



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉHO ÚČINKU GLUKANŮ NA
BUNĚČNÝCH LINIÍCH IN VITRO**

TESTING OF BIOLOGICAL EFFECT OF GLUCANS ON CELL LINES IN VITRO

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eva Šimková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1720/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Eva Šimková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Němcová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Testování biologického účinku glukanů na buněčných liniích in vitro

Zadání bakalářské práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Optimalizace metod pro izolaci a stanovení glukanů
- 3) Testování glukanů a vyhodnocení výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.8.2021:

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

Eva Šimková
student(ka)

Ing. Andrea Němcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je izolace a testování β -glukanů z vybraných kmenů kvasinek. V teoretické části je vypracována charakterizace β -glukanů, mikrobiální produkce β -glukanů kvasinkami, stanovení polysacharidů, exopolysacharidů a testování in vitro.

Kvasinky mají buněčnou stěnu tvořenou β -glukany. β -glukany jsou známy pro své léčivé účinky. Experimentální část bakalářské práce se zabývá charakterizací vybraných biomas kvasinek v různých formách, srovnáním jejich účinků a množství β -glukanů v jednotlivých formách. Byly vybrány kmeny kvasinek *Metschnikowia pulcherrima*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* a *Rhodotorula kratochvilovae*. Následně se práce zabývá izolací a testováním izolovaných β -glukanů z vybraného lyofilizovaného kmene kvasinek *Rhodotorula kratochvilovae*.

Vybraný kmen byl izolován 2 způsoby. První způsob izolace, který byl šetrnější ke konformaci β -glukanů díky působení ultrazvukové homogenizace buněk. Druhý způsob izolace byl méně šetrný ke β -glukanům, pro jejich homogenizaci se využívala kyselina a zásada. Analýzy obou extrakčních metod potvrdily přítomnost izolovaných β -glukanů, nicméně bylo zjištěno, že výtěžnost obou metod byla poměrně nízká a vyžaduje další optimalizaci postupu. Celkově lepším extrakčním postupem byla metoda II. Vzorek tohoto extraktu byl dále testován na buněčné linii HaCaT. Výsledky pilotních testů potvrdily cytotoxicitu u námi získaného extraktu.

KLÍČOVÁ SLOVA

β -glukan, polysacharidy, kvasinky, mastné kyseliny, karotenoidy, antimikrobiální testy, antioxidační testy, MTT test.

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis is isolation and testing of β -glucans from selected strains of yeast. In the theoretical part, characterisation of β -glucans, microbial production of β -glucans by yeast, determination of polysaccharides, exopolysaccharides and in vitro testing are described.

Yeast have a cell wall made up of β -glucans and β -glucans are known for their healing properties. In the experimental part of this work deals with characterization of selected biomass yeasts in different forms and comparison of their effects and the amount of β -glucans in each form. Strains of *Metschnikowia pulcherrima*, *Cystofilobasidium infirmominatum* and *Rhodotorula kratochvilovae* have been selected for this thesis. Subsequently, the thesis deals with the isolation and testing of isolated β -glucans from a selected lyophilised strain of yeast *Rhodotorula kratochvilovae*.

The selected strain was isolated in 2 ways. The first method of isolation that was more friendly to conformation of β -glucans due to the effect of ultrasonic homogenization of cells. The second method of isolation was less friendly to β -glucans, using acid and base to homogenise them. Analyses of both extraction methods confirmed the presence of isolated β -glucans, however it was found that the recovery of both methods was relatively low and requires further optimisation of the procedure. Overall, the better extraction procedure was the second method. A sample of this extract was further tested on the HaCaT cell line. The results of the pilot tests confirmed the cytotoxicity of the extract obtained by us.

KEY WORDS

β -glucan, polysaccharides, yeast, fatty acids, carotenoids, antimicrobial test, antioxidant test, MTT test.

ŠIMKOVÁ, Eva. *Testování biologického účinku glukánů na buněčných liniích in vitro* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-08-05]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131495>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Andrea Němcová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Andree Němcové, Ph.D. za cenné rady, vstřícnost a trpělivost při vypracovávání bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Martinu Szotkowskému, Ph.D. za odbornou pomoc při měření, ochotu trpělivost a rady zpracování bakalářské práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za podporu při studiu na vysoké škole.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	β-glukany	9
2.1.1	Stavba β-glukanů	9
2.1.2	Působení β-glukanů v organismu.....	9
2.1.3	Přírodní zdroje β-glukanů	10
2.1.4	Léčivé účinky β-glukanů	10
2.1.5	Rozpustnost β-glukanů	12
2.2	Mikrobiální produkce β-glukanů kvasinkami.....	12
2.2.1	Kvasinky	12
2.2.2	Buněčná stěna kvasinek	13
2.2.3	Biologicky aktivní látky	14
2.3	Stanovení polysacharidů, exopolysacharidů	16
2.3.1	Enzymatické stanovení kitem	16
2.3.2	Stanovení neutrálních cukrů podle Dubois	16
2.4	Spektrofotometrické a chromatografické metody.....	16
2.4.1	Spektrofotometrie.....	16
2.4.2	Stanovení karotenoidů HPLC	17
2.4.3	Stanovení lipidů GC.....	17
2.5	Testy in vitro	18
2.5.1	Testy viability a cytotoxicity.....	18
2.5.2	Buněčné kultury pro testování in vitro.....	19
3	CÍL PRÁCE.....	20
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1	Použité chemikálie	21
4.1.1	Chemikálie pro kultivaci	21
4.1.2	Chemikálie pro enzymatické stanovení kitem	21
4.1.3	Chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity.....	21
4.1.4	Chemikálie pro stanovení antimikrobiální aktivity.....	21
4.1.5	Chemikálie pro stanovení karotenoidů (HPLC).....	21
4.1.6	Chemikálie pro stanovení mastných kyselin (GC).....	22
4.1.7	Chemikálie pro MTT test	22
4.1.8	Chemikálie pro izolaci glukanů (I. postup).....	22
4.1.9	Chemikálie pro izolaci glukanů (II. postup)	22
4.1.10	Chemikálie pro barvení podle Grama	22
4.1.11	Chemikálie pro stanovení neutrálních sacharidů dle Duboise	23
4.1.12	Chemikálie pro stanovení proteinů dle Biureta.....	23
4.2	Přístroje a pomůcky	23
4.3	Mikroorganismy	23
4.4	Kultivace kvasinek	24
4.4.1	YPD agar.....	24
4.4.2	YPD inokulum	24

4.4.3	Produkční médium	25
4.5	Charakterizace vzorků biomasy	25
4.5.1	Enzymatické stanovení kitem	25
4.5.2	Stanovení antioxidační aktivity	28
4.5.3	Antimikrobiální test	28
4.5.4	Antimikrobiální stanovení – Agarová difúzní metoda	29
4.5.5	Stanovení karotenoidů (HPLC)	29
4.5.6	Stanovení mastných kyselin (GC)	30
4.5.7	Stanovení cytotoxicity	31
4.6	Izolace a stanovení glukánů	31
4.6.1	Izolace β -D-glukanů z kvasinek (I. Postup)	31
4.6.2	Izolace β -glukanů z kvasinek (II. Postup)	32
4.6.3	Enzymatické stanovení kitem	32
4.6.4	Stanovení neutrálních sacharidů metodou dle Duboise	32
4.6.5	Gramovo barvení	33
4.6.6	Stanovení celkových proteinů dle Biureta	33
4.6.7	MTT test	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
5.1	Stanovení vzorků biomasy	34
5.1.1	Stanovení glukánů enzymatickým kitem	34
5.1.2	Antioxidační aktivita	35
5.1.3	Antimikrobiální účinek	38
5.1.4	Antimikrobiální účinek – Agarová difúzní metoda	40
5.1.5	Stanovení karotenoidů (HPLC)	41
5.1.6	Stanovení mastných kyselin (GC)	44
5.1.7	MTT test	47
5.2	Stanovení vyizolovaných směsí glukánů	50
5.2.1	Gramovo barvení	50
5.2.2	Stanovení glukánů enzymatickým kitem	51
5.2.3	Stanovení neutrálních sacharidů dle Duboise	51
5.2.4	Stanovení karotenoidů (HPLC)	52
5.2.5	Stanovení mastných kyselin (GC)	54
5.2.6	Stanovení celkových proteinů dle Biureta	58
5.2.7	MTT test	58
6	ZÁVĚR	59
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	61
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	64

1 ÚVOD

Rozvoj biotechnologií a poznatků o mikroorganismech umožňuje využít řadu bioaktivních látek, které jsou těmito mikroorganismy produkovány. Řada těchto látek vykazuje zajímavé účinky na lidské a zvířecí zdraví. Tyto biologicky aktivní látky působí příznivě nebo nepříznivě na lidský organismu. Tyto látky můžeme rozdělit podle účinků na člověka na látky podporující imunitní systém, na látky podporující nervový systém, na látky podporující oběhový systém, na látky podporující respirační systém, na látky podporující trávicí systém a na látky podporující endokrinní systém. Látky s negativními účinky můžeme využít při léčbě rakoviny, jelikož některé látky vykazují protinádorové účinky, kdy inhibují růst rakovinné tkáně.

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, které patří mezi houby. Kvasinky jsou pro nás výhodné organismy pro produkci, jelikož dokážou likvidovat odpadní substráty. A z těchto substrátů do sebe dokážou vstřebávat živiny a produkovat pro nás zajímavé látky jako jsou karotenoidy, lipidy či glukany. Tyto látky jsme schopni vyizolovat a použít pro výrobu potravinových doplňků, léčiv nebo kosmetických výrobků.

Kvasinky mají pevné buněčné stěny tvořené polysacharidy, lipidy a fosfolipidy. Hlavní složkou polysacharidů v buněčné stěně kvasinek jsou β -glukany. β -glukany mají v buněčné stěně dvě funkce. První funkcí u β -(1,3)-glukanů je tvorba pevné struktury buněčné stěny. Druhou funkci zastává β -(1,6)-glukan, který tuto pevnou strukturu drží pohromadě.

Glukany jsou přírodní látky s léčivými účinky. Tyto látky se využívají v doplňcích stravy pro podporu imunity. β -glukany mají například silné antioxidační účinky, působí protizánětlivě, snižují hladinu glukózy v krvi, napomáhají k rychlejšímu hojení ran a pomáhají při kožních onemocněních. Účinky β -glukanů se od sebe liší podle polohy glykosidické vazby a podle látky, ze které byly izolovány. Bylo zjištěno, že β -glukany izolované z kvasinek a hub podporují imunitní, nervový a hormonální systém.

Cílem bakalářské práce je izolace a testování β -glukanů z vybraných kmenů kvasