a kontaminaci vzorků těžkými kovy. Dalším krokem tedy bylo ověřit možnost nahrazení používané HCl jinou kyselinou, která by byla k zařízení šetrnější a nebyla by těkává. Za tímto účelem byla testována: - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Byl sledován jejich vliv na výtěžek a vlastnosti izolovaných produktů.

Deacetylace všech vzorků byla provedena - text byl odstraněn z důvodu utajení -.

Objem použité kyseliny byl - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Během přípravy vzorků diskutovaných v této části byl tento objem dostatečný - text byl odstraněn z důvodu utajení - vzorky při extrakci byly míchány magnetickým míchadlem na magnetické míchače a byla používána identická vstupní surovina (digestované mycelium). Odstředěná promytá pasta po deacetylaci byla převedena do kádinky a objem byl doplněn do - text byl odstraněn z důvodu utajení - demineralizovanou vodou, následně bylo přidáno dané množství kyseliny tak, aby bylo dosaženo koncentrace - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Zpracování vzorků odpovídalo v principu schématu z kapitoly 3.8.

Z výsledků plyne (Tabulka 16), že ani jedna z testovaných kyselin neměla výrazný vliv na výtěžnost produktu. Nasákavost jednotlivých vzorků byla také velmi podobná. Při použití kyseliny - text byl odstraněn z důvodu utajení - byla větší rozkolísanost jednotlivých výtěžků. Významný byl vliv na barvu, kdy použití kyselin - text byl odstraněn z důvodu utajení - znamenal izolaci tmavších produktů. Stejně tak množství popela bylo v případě použití kyseliny - text byl odstraněn z důvodu utajení - vyšší.

Jak ukazuje poslední řádek tabulky 16, tedy vzorek u kterého nebyla provedena extrakce kyselinou, neměla extrakce vliv na výtěžek produktu z mycelia. Význam tohoto kroku spočívá ve vlivu na nasákavost produktů, která byla bez jeho provedení nízká (1,43 g/g). Toto zjištění potvrzuje, že extrakce kyselinou má vliv na štěpení vazeb komplexu, tím vznikají kratší propojené řetězce, které umožní lepší vazbu vody a vznik suspenze (gelu) s vyšší viskozitou, toto je žádoucí vlastnost produktu. Dalším pozitivem tohoto kroku je vymytí degradačních produktů proteinů a aminokyselin a dalších látek, které jsou rozpustné v kyselém prostředí.

Tabulka 16 Vliv použité kyseliny k extrakci na fyzikálně-chemické vlastnosti produktu

Typ kyseliny	CHGK (g/g)	Nasákavost (g/g)	Popel (%)
	0,229 ± 0,060	2,43	1,78
- text byl odstraněn	0,278 ± 0,081	2,38	0,60
z důvodu utajení -	0,224 ± 0,009	2,48	0,05
	0,216 ± 0,002	2,41	0,10
-	0,235 ± 0,028	1,43	0,10

Nejllepší volbou je tedy použití kyseliny - text byl odstraněn z důvodu utajení -, protože použití kyseliny - text byl odstraněn z důvodu utajení - by mohlo být výhledově problematictější jak vzhledem k rozkolísanosti výtěžků, tak možným problémům se splněním parametru obsahu popela (vzorek by musel být delší dobu promýván), také by vzorky byly tmavší barvy (nežádoucí). Dalším důvodem proč používat kyselinu - text byl odstraněn z důvodu utajení - je ten, že manipulace s touto kyselinou je bezpečnější.

4.2.3. Závěry testování podmínek izolace produktu

Po provedených pokusech a určení optimální koncentrace NaOH (- text byl odstraněn z důvodu utajení -), metodě jeho přidavku (- text byl odstraněn z důvodu utajení -) a také typu použité kyseliny (- text byl odstraněn z důvodu utajení -), bylo nutné tento postup ověřit na vzorcích biomasy *Schizophyllum commune* #127 bez předchozí digesce materiálu a jeho sušení.

Plánuje se, že ve výrobě budou jednotlivé kroky přímo navazovat a nebude - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Vstupní surovinou bude promytá biomasa oddělená od kapalného podílu hned po skončení kultivace, případně promytá biomasa, která bude po separaci od kapalného podílu zchlazena na teplotu nižší než 10 °C, nebo zamražena. Postup izolace produktu byl testován na dvou vzorcích: Jeden byl po oddělení biomasy zamražen při - 50 °C (180510 PP1), druhý byl uchován v chladničce při + 4 °C (270510 PP2).

Postup přípravy obou vzorků byl shodný, protože množství přidaného NaOH bylo závislé na sušině biomasy, tak byla nejprve stanovena. Jak se ukázalo (Tabulka 17), bylo v biomase stále obsaženo více jak 90 % vody. Z kapacitních důvodů byla deacetylace obou šarží provedena 2 x vedle sebe, nebylo totiž k dispozici zařízení s potřebným pracovním objemem. Postup zpracování vzorku odpovídal schématu uvedenému v kapitole 3.8. Rozdílem bylo použití kyseliny - text byl odstraněn z důvodu utajení - k extrakci. Navážky byly propočítány na 190 g suchého mycelia:

Tabulka 17 Sušina biomasy a navážky surovin pro přípravu vzorků k ověření postupu izolace

Šarže	Sušina biomasy (%)	Navážka biomasy (g)	Voda obsažená v biomase (g)	Navážka NaOH (g)	Objem roztoku NaOH (mL)
180510 PP1	7,49	2537	2347	- text byl odstraněn z důvodu utajení -	
270510 PP2	9,85	1929	1739		

Po provedené izolaci CHGK bylo získáno: 36,76 g CHGK šarže 180510 PP1 s výtěžností produktu 19,35 % a 51,93 g CHGK šarže 270510 PP2 s výtěžností produktu 27,33 %.

Rozdílná výtěžnost byla vysvětlena rozdílnou kvalitou inokul a podmínkami růstu. Mycelium nebylo získáno ze stejného fermentoru, kultivace byla provedena na polo-syntetické živné půdě, tedy na půdě s původním složením. Fermentory se liší hodnotou $K_L a$, tedy i přestup kyslíku a podmínky saturace, jako klíčový parametr obsahu CHGK v myceliu, byly odlišné.

Oba vzorky byly předány k testování cytotoxicity (*in vitro* experimenty) a po schválení etickou komisí k testování účinnosti hojení ran (*in vivo* experimenty). Byla na nich provedena charakterizace chemicko-fyzikálních vlastností, jak bude popsáno dále.

4.3. Charakterizace vlastností izolovaného chitosan-glukanového komplexu

Všechny uvedené výsledky byly získány postupy vycházejícími z metod uvedených v experimentální části v podkapitolách 3.9.1 – 3.9.9. Metody byly ověřovány, až na výjimky, u dvou šarží vyrobených finálním postupem izolace CHGK z biomasy.

4.3.1. Vzhled produktu

Vzorek 180510 PP1 měl světlejší barvu než vzorek 270510 PP2, oba vzorky ale navržené specifikaci vyhovovaly, první byl krémově bílý, druhý světle okrové barvy. Příprava vzorků vycházela z navrženého typu kyseliny k extrakci: Vzorky připravené za použití kyselin - **text byl odstraněn z důvodu utajení** - měly světlou barvu (krémově bílé), použití kyseliny - **text byl odstraněn z důvodu utajení** - vedlo k přípravě tmavších vzorků (světle hnědé).

4.3.2. Sušina vzorků

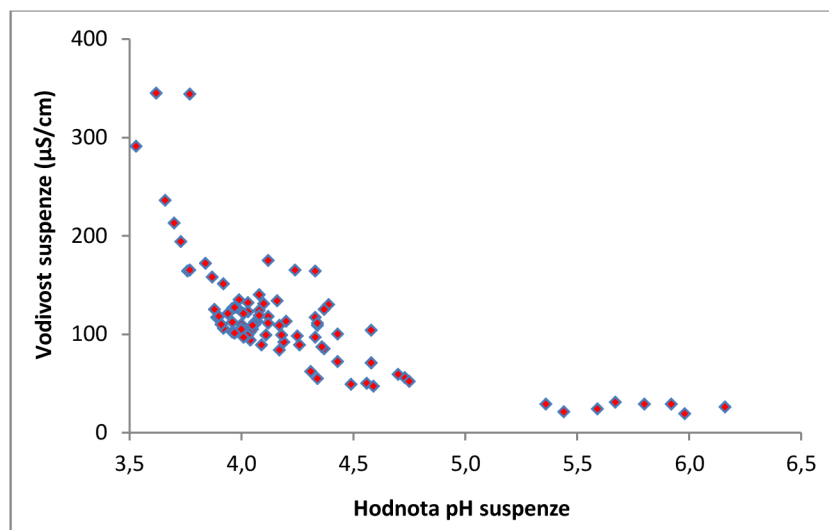
Vzorek 180510 PP1 měl sušinu 91,70 %, vzorek 270510 PP2 měl sušinu 93,60 %. Oba vzorky pak navržené specifikaci vyhovovaly. Také ostatní vzorky měly sušinu zpravidla v rozmezí 92 – 96 %. Toto ukazuje, že navržené teplota sušení produktu (60 °C) i doba sušení (24 hodin) jsou dostatečné.

4.3.3. Obsah popela

Vzorek 180510 PP1 měl obsah popela 0,27 %, vzorek 270510 PP2 měl tento obsah nižší a to $\leq 0,05$ %. Oba vzorky pak navržené specifikaci vyhověly. U ostatních vzorků bylo množství popela v rozmezí 0,05 – 4,80 %, průměrná hodnota byla 0,40 %, záleželo na typu kyseliny použité k extrakci a kvalitě promytí produktu po provedené extrakci kyselinou.

4.3.4. Měření pH a vodivosti

Výsledky měření hodnot pH a vodivosti 1,5 % vodné suspenze vzorků ukazují jistou korelaci mezi hodnotou pH a vodivostí. V grafu 15 je znázorněna závislost pro vzorky izolované při sledování vlivu složení média a parametrů kultivace na množství CHGK v biomase. Všechny vzorky byly po extrakci promývány až k hodnotám pH blízkým neutrální oblasti. Jak ukazuje graf 15, většina vzorků se po měření pH pohybovala v oblasti 3,8 – 4,6 s vodivostí 50 – 150 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Podle tohoto výsledku bylo možné doporučit, aby po extrakci během promývání sedimentu demineralizovanou vodou byla kontrolována mimo hodnoty pH i vodivost supernatantu. Doporučená hodnota pro ukončení promývání sedimentu byla určena - **text byl odstraněn z důvodu utajení** -.



Graf 15 Korelace mezi zjištěnou hodnotou pH a vodivostí suspenze vzorků

Vodná suspenze vzorku 180510 PP1 měla hodnotu pH 5,09 s vodivostí 35 $\mu\text{S}/\text{cm}$, suspenze vzorku 270510 PP2 měla hodnotu pH 4,91 s vodivostí 53 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Oba vzorky pak navržené specifikaci vyhověly.

4.3.5. Nasákavost vzorků

Metoda stanovení ve fólii

Pro šarži 180510 PP1 byla hodnota nasákavosti určena 2,63 g/g, pro vzorek 270510 PP2 byla shodná, tedy 2,63 g/g.

Metoda stanovení v prášku

Nasákavost vzorků stanovená touto metodou byla u šarže 180510 PP1 17 g/g a u šarže 270510 PP2 19 g/g. Pro srovnání, nasávací mohutnost buničité vaty je Českým lékopisem definována a požadována 35 g/g [160].

4.3.6. Stanovení obsahu dusíku

Elementární analýza

Analýza byla provedena na externím pracovišti (Výzkumný ústav organických syntéz, Rybitví). Výsledky analýzy při testování metod izolace produktu byly diskutovány v příslušné kapitole. Pro vzorky 180510 PP1 a 270510 PP2 jsou výsledky uvedeny v tabulce 18:

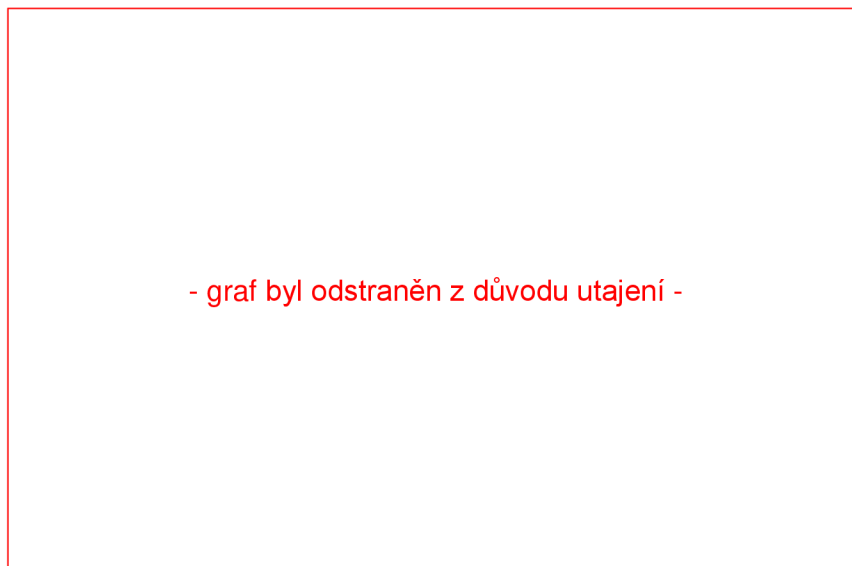
Tabulka 18 Výsledky elementární analýzy pro dvě připravené šarže

Vzorek	% C	% H	% N
180510 PP1	45,12 \pm 0,20	6,57 \pm 0,10	1,65 \pm 0,08
270510 PP2	42,20 \pm 0,24	6,61 \pm 0,15	1,22 \pm 0,10

Jak ukazuje tabulka 18, výsledky elementární analýzy obou vzorků se od sebe liší, především v obsahu uhlíku a dusíku. Je třeba si uvědomit, že na rozdíl od vzorků při testování metod izolace CHGK nebyly tyto dva vzorky vyrobeny z jednoho vstupního materiálu, ale ze dvou různých šarží biomasy kultivované ve dvou různých fermentorech oškovaných dvěma různými inokuly. Tento rozdíl potvrzuje, jak je důležité zjistit, během ověřování ve výrobě, opakovatelnost na několika šaržích produktu, při kultivacích vedených za stejných podmínek.

Stanovení obsahu dusíku (Elson – Morgan)

Výsledky kinetiky hydrolyzy v 5 – 12 hodině jsou shrnuty v grafu 16. Hydrolyza byla provedena jen na jednom ze vzorků (270510 PP2). Obsah glukosaminu se pohyboval - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Obsah glukosaminu stoupal k maximální hodnotě a po jejím dosažení začal klesat, předpokládáme, že docházelo k vedlejším reakcím uvolněného glukosaminu a tak i snižování jeho obsahu v hydrolyzátu.



Graf 16 Změna obsahu glukosaminu s délkou hydrolyzy na vzorku 270510 PP2

Optimální doba hydrolyzy byla určena v maximu obsahu glukosaminu, tedy v 9 hodině hydrolyzy. Pro ověření této metody byly provedeny 2 další opakování hydrolyzy po dobu 9 hodin. V tomto experimentu, i při opakování, byl obsah glukosaminu stanoven: - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Po přepočítání na množství dusíku ve vzorku, byly získány tyto výsledky: - text byl odstraněn z důvodu utajení -. Tyto hodnoty jsou významně nižší, než odpovídalo elementární analýze tohoto vzorku, tedy 1,22 %. Rozdíl ukazuje na podezření, že všechny vzorky nebyly hydrolyzovány. Dalším možným vysvětlením by mohlo být to, že dusík nemusí být přítomen pouze ve formě *N*-acetyl-D-glukosaminu, nebo že část uvolněného glukosaminu může podléhat vedlejším reakcím a není tak detekován.

4.3.7. Obsah glukosaminu ve vzorku

Metodou titrace vzniklého glukosamin hydrobromidu pomocí NaOH byl stanoven obsah glukosaminu, jako obsah volných aminoskupin, pro obě vyrobené šarže. Tento obsah byl výpočtem následující: - text byl odstraněn z důvodu utajení -.

4.3.8. Stanovení deacetylce chitinu, určení poměru glukanu a chitinu/chitosanu

Když byl znám obsah volných aminoskupin glukosaminu z titrační metody, bylo možné spočítat, jaký obsah dusíku odpovídal tomuto obsahu. Z elementární analýzy bylo známo, jaké bylo v obou vzorcích celkové množství dusíku odpovídající oběma jeho zdrojům, tedy v součtu glukosaminu i *N*-acetyl-D-glukosaminu. Rozdíl celkového množství dusíku ve vzorcích po odečtu stanoveného množství dusíku v glukosaminu titrační metodou pak dával obsah dusíku, který musí odpovídat pouze *N*-acetyl-D-glukosaminu, jehož procentuální obsah bylo možné z rozdílu množství dusíku vypočítat. Součet vypočítaného obsahu glukosaminu a *N*-acetyl-D-glukosaminu pak dávalo zastoupení chitosanu/chitinu ve vzorku.

Poměr glukosaminu a N-acetyl-D-glukosaminu poskytlo informaci o stupni deacetylaci chitinu. Souhrn vypočítaných obsahů je uveden v tabulce 19:

Tabulka 19 Výsledky obsahu glukosaminu, N-acetyl-D-glukosaminu získané výpočtem z analýz obsahu dusíku

Vzorek	Glukosamin %	% N odpovídající glukosaminu	Celkový obsah N (%)	Rozdíl obsahu N (%)	N-acetyl-D-glukosamin %
180510 PP1					
270510 PP2					

- text byl odstraněn z důvodu utajení -

Výpočtem bylo zjištěno:

- text byl odstraněn z důvodu utajení -

O struktuře komplexu jsme mohli prohlásit:

- text byl odstraněn z důvodu utajení -

O chitinu/chitosanu v obou komplexech bylo možné říct:

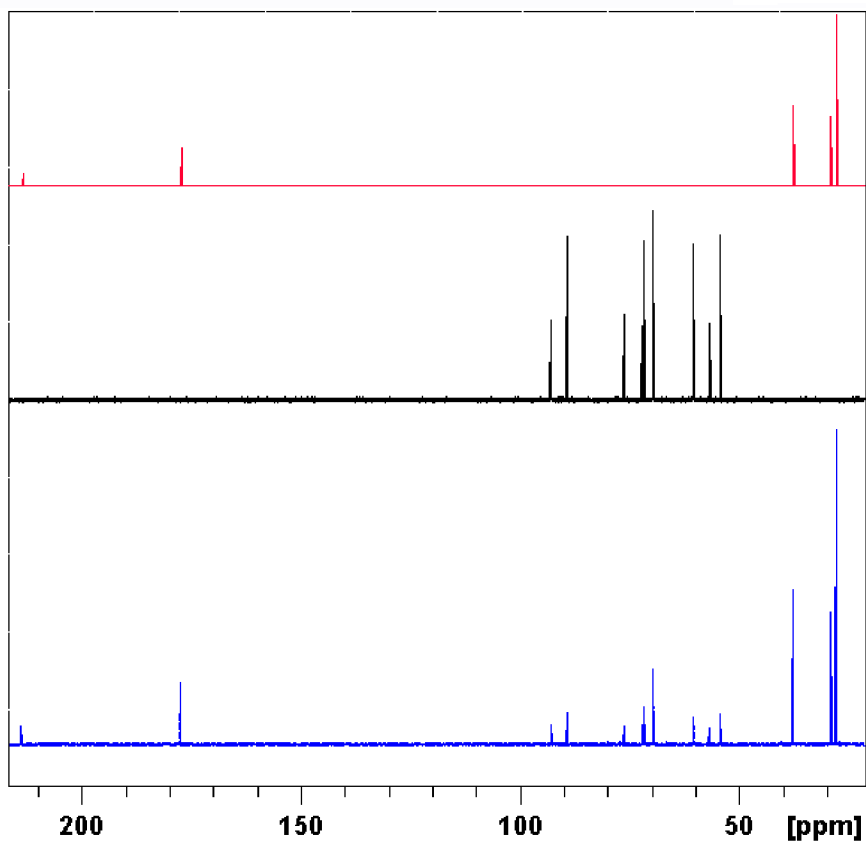
- text byl odstraněn z důvodu utajení -

Spojení elementární analýzy s acidobazickou titrací se tak ukázalo být vhodnou metodou pro stanovení chemické charakteristiky izolovaných chitosan-glukanových komplexů. Také potvrdilo domněnku, že obsah dusíku známý z elementární analýzy vypovídá jen o tom, kolik je v komplexu obsaženo chitinu/chitosanu, ale neříká nic o jeho stupni deacetylce. Stejně tak, výsledný stupeň deacetylce chitosanu byl dán metodou izolace produktu, který se zdál být opakovatelný (deacetylce - text byl odstraněn z důvodu utajení -), ale jeho zastoupení v komplexu bylo dáno podmínkami růstu, kvalitou inokula, a především jeho obsahem v biomase *Schizophyllum commune* #127, respektive jeho zastoupením v buněčné stěně.

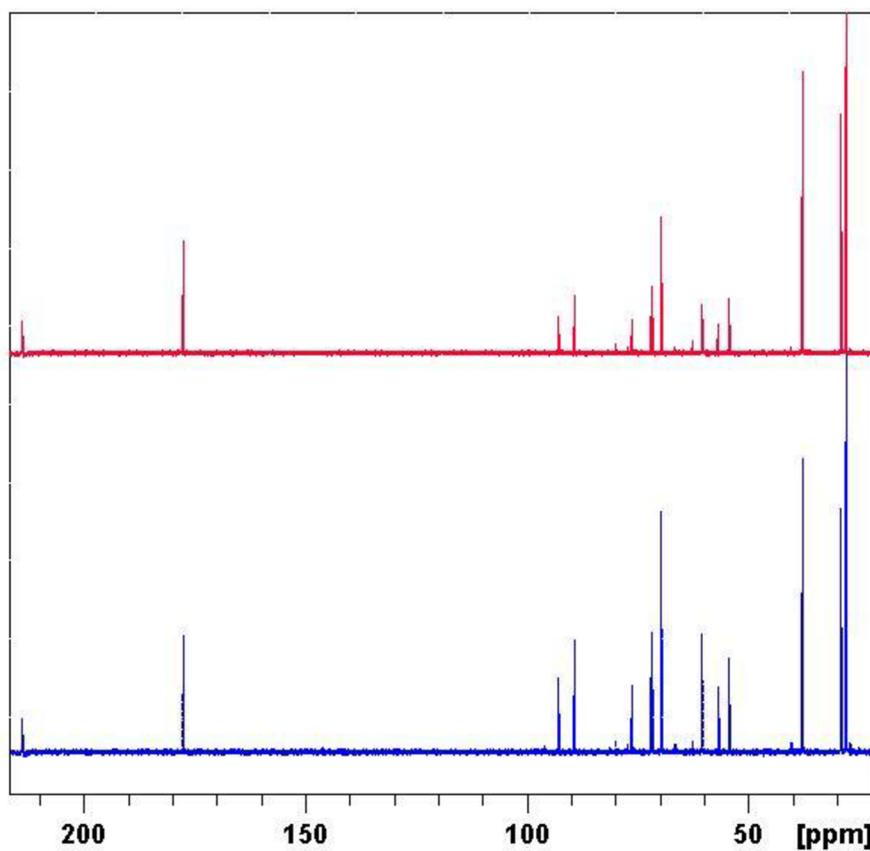
4.3.9. NMR analýza vzorků

¹³C NMR spektra vzorků jsou na obrázcích 16 a 17. Na obrázku 16 je spektrum hydrolyzovaného vzorku 270510 PP2 (modré) spolu se spektrem glukosaminu (černé) a kyselinou levulinovou (červené). Porovnání spekter těchto dvou standardů s hydrolyzovaným vzorkem ukazuje, že daný vzorek byl složen z těchto dvou látek. Zbytek glukosy hydrolyzovaného β-glukanu nebyl ve spektru patrný, všechna glukosa byla tedy rozložena na kyselinu levulinovou a uvolněná kyselina mravenčí byla odstraněna při odpařování vzorku po hydrolýze a při promývání odparku. Ve spektru není patrný ani N-acetyl-D-glukosamin, protože byl během hydrolýzy deacetylován na glukosamin.

Na obrázku 17 jsou porovnána ¹³C NMR spektra obou vzorků, tedy 180510 PP1 (modré) a 270510 PP2 (červené). Je zřejmé, že obě látky mají spektrum shodné, tedy že stejná doba hydrolýzy (8 hodin) byla u obou vzorků dostatečná, aby byl deacetylován veškerý N-acetyl-D-glukosamin a obsažený glukan byl rozložen na kyselinu levulinovou. Bylo dokázáno, že vzorky neobsahují stopy jiných monosacharidů a proteinů přítomných v buněčné stěně *Schizophyllum commune* #127, tedy alespoň ne v koncentraci, která by byla detekována.



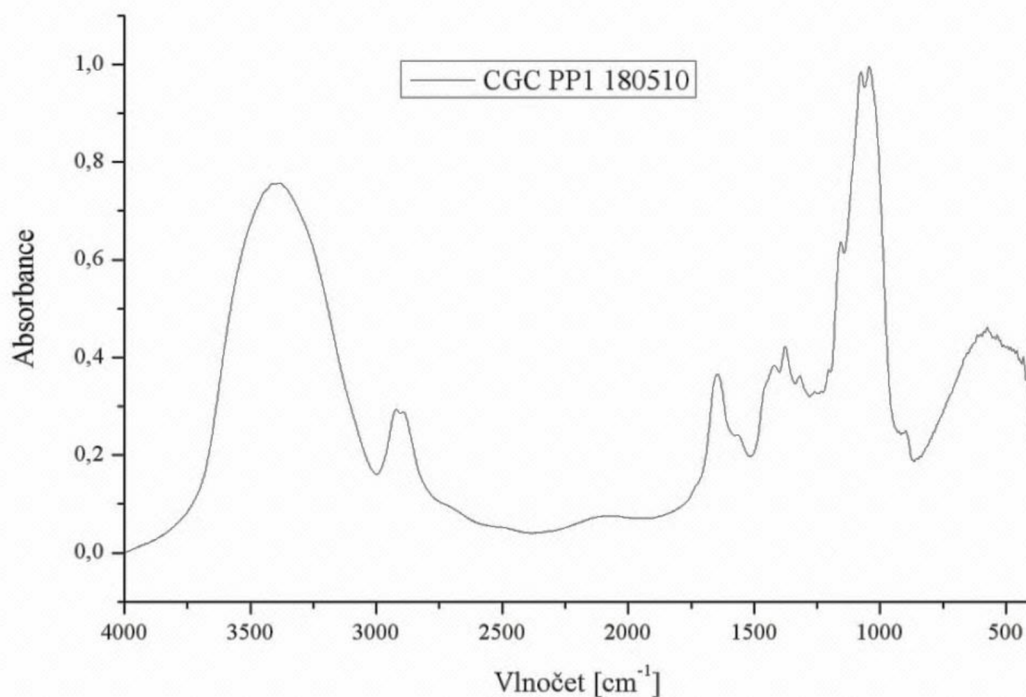
Obrázek 16 ¹³C NMR spektrum kyseliny levulinové (červeně), glukosaminu (černé) a hydrolyzovaného vzorku 270510 PP2 (modré)



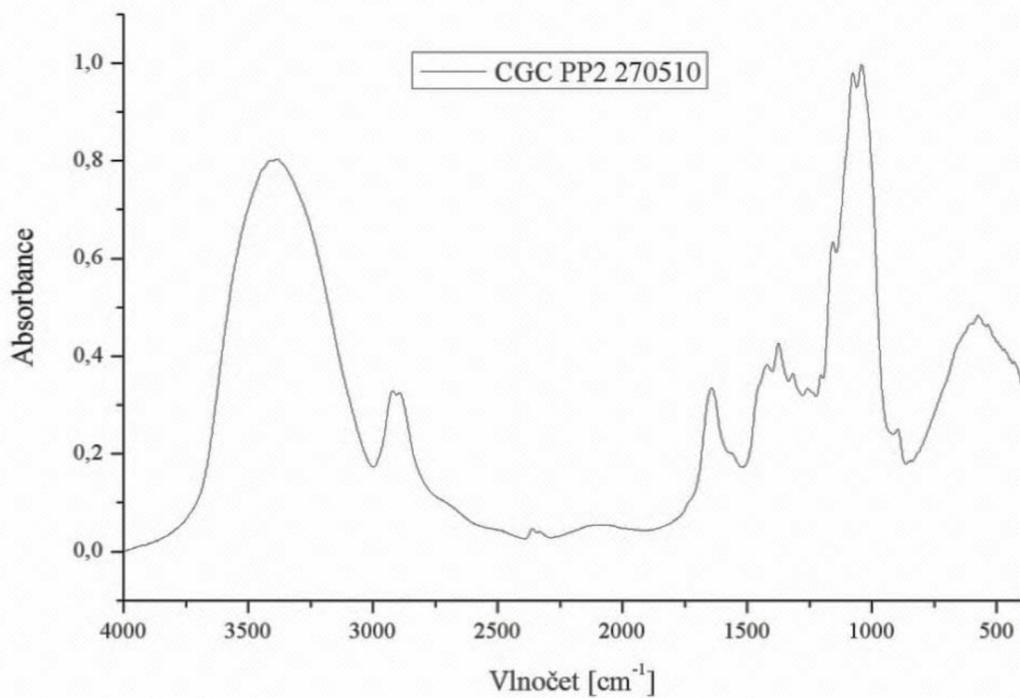
Obrázek 17 ¹³C NMR spektrum obou hydrolyzovaných vzorků: 180510 PP1 (modré) a 270510 PP2 (červené)

4.3.10. FTIR analýza vzorků

Infračervené spektrum v oblasti $500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ bylo získáno ze vzorků v KBr tabletách. Spektra obou vzorků jsou zobrazena na obrázcích 18 (180510 PP1) a 19 (270511 PP2).



Obrázek 18 FTIR spektrum vzorku 180510 PP1



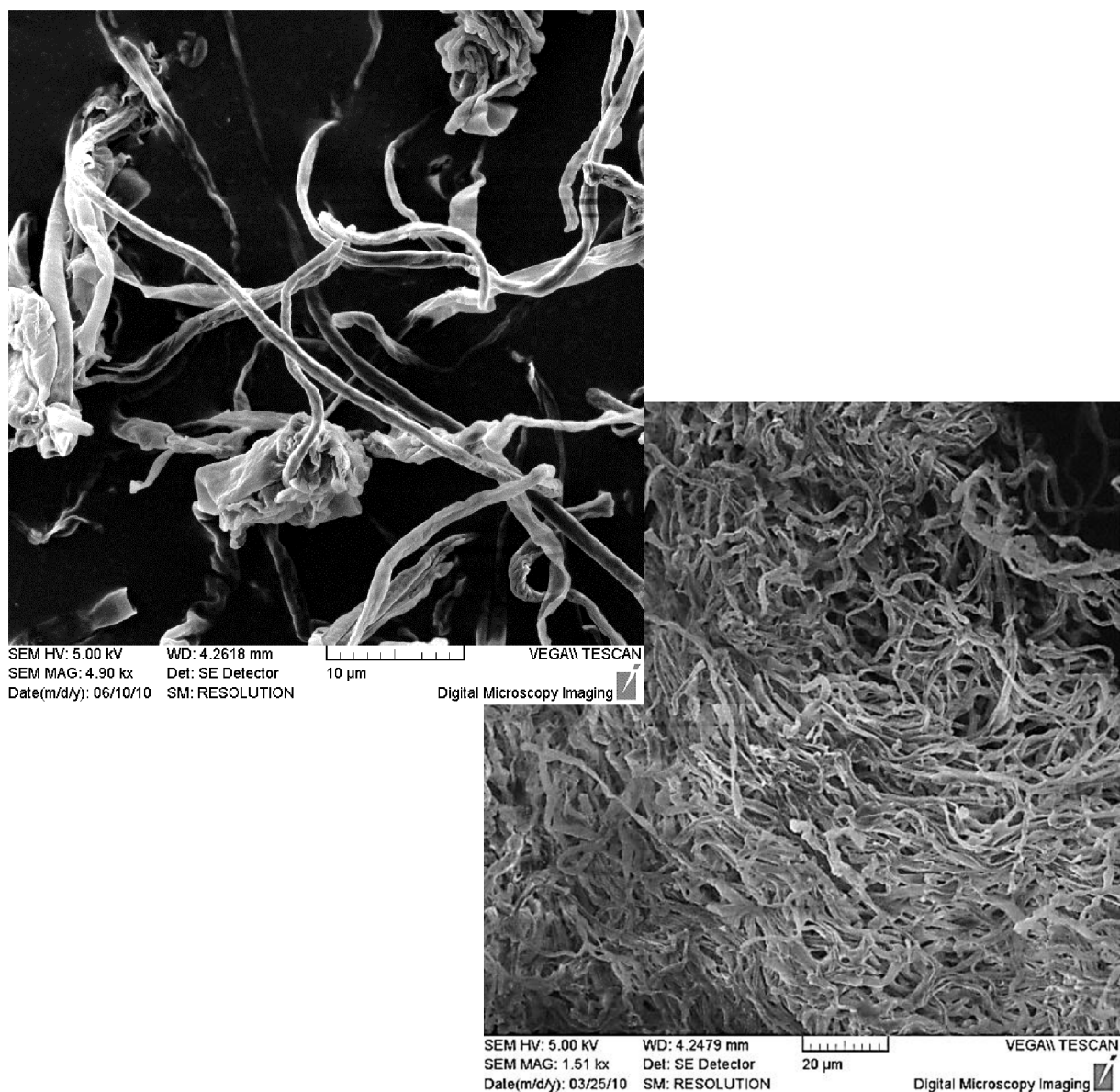
Obrázek 19 FTIR spektrum vzorku 270510 PP2

Po analýze získaných IČ spekter bylo možné říci následující:

Píky v oblasti kolem 1632 cm^{-1} byly přiřazeny charakteristické vibraci C=O acetylových skupin chitinu, píky kolem 1565 cm^{-1} zase charakteristické deformaci N-H a ukazují na přítomnost volných aminoskupin glukosaminu. Píky kolem 2900 cm^{-1} byly přiřazeny charakteristické vibraci CH_3 skupin acetylů *N*-acetyl-D-glukosaminu. Struktura β -řetězce byla potvrzena v oblasti kolem 893 cm^{-1} a 1371 cm^{-1} . Oba vzorky měly shodná spektra, byly pozorovány pouze malé rozdíly v posunech charakteristických skupin a vazeb a to v řádu jednotek cm^{-1} .

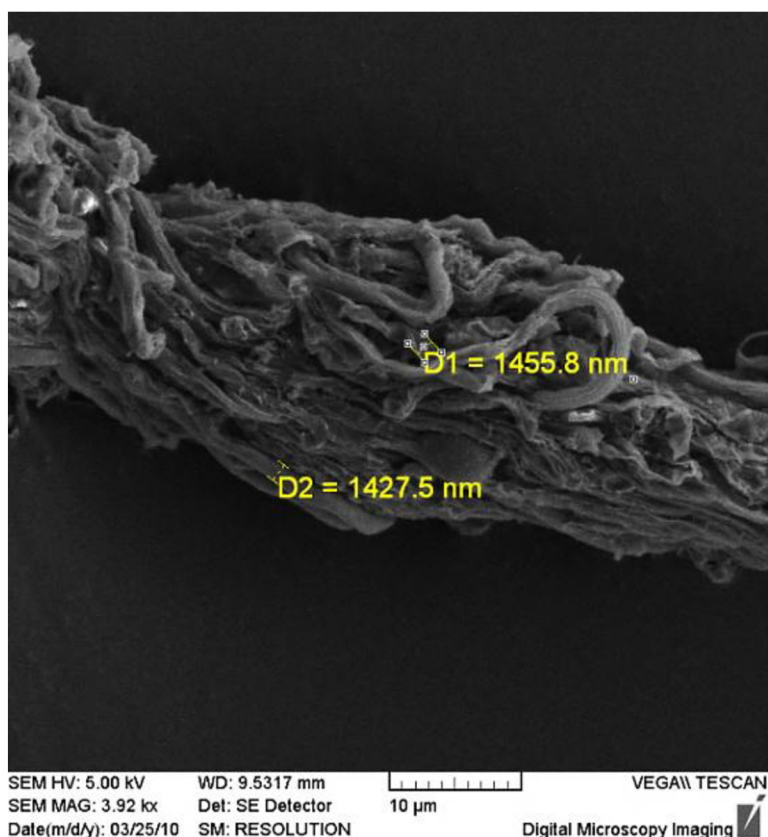
4.3.11. Analýza struktury vzorků

Po pozlacení lyofilizovaných vzorků byla mikrostruktura určena na elektronovém skenovacím mikroskopu. Na obrázku 20 je fotografie izolovaného chitosan-glukanového komplexu ze *Schizophyllum commune* #127 při zvětšení 4900 x (vlevo) a 1510 x (vpravo). Strukturu bylo možno popsat jako neuspořádanou vláknitou.



Obrázek 20 Mikrostruktura chitosan-glukanového komplexu po pozlacení vzorku 270510 PP2

Průměr vláken vzorku byl kolem 1,45 μm , jak ukazuje obrázek 21 (zvětšení 3920 x), produkt tak vlastně tvoří strukturu mikrovláken:



Obrázek 21 Určení velikosti průměru vlákna chitosan-glukanového komplexu u vzorku 270510 PP2

4.3.12. Shrnutí metod doporučených k charakterizaci produktu

Na základě výsledků analýz vzorků je doporučeno pro charakterizaci chitosan-glukanového komplexu použít tyto metody:

Analýzy proveditelné v pevné fázi:

Vzhled produktů – vzhled může limitovat použití produktu a může naznačovat chybu ve výrobním postupu, vzorky by měly být světlé, krémové barvy.

Sušina a popel – obě metody vyjadřují základní charakteristiku produktu, obsah vody může být stanoven jako ztráta sušením při teplotě 105 °C, množství popela vyjadřující přítomnost solí z nedostatečně promývaného vzorku byl stanoven při 800 °C. Vzorek by měl obsahovat méně než 10 % vlhkosti a obsah popela by měl být nižší než 1 %.

Nasákavost vzorků – metoda byla použita pro porovnání jednotlivých vyrobených šarží, jednodušší a rychlejší bylo analýzu provést při měření v prášku než ve fólii, kde byl s výhodou využit vliv struktury vzorku. Limit bude určen teprve po ukončení ověřování ve výrobě.

Elementární analýza – obsah dusíku touto metodou vyjadřoval celkový obsah dusíku ve vzorcích a sloužil v kombinaci s určením obsahu glukosaminu k výpočtu stupně deacetylace chitinu a určení poměru chitinu/chitosanu a glukanu vzorků. Limit bude určen teprve po ukončení ověřování ve výrobě.

Stanovení obsahu glukosaminu – titrační metoda s využitím HBr a NaOH byla využita pro určení obsahu volných NH₂ skupin, které odpovídají obsahu glukosaminu. Limit bude určen teprve po ukončení ověřování ve výrobě.

FTIR analýza vzorků – byla měřena v tabletách v rozsahu 500 – 4000 cm⁻¹, poskytla informaci o přítomnosti charakteristických skupin produktu. Po zavedení výroby bude určen vnitřní standard, který bude sloužit pro kontrolu shody šarží vyrobených produktů.

Analýzy proveditelné ve vodné suspenzi:

Stanovení vodivosti a pH – tato charakteristika se ukázala být užitečná kvůli použitelnosti produktu, pokud by vzorek měl extrémní pH bylo by jeho použití limitováno nebo by byl vzorek nepoužitelný. Vodivost vyjadřovala také míru promytí vzorků po kyselé extrakci. Měření bude sloužit k mezioperační kontrole ve výrobě. Bude určena limitní hodnota (100 μS.cm⁻¹), vzorky budou po kyselé extrakci promývány tak dlouho, dokud nebude této hodnoty dosaženo, teprve potom budou odvodněny a sušeny.

Analýzy proveditelné po hydrolýze vzorku na základní jednotky:

¹³C NMR analýza – po kyselé hydrolýze vzorků 6 M HCl bylo možné určit obsah základních složek chitosan-glukanového komplexu a potvrdit tak čistotu produktu a nepřítomnost jiných monosacharidů a proteinů buněčné stěny *Schizophyllum commune* #127. Metoda bude sloužit k ověření nepřítomnosti nežádoucích složek v produktu, nejprve bude muset být určena mez detekce možných kontaminantů (aminokyselin a monosacharidů po hydrolýze vzorku).

Stanovení obsahu dusíku – použití metody Elson-Morgan vyjadřovalo po kyselé hydrolýze 6 M HCl celkový obsah dusíku zastoupeném v součtu z glukosaminu a *N*-acetyl-D-glukosaminu. Metoda měla velkou chybu stanovení a nedošlo k úplné hydrolýze vzorku, proto nebyla doporučena. Tato metoda nebude tedy využívána.

5. ZÁVĚR

Byl ověřen vliv složení živné půdy u kultivace *Schizophyllum commune* #127 na produkci biomasy, exopolysacharidu a výtěžnost chitosan-glukanového komplexu. Výsledky ukázaly, že obsah CHGK v biomase *Sch. commune* #127 při submerzní kultivaci byl vysoce variabilní parametr, který se mohl vlivem všech testovaných parametrů pohybovat mezi 23,5 – 39,5 %. Nejvhodnější z testovaných zdrojů uhlíku pro produkci CHGK *Sch. commune* #127 byla sacharosa v koncentraci 40 g/L. Při testování vlivu koncentrace zdroje dusíku ve formě KA bylo nejlepší produkce CHGK dosaženo na živné půdě s poměrem navážek zdrojů uhlíku a dusíku 35 : 2. Nejvhodnější pro produkci komplexu byla výchozí hodnota pH živné půdy 6. Udržení - text byl odstraněn z důvodu utajení - podmínek po celou dobu kultivace bylo klíčovým faktorem, pomocí kterého mohlo být významně zvýšeno množství biomasy i obsah CHGK v myceliu, a spolu s tím potlačena produkce exopolysacharidu. Na polosyntetickém médiu (- text byl odstraněn z důvodu utajení -) při intenzitě vzdušnění - text byl odstraněn z důvodu utajení -, *Sch. commune* #127 vyprodukovalo $6,63 \pm 0,50$ g/L CHGK po 5 denní kultivaci. Produkce exopolysacharidu byla $0,26 \pm 0,06$ g/L, tedy dostatečně nízká na to, aby byla biomasa dobře využitelná.

Byl sledován vliv jednotlivých etap izolace (deacetylace a extrakce) na fyzikální a chemické vlastnosti CHGK. Bylo dokázáno, že existuje rozdíl v technice přidání NaOH, pokud byl NaOH rozpouštěn ve vodné suspenzi mycelia, byla vyšší rozkolísanost výtěžků komplexu a menší rozdíl mezi nasákavostí produktu, což ukazovalo na nižší homogenitu připravených vzorků. Při přidavku NaOH jako roztoku k suchému myceliu byla vyšší homogenita vzorků, rozdíl ve výtěžcích produktů byl s koncentrací NaOH méně výrazný, naopak nasákavost produktu se ukázala být na množství NaOH závislá. Vyšší koncentrace NaOH, bez ohledu na techniku přidání, poskytovaly viditelně světlejší produkty s vyšší nasákavostí a nižším zastoupením uhlíku a dusíku. Při druhém kroku izolace produktu, extrakci, se ukázalo, že použití kyseliny - text byl odstraněn z důvodu utajení - nemělo výrazný vliv na výtěžek a nasákavost produktů, s tím, že při použití kyseliny - text byl odstraněn z důvodu utajení - byly získány viditelně tmavší vzorky.

Dva vzorky izolované navrženým konečným postupem z vyšší navážky mycelia, tedy deacetylované NaOH - text byl odstraněn z důvodu utajení - a následně extrahované kyselinou - text byl odstraněn z důvodu utajení - se skládaly ze: - text byl odstraněn z důvodu utajení - % D-glukosaminu, - text byl odstraněn z důvodu utajení - % N-acetyl-D-glukosaminu (odpovídá stupni deacetylace chitinu - text byl odstraněn z důvodu utajení - %) a - text byl odstraněn z důvodu utajení - % β -glukanu. Měly sušinu 91,70 - 93,60 %, obsah popela 0,05 - 0,27 %, připravená 1,5 % vodná suspenze měla pH 4,91 - 5,09 a vodivost 35 - 53 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Nasákavost těchto vzorků ve fólii byla shodně 2,63 g/g a v prášku 17 - 19 g/g. Analýza ^{13}C NMR neukázala po hydrolýze na přítomnost jiných složek než D-glukosaminu a kyseliny levulinové, tedy degradačních produktů chitinu/chitosanu a β -glukanu. IČ spektra potvrdila přítomnost charakteristických vibrací acetylových skupin chitinu (C=O), charakteristické deformace volných skupin glukosaminu (N-H) i strukturu β -řetězce. Vzorky byly krémově bílé, vatovitého vzhledu, po SEM analýze se ukázalo, že byly vláknité s průměrem vlákna kolem 1,45 μm . Vzorky nevykazovaly cytotoxicitu a měly velmi vysokou účinnost při hojení ran (data nebyla uvedena).

Zhodnotíme-li výsledky, je možné říct, že submerzní kultivace *Schizophyllum commune* může být efektivně použita pro průmyslovou izolaci chitosan-glukanového komplexu.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] **Wasser S.P., Weis A.L.** Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Review in Immunology*. 1999, 19 (1), stránky 65-96.
- [2] **Novák M., Větvička V.** β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *Journal of Immunotoxicology*. 2008, 5 (1), stránky 47-57.
- [3] **Di Carlo F.J., Fiore J.V.** On the composition of Zymosan. *Science*. 1958, 127, stránky 756-757.
- [4] **Schorlemmer H.U., Bitter-Suermann D., Allison A.C.** Complement activation by the alternative pathway and macrophage enzyme secretion in the pathogenesis of chronic inflammation. *Immunology*. 1977, 32, stránky 929-940.
- [5] **Fearon D.T., Austen K.F.** Activation of the alternative complement pathway due to resistance of zymosan-bound amplification convertase to endogenous regulatory mechanisms. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1977, 74, stránky 1683-1687.
- [6] **Holan Z., Beran K., Miler I.** Preparation of zymosan from yeast cell walls. *Folia Microbiologica*. 1980, 25 (6), stránky 501-504.
- [7] **Tang Y.-J., Zhu L.-W., Li H.-M., Li D.-S.** Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors – Challenges, Current State-of-the-Art, and Future Prospects. *Food Technology and Biotechnology*. 2007, 45 (3), stránky 221-229.
- [8] **Xiao J., Dai-xiong C., Wei-hong W., Xi-jie H., Ying Q., Liang Z.** Enhanced simultaneous production of mycelia and intracellular polysaccharide in submerged cultivation of *Cordyceps Jiangxiensis* Using desirability Functions. *Process Biochemistry*. 2006, 41 (8), stránky 1887-1893.
- [9] **Mau J.-L., Lin H.-C., Chen C.-C.** Antioxidant Properties of Several Medicinal Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50 (21), stránky 6072-6077.
- [10] **Gu Y.-H., Takagi Y., Nakamura T., Hasegawa T., Suzuki I., Oshima M., Tawaraya H., Niwano Y.** Enhancement of Radioprotection and Anti-Tumor Immunity by Yeast-Derived β -Glucan in Mice. *Journal of Medicinal Food*. 2005, 8 (2), stránky 154-158.
- [11] **Neyrincka A.M., Mousona A., Delzenne N.M.** Dietary supplementation with laminarin, a fermentable marine β -(1,3)-glucan, protects against hepatotoxicity induced by LPS in rat by modulating immune response in the hepatic tissue. *International Immunopharmacology*. 2007, 12 (7), stránky 1497-1506.
- [12] **Gautier S., Xhaufaire-Uhoda E., Gonry P., Piérard G.E.** Chitin–glucan, a natural cell scaffold for skin moisturization and rejuvenation. *International Journal of Cosmetic Science*. 2008, 30 (6), stránky 459-469.
- [13] **Ovington, L.G.** Wound Care Products: How to Choose. *Advances in Skin & Wound Care*. 2001, 14 (5), stránky 259-266.
- [14] **Nishinari K, Doi E.** *Food Hydrocolloids: Structure, Properties, and Functions*. New York: Springer-Verlag New York, 1994. str. 510. ISBN 0-306-44594-8.
- [15] **Vis R.B., Lorenz K.** β -Glucans: Importance in Brewing and Methods of Analysis. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 1997, 30 (4), stránky 331-336.
- [16] **Nomanbhay, S.M.** Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan coated oil palm shell charcoal. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2005, 8 (1).
- [17] **Dutta P.K., Dutta J., Tripathi V.S.** Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2004, 63 (01), stránky 20-31.

- [18] **Madihally S.V., Matthew H.W.T.** Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 1999, 20 (12), stránky 1133-1142.
- [19] **Lee K.Y., Mooney D.J.** Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews*. 2001, 101 (7), stránky 1869-1880.
- [20] **Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., Tejraj M.** Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2004, 100 (1), stránky 5-28.
- [21] **Sudarshan N.R., Hoover D.G., Knorr D.** Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*. 1992, 6 (3), stránky 257-272.
- [22] **Tsai G.-J., Su W.-H.** Antibacterial Activity of Shrimp Chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*. 1999, 62 (3), stránky 239-343.
- [23] **Wedmore I., McManus J.G., Pusateri A.E., Holcomb J.B.** A Special Report on the Chitosan-based Hemostatic Dressing: Experience in Current Combat Operations. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care*. 2006, 60 (3), stránky 655-658.
- [24] **SHARMA, O. P.** *Textbook of Fungi*. New Delhi: Tata McGraw-Hill, 1989. ISBN: 0-07-460329-9.
- [25] **Chang S.T., Miles P.G.** Mushrooms biology - a new discipline. *Mycologist*. 1992, 6, stránky 64-65.
- [26] **Hawksworth, D.L.** The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*. 1991, 95, stránky 641-655.
- [27] **Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Jülich W.D.** The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)*. 2005, 2, stránky 285-299.
- [28] **Pokhrel C.P., Ohga S.** Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chemistry*. 2007, 105, stránky 641-646.
- [29] **Ying J., Mao X., Ma Q., Zong Y., Wen H.** *Icones of medicinal fungi from China*. Beijing: Science Press, 1987. str. 575. ISBN-10: 7030001958.
- [30] **W.M., Breene.** Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection*. 1990, 53, stránky 883-894.
- [31] **Hawksworth D.L.** Mushrooms: The extent of the unexploited potential. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2001, 3, stránky 333-337.
- [32] **Wasser S.P., Weis A.L.** Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycete mushrooms: current perspective (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1999, 1, stránky 31-62.
- [33] **Stephenson, S. L.** *The Kingdom Fungi: The Biology of Mushrooms, Molds, and Lichens*. Portland: Timber Press, Inc., 2010. 978-0-88192-891-4.
- [34] **Felklová M.** *Systematická botanika pro farmaceuty*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 1996. str. 212.
- [35] **Campbell, A. N., Reece, J. B.** *Biology*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2008. str. 1267. ISBN: 9780805368444.
- [36] **Jelínek, J., Zicháček, V.** *Biologie pro gymnázia*. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2006. str. 575. ISBN: 9788071822172.
- [37] **Raudaskoski M., Kothe E.** Basidiomycete Mating Type Genes and Pheromone Signaling. *Eukaryotic Cell*. 2010, 6 (9), stránky 847-859.
- [38] **Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M.** *Introductory mycology*. 4. New York : John Wiley & Sons, 1996. str. 880. ISBN: 978-0-471-52229-4.

- [39] **Herbarium, Australian National.** Schizophyllum commune. [Online] Australian National Herbarium, 12. Leden 2011. [Citace: 24. Březen 2011.] Photograph of herbarium sheet CANB 0042, Australian National Herbarium, Centre for Plant Biodiversity Research, Canberra, ACT.
<http://www.anbg.gov.au/fungi/images-captions/schizophyllum-commune-0042.html>.
- [40] **Matheny B., Moncalvo J.-M., A. Redhead S.** Agaricales. *Agaricales*. [Online] Version 09, 5 2007. [Citace: 20. 3 2011.] The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.
<http://tolweb.org/Agaricales/20551/2007.05.09>.
- [41] **Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., Stalpers, J. A.** *Dictionary of the fungi*. 10. Wallingford: CABI, str. 771, 2008. ISBN: 978-0-85199-826-8.
- [42] **Kavanagh, K.** *Fungi: Biology and Applications*. Chichester: Wiley, 2005. str. 280. ISBN: 0-470-86702-7.
- [43] **Bauer R., Begerow D., Sampaio J.P., Weiss M., Oberwinkler F.** The simple-septate basidiomycetes: a synopsis. *Mycological Progress*. 2006, 5, stránky 41-66.
- [44] **Smith J.E., Barry D.R.** *The filamentous fungi. Vol. 3. Developmental mycology*. London: Edward Arnold, 1978. str. 464. ISBN 0-7131-2642-6.
- [45] **Ghoshroy S., Lartey R., Sheng J., Citovsky V.** Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1997, 48, stránky 27-50.
- [46] **Müller W.H., Montijn R.C., Humbel B.M., van Aelst A.C., Boon E.J.M., van der Kruit T.P., Boekhout T.** Structural differences between two types of basidiomycete septal pore caps. *Microbiology*. 1998, 144, stránky 1721-1730.
- [47] **Müller W.H., Koster A.J., Humbel B.M., Ziese U., Verkleij A.J., van Aelst A.C., van der Kruit T.P., Montijn R.C., Boekhout T.** Automated electron tomography of the septal pore cap in *Rhizoctonia solani*. *The Journal of Structural Biology*. 2000, 131, stránky 10-18.
- [48] **Markham P.** Occlusions of septal pores in filamentous fungi. *Mycology Research*. 1994, 98, stránky 1089-1106.
- [49] **Kavanagh K.** *Fungi: Biology and Applications*. Chichester: Wiley, 2005. str. 269. ISBN: 0-470-86702-7.
- [50] **Hölker U., Lenz J.** Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*. 2005, 8 (3), stránky 301-306.
- [51] **Hölker U., Höfer M., Lenz J.** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64, stránky 175-186.
- [52] **Tanga Y.-A., Zhong J.-J.** Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, 32 (3-4), stránky 478-484.
- [53] **Kim S.W., Hwang H.J., Xu C.P., Choi J.W., Yun J.W.** Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*. 2003, 36, stránky 321-326.
- [54] **Hwang H.-J., Kim S.-W., Choi J.-W., Yun J.-W.** Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, 33, stránky 309-319.
- [55] **Shin K.-S., Yu K.-W., Lee H.-K., Lee H., Cho W.-D., Suh H.-J.** Production of Anti-Complementary Exopolysaccharides from Submerged Culture of *Flammulina velutipes*. *Food Technology and Biotechnology*. 2007, 45 (3), stránky 319-326.

- [56] **Alam N., Cha Y.J., Shim M.J., Lee T.S., Lee U.Y.** Cultural Conditions for Mycelial Grown and Molecular Phylogenetic Relationship in Different Wild Strains of *Schizophyllum commune*. *Mycobiology*. 2010, 38 (1), stránky 17-25.
- [57] **Shu C.-H., Xu C.-J.** Medium Optimization for Producing Bioactive Exopolysaccharides by *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (= *A. blazei* Murrill ss. Heinem) in Submerged Culture. *Food Technology and Biotechnology*. 2007, 45 (3), stránky 327-333.
- [58] **Bolla K., Shaheen S.Z., Vasu K., Singara Charya M.A.** Effect of oils on the production of exopolysaccharides and mycelial biomass in submerged culture of *Schizophyllum commune*. *African Journal of Microbiology Research*. 2008, 2, stránky 349-352.
- [59] **Yang F.C., Ke Y.F., Kuo S.S.** Effect of fatty acids on the mycelial grown and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 27, stránky 295-301.
- [60] **Hao L.-M., Xing X.-H., Li Z., Zhang J.-C., Sun J.-X., Jia S.-R., Qiao C.-S., Wu T.** Optimization of Effect Factors for Mycelial Growth and Exopolysaccharide Production by *Schizophyllum commune*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 160, stránky 621-631.
- [61] **Chauhan A.K., Varma A.** *A Textbook of Molecular Biotechnology*. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2009. str. 1354. ISBN: 9789380026374.
- [62] **Šandula J., Kogan G., Kačuráková M., Machová E.** Microbial (1,3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers*. 1999, 38 (3), stránky 247-253.
- [63] **Mislovičová D., Masárová J., Bendžálová K., Šoltés L., Machová E.** Sonication of chitin–glucan, preparation of water-soluble fractions and characterization by HPLC. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2000, 7 (2), stránky 63-68.
- [64] **Machová E., Kogana G., Šoltés L., Kvapilová K., Šandula J.** Ultrasonic depolymerization of the chitin–glucan isolated from *Aspergillus niger*. *Reactive and Functional Polymers*. 1999, 42 (3), stránky 265-271.
- [65] **Sietsma J.H., Wessels J.G.H.** Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biocimica et Biophysica Acta*. 1977, 496, stránky 225-239.
- [66] **Tanner W., Loewus F.A.** *Encyclopedia of plant physiology. New series. Volume 13B. Plant carbohydrates II. Extracellular carbohydrates*. Berlin: Springer, 1981. str. 769. ISBN: 3-540-11007-0.
- [67] **Wessels J.G.H.** Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytology*. 1993, 123, stránky 397-413.
- [68] **Gow N.A., Gadd G.M.** *The Growing Fungus*. London: Chapman & Hall, 1995. str. 496. ISBN: 0 412 46600 7.
- [69] **Popolo L., Vai M.** The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1999, 1426, stránky 385-400.
- [70] **Kamada T., Fujii T., Takemaru T.** Stipe elongation during basidiocarp maturation in *Coprinus macrorhizus* - changes in activity of cell-wall lytic enzymes. *Transactions of the Mycological Society of Japan*. 1980, 21, stránky 359-367.
- [71] **Marchant R.** Wall composition of monokaryons and dikaryons of *Coprinus cinereus*. *Journal of General Microbiology*. 1978, 106, stránky 195-199.
- [72] **Kamada T., Takemaru T.** Stipe elongation during basidiocarp maturation in *Coprinus macrorhizus* - changes in polysaccharide composition of stipe cell-wall during elongation. *Plant Cell Physiology*. 1977, 18, stránky 1291-1300.

- [73] **Sietsma J.H., Wessels J.G.H.** Solubility of (1,3)- β -D-(1,6)- β -D-glucan in fungal walls - importance of presumed linkage between glucan and chitin. *Journal of General Microbiology*. 1981, 125, stránky 209-212.
- [74] **Ensley H. E., Tobias B., Pretus H. A., McNamee R. B., Jones E. L., Browder W., Williams D. L.** NMR spectral analysis of a water-insoluble (1,3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Research*. 1994, 258, stránky 307-311.
- [75] **Bacic A., Fincher G. B., Stone B. A.** *Chemistry, biochemistry and biology of (1,3)- β -glucans and related polysaccharides*. Elsevier Inc., 2009. str. 677. ISBN: 978-0-12-373971-1.
- [76] **Kollar R., Reinhold B., Petrakova E., Yeh H., Ashwell G., Drgonova J., Kapteyn J., Klis F., Cabib E.** Architecture of the yeast cell wall – β -(1,6)-glucan interconnects mannoprotein, β -(1,3)-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, 272, stránky 17762-17775.
- [77] **Kim Y. T., Kim E. H., Cheong C., Williams D. L., Kim C. W., Lim S. T.** Structural characterization of β -D-(1,3;1,6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. 2000, 328, stránky 331-341.
- [78] **Mol P. C., Park H. M., Mullins J. T., Cabib E.** A GTP-binding protein regulates the activity of (1,3)- β -glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1994, 269, stránky 31267-31274.
- [79] **Qadota H., Python C. P., Inoue S. B., Arisawa M., Anraku Y., Zheng Y., Watanabe T., Levin D. E., Ohya Y.** Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of (1,3)- β -glucan synthase. *Science*. 1996, 272, stránky 279-281.
- [80] **Montijn R., Vink E., Müller W., Verkleij A., Van Den Ende H., Henrissat B., Klis F.** Localization of synthesis of β -(1,6)-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 1999, 181, stránky 7414-7420.
- [81] **Roncero, C.** The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current Genetics*. 2002, 41, stránky 367-378.
- [82] **Trilla J.A., Cos T., Duran A., Roncero C.** Characterization of CHS4 (CAL2), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to SKT5 and Csd4. *Yeast*. 1997, 13, stránky 795-807.
- [83] **Munro C.A., Selvaggini S., De Bruijn I., Walker L., Lenardon M.D., Gerssen B., et al.** The PKC, HOG and Ca^{2+} signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*. 2007, 63, stránky 1399-1413.
- [84] **Hirano Y., Walthert L., Brunner I.** Callose in root apices of European chestnut seedlings; a physiological indicator of aluminium stress. *Tree Physiology*. 2006, 24, stránky 1270-1283.
- [85] **Kauss H., Jeblick W.** Influence of free fatty acids, lysophosphatidylcholine, platelet-activating factor, acylcarnitine and echinocandin B on (1,3)- β -D-glucan synthase and callose synthesis. *Plant Physiology*. 1986, 80, stránky 7-13.
- [86] **Kauss H., Jeblick W.** Solubilization, affinity chromatography and Ca^{2+} /polyamine activation of the plasma membrane-located (1,3)- β -D-glucan synthase. *Plant Science*. 1987, 48, stránky 63-69.
- [87] **Meins F. Jr., Neuhaus J.-M., Sperisen C., Ryals J.** *The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes*. Vienna: Springer, 1992. stránky 245-284 ISBN: 3-211-82312-3.
- [88] CAZyedia. [Online] Primary Curator - Harry Brumer, Royal Institute of Technology, Stockholm, SWE, 16. 10. 2009. [Citace: 08. 09 2010.] http://www.cazyedia.org/index.php/Main_Page.

- [89] **Woodward J. R., Fincher G. B.** Purification and chemical properties of two (1,3;1,4)- β -D-glucan endohydrolases from germinating barley. *European Journal of Biochemistry*. 1982, 121, stránky 663-669.
- [90] **Woodward J. R., Fincher G. B.** Substrate specificities and kinetic properties of two (1,3;1,4)- β -D-glucan endo-hydrolases from germinating barley (*Hordeum vulgare*). *Carbohydrate research*. 1982, 106, , stránky 111-122.
- [91] **Pitson S. M., Seviour R. J., Mcdougall M. C., Stone B. A., Sadek M.** Purification and characterization of an extracellular (1,6)- β -glucanase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum*. *Biochemistry Journal*. 1996, 316, stránky 841-846.
- [92] **Coutinho P., Henrissat B.** *Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999, stránky 3-12.
- [93] **Hrmova M., Fincher G. B.** Barley β -D-glucan exohydrolases. Substrate specificity and kinetic properties. *Carbohydrate research*. 1998, 305, stránky 209-221.
- [94] **Wessels, J. G. H., Kreger, D. R., Marchant, R., et al.** Chemical and morphological characterization of the hyphal wall surface of the Basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1972, 273, stránky 346-358.
- [95] **Di Mario F., Rapan P., Tomati U., Galli E.** Chitin and chitosan from Basidiomycetes. *International Journal of Biological Macromolecules* . 2008, 43, stránky 8-12.
- [96] **Sietsma J.H., Wessels J.G.H.** Solubility of (1,3)- β -D/(1,6)- β -D-Glucan in Fungal Walls: Importance of Presumed Linkage between Glucan and Chitin. *Journal of General Microbiology*. 1981, 125, stránky 209-212.
- [97] **Muzzarelli R.** *Chitosan-glucan complex, method for its production and end uses*. US 4,368,322 4. 8 1981.
- [98] **Muzzarelli R.** *Chitosan-glucan complex, method for its production and end uses*. US 4,368,322 11. 1 1983.
- [99] **Hershberger D.F.** *Preparation of mycelial chitosan and glucan fractions from microbial biomass*. US 4,806,474 21. 2 1989.
- [100] **Teslenko A., Nikolaewna W.I.** *Process for producing chitosan-glucan complexes, compounds producible therefrom and their use* . US 6,333,399 25. 12 2001.
- [101] **Bohlmann J.A., Schisler D.O., Hwang K.-O., Henning J.P., Trinkle J.R., Anderson T.B., Steinke J.D., Vanderhoff A.** *N-acetyl-D-glucosamine and process for producing N-acetyl-D-glucosamine* . US 6,693,188 17. 3 2004.
- [102] **Fan W.** *Chitosan and method of preparing chitosan* . US 6,972,284 B2 6. 12 2005.
- [103] **Fan W., Bohlmann J.A., Trinkle J.R., Steinke J.D., Hwang K.-O., Henning J.P.** *Glucosamine and method of making glucosamine from microbial biomass*. US 7,049,433 23. 5 2006.
- [104] **Okazaki H., Hamaya T., Kurihara S.** *Chitosan-containing polysaccharide, method for preparing the same and use thereof* . US 7,195,675 27. 3 2007.
- [105] **Fan W., Bohlmann J.A., Trinkle J.R., Steinke J.D., Hwang K.-O., Henning J.P.** *Chitosan and method of preparing chitosan*. US 7,413,881 19. 8 2008.
- [106] **Versali M.-F., Clerisse F., Bruyere J.-M., Gautier S.** *Cell wall derivatives from biomass and preparation thereof*. US 7,556,946 7. 7 2009.
- [107] **Fosdick L.E., Bohlmann J.A., Trinkle J.R., Ray B.L.** *Glucosamine and method of making glucosamine from microbial biomass*. US 7,816,514 19. 10 2010.
- [108] **Bohn J. A., BeMiller J. N.** (1,3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate polymers*. 1995, 28, stránky 3-14.

- [109] **Brown G. D., Gordon S.** Immune Recognition: A new receptor for β -glucans. *Nature*. 2001, 413, stránky 36-37.
- [110] **Chen J., Seviour R.** Medicinal importance of fungal β -(1,3;1,6)-glucans. *Mycological Research*. 2007, 111, stránky 635-652.
- [111] **Mueller A., Raptis J., Rice P. J., Kalbfleisch J. H., Stout R. D., Ensley H. E., Browder W., Williams D. L.** The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1,3)- β -D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology*. 2000, 10, stránky 339-346.
- [112] **Harler M. B., Wakshull E., Filardo E. J., Albina J. E., Reichner J. S.** Promotion of neutrophil chemotaxis through differential regulation of beta 1 and beta 2 integrins. *Journal of Immunology*. 1999, 162, stránky 6792 - 6799.
- [113] **Taylor P. R., Brown G. D., Reid D. M., Willment J. A., Martinez-Pomares L., Gordon S., Wong S. W. C.** The β -glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *Journal of immunology*. 2002, 169, stránky 3876 - 3882.
- [114] **Brown G. D., Herre J., Williams D. L., Willment J. A., Marshall A. S. J., Gordon S.** Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *Journal of Experimental medicine*. 2003, 197, stránky 1119-1124.
- [115] **Underhill D. M., Ozinsky A., Hajjar A. M., Stevens A., Wilson C. B., Bassetti M., Aderem A.** The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*. 1999, 401, stránky 811-815.
- [116] **Brown D.G.** Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. 6 *Nature Reviews Immunology*. 2006, 6, stránky 33-43.
- [117] **Yoshitomi H., Sakaguchi N., Kobayashi K., Brown G. D., Tagami T., Sakihama T., Hirota K., Tanaka S., Nomura T., Miki I., Gordon S., Akira S., Nakamura T., Sakaguchi S.** A role for fungal β -glucans and their receptor Dectin-1 in the induction of autoimmune arthritis in genetically susceptible mice. *Journal of Experimental medicine*. 2005, 201, stránky 949-960.
- [118] **Inoue K, Takano H., Koike E., Yanagisawa R., Oda T., Tamura H., Adachi Y., Ishibashi K., Ohno N.** Candida soluble cell wall β -glucan facilitates ovalbumin-induced allergic airway inflammation in mice: Possible role of antigen-presenting cells. *Respiratory Research*. 2009, 68 (10), DOI: 10.1186/1465-9921-10-68.
- [119] **Kimura Y., Sumiyoshi M., Suzuki T., Suzuki T., Sakanaka M.** Inhibitory effects of water-soluble low-molecular-weight β -(1,3;1,6)-D-glucan purified from *Aureobasidium pullulans* GM-NH-1A1 strain on food allergic reactions in mice. *International Immunopharmacology*. 2007, 7, stránky 963-972.
- [120] **Adams E. L., Rice P. J., Graves B., Ensley H. E., Yu H., Brown G. D., Gordon S., Monteiro M. A., Papp-Szabo E., Lowman D. W., Power T. D., Wempe M. F., Williams D. L.** Differential high affinity interaction of Dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side chain branching. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008, 325, stránky 115-123.
- [121] **Delaney B., Carlson T., Frazer S., Zheng T., Hess R., Ostergren K., Kierzek K., Haworth J., Knutson N., Junker K., Jonker D.** Evaluation of the toxicity of concentrated barley β -glucan in a 28-day feeding study in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2003, 41, stránky 477-487.
- [122] **Mangani M., Calliari C. M., De Macedo F. C., Mori M. P., De Syllos Cólus I. M., Castro-Gomez R. J. H.** Optimized methodology for extraction of (1,3;1,6)- β -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* and in vitro evaluation of the cytotoxicity and

- genotoxicity of the corresponding carboxymethyl derivative. *Carbohydrate polymers*. 2009, 78, stránky 658-665.
- [123] **Yoshioka S., Ohno N., Miura T., Adachi Y., Yadomea T.** Immunotoxicity of soluble β -glucans induced by indomethacin treatment. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 1998, 21 (3), stránky 171-179.
- [124] **Takahashi H., Ohno N., Adachi Y., Yadomea T.** Association of immunological disorders in lethal side effect of NSAIDs on β -glucan-administered mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2001, 31, stránky 1-14.
- [125] **Castranova, Shih-Hough Young and Vincent.** *Toxicology of (1,3)- β -glucans: Glucans as a Marker for Fungal Exposure*. CRC Press, 2005. 232 str. ISBN: 978-0-415-70037-5.
- [126] **Iwamoto N., Yoshioka T., Nitta K., Ito K.** Glomerular endothelial injury associated with free radical production induced by a fungal cell wall component, (1,3)- β -D-glucan. *Life Science*. 1998, 62, stránky 247-255.
- [127] **Chen G.C., Johnson B.R.** Improved Colorimetric Determination of Cell Wall chitin in Wood Decay Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, 46 (1), stránky 13-16.
- [128] **Khan T.A.** Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2002, 5 (3), stránky 205-212.
- [129] **Heimlich, K. R., Martin, A. N.** A Kinetic Study of Glucose Degradation in Acid Solution. *Journal of American Pharmaceutic Association*. 1960, 49, stránky 592-597.
- [130] **Rau U.** Production of schizophyllan. [autor knihy] Bucke C. *Carbohydrate Biotechnology Protocols*. 10. Totowa: Humana Press Inc., 1999, 4, stránky 43-55.
- [131] **Kumari M., Survase S.A., Singhal R.S.** Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. *Bioresource Technology*. 2008, 99, stránky 1036-1043.
- [132] **Hsu Y.-C.** Effects of glutamic acid supplement and oxygen supply on schizophyllan formation in batch cultures of *Schizophyllum commune*. [Master's Thesis]. 2001. 140 str.
- [133] **Jonathan S.G., Fasidi I.O.** Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *Schizophyllum commune* (Fr. Ex. Fr) from Nigeria. *Food Chemistry*. 2001, 75 (3), stránky 303-307.
- [134] **Fang Q.H., Zhong J.J.** Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*. 2002, 37, stránky 769-774.
- [135] **Rau U., Gura E., Oleszewski E., Wagner F.** Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1992, 9, stránky 19-26.
- [136] **Rau U.** Glucans secreted by fungi. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*. 2004, 2, stránky 30-36.
- [137] **Yang F.C., Liu C.B.** The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry*. 1998, 33, stránky 547-553.
- [138] **Babitskaya V.G. et. al.** Exopolysaccharides of some medicinal mushrooms: production and composition. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 1, 2000, 2, stránky 51-54.

- [139] **Щерба В.В., Бабицкая В.Г.** Образование внеклеточных полисахаридов некоторыми видами базидиомицетов . *Прикл. биохим. и микробиол.* 4, 1997, 33, stránky 419-422.
- [140] **Puchkova T.A., Babitskaya V.G., Rozkova Z.A.** Physiology and properties of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing in submerged culture . *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 2001, 3 (2-3), str. 206.
- [141] **Song C.H., Cho K.Y., Nair N.G.** A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes* . *Mycologia.* 6, 1987, 79, stránky 866-876.
- [142] **Wasser S.P., Elisashvili V., Tan K.K.** Effects of Carbon and Nitrogen Sources in the Medium on *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. (Heterobasidiomycetes) Growth and Polysaccharide Production. *International Journal of Medicinal Mushrooms.* 1, 2003, 5, stránky 50-58.
- [143] **Kima H.O., Lima J.M., Jooa J.H., Kima S.W., Hwanga H.J., Choib J.W., Yun J.W.** Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technology.* 2005, 96 (10), stránky 1175-1182.
- [144] **Adejoye O.D., Fasidi I.O.** Effect of Cultural conditions on Biomass and Laccase production in submerged medium by *Schizophyllum commune* (Fr.), A Nigerian edible Mushroom. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry.* 2009, 8 (11), stránky 1186-1193.
- [145] **Tang Y.J., Zhong J.J.** Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in bioreactor. *Biotechnology Letters.* 2002, 24, stránky 1023-1026.
- [146] **Andersona I.C., Chambersa S.M., Cairney J.W.G.** Intra- and interspecific variation in patterns of organic and inorganic nitrogen utilization by three Australian *Pisolithus* species. *Mycological Research.* 1999, 103 (12), stránky 1579-1587.
- [147] **Bolla K., Gopinath B.V., Shaheen S.Z., Singara Charya M.A.** Optimization of carbon and nitrogen sources of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Trametes versicolor*. *International Journal of Biotechnology.* 2010, 1 (1), stránky 015-021.
- [148] **Hamedi A., Vahid H., Ghanati F.** Optimization of the Medium Composition for Production of Mycelial Biomass and Exo-Polysaccharide by *Agaricus blazei* Murill DPPh 131 Using Response-Surface Methodology. *Biotechnology.* 2007, 6 (4), stránky 456-464.
- [149] **Elisashvili V.I., Kachlishvili E.T., Wasser S.P.** Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2009, 45 (5), stránky 531-535.
- [150] **Vahidi H., Kobarfard F., Namjoyan F.** Effect of cultivation conditions on growth and antifungal activity of *Mycena leptoccephala*. *African Journal of Biotechnology.* 2004, 3 (11), stránky 606-609.
- [151] **Jonathan S.G., Fasidi I.O.** Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. *Food Chemistry.* 2001, 72 (4), stránky 479-483.
- [152] **Hwang H.J., Kim S.W., Xu C.P., Choi J.W., Yun J.W.** Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *Journal of Applied Microbiology.* 2004, 96 (6), stránky 1296-1305.
- [153] **Gibbs P.A., Seviour R.J., Schmid F.** Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. *Critical Reviews in Biotechnology.* 2000, 20 (1), stránky 17-48.

- [154] **Hwang H.J., Kim S.W., Yun J.W.** Modern Biotechnology of *Phellinus baumii* – From Fermentation to Proteomics. *Food Technology and Biotechnology*. 2007, 45 (3), stránky 306-318.
- [155] **Amorim R.V.S., de Souza W., Fukushima K., Campos-Takaki G.M.** Faster chitosan production by Mucoralean strains in submerged culture. . *Brazilian Journal of Microbiology*. 2001, 32, stránky 20-23.
- [156] **Wessels J.G.H., Sietsma J.H., Sonnenberg A.S.M.** Wall Synthesis and Assembly During Hyphal Morphogenesis in *Schizophyllum commune*. *Journal of General Microbiology*. 1983, 129, stránky 1607-1616.
- [157] **Aguilar-Uscanga B., Francois J.M.** A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*. 2003, 37, stránky 268-274.
- [158] **Shih I.-L., Pan K., Hsieh C.** Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*. 2006, 41 (5), stránky 1129-1135.
- [159] **Van Peer, A.F.** *Structure and function of the septal pore cap of Schizophyllum commune*. Enschede: University Utrecht, 2008. str. 120. Thesis. ISBN: 978-90-71382-60-4.
- [160] **Český lékopis 2009 (ČL2009): Pharmacopoea Bohemica MMIX (Ph.B. MMIX)**. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN: 978-802-4729-947.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

B-buňka	B-lymfocyt
CAZy	Carbohydrate-Active Enzymes
CD	Cluster of Differentiation, CD klasifikace podle povrchových znaků buněk
COX	cyklooxygenáza
CR3	komplementový receptor
Dectin-1	typ buněčného receptoru pro β -glukany
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FRU	fruktosa
GLU	glukosa
HOG	High Osmolarity Glycerol Pathway
CHGK	chitosan-glukanový komplex
IČ	infračervené
IL	interleukin
INF- γ	interferon gama
KA	kvasničný autolyzát
K_L	objemový koeficient přestupu kyslíku
LAC	laktosa
LacCer	receptor pro laktosylceramid
MAC-1	receptor monocytů, neutrofilů a NK-buněk
MAL	maltosa
MIP	receptor zánětlivých proteinů makrofágů
N	molarita ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
NK buňky	imunitní buňky, přirození zabíječi („natural killer“)
NMR	nukleární magnetická rezonance
NSAID	nesteroidní antirevmatika
PBS pufr	„Phosphate Buffered Saline“, fosfátový pufr pH 7 s 0,15 M NaCl
PDA	bramboro-dextrosový agar („Potatoe Dextrose Agar“)
PKC	proteinkinázová signální dráha
PLA2	fosfolipáza A2
	- text byl odstraněn z důvodu utajení –
rpm	počet otáček za minutu („revolutions per minute“)
SAC	sacharosa
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SCH	Schizophyllan
T-buňka	T-lymfocyt
T_H1	efektorový T-lymfocyt
TLR	jeden z rozpoznávacích receptorů buněk („Toll-like receptors“)
TNF	tumor nekrotizující faktor
UDP	uridindifosfát-glukosa
vvm	vzdušnění; vyjadřuje objemový průtok vzduchu ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) vztažený na objem fermentoru (L)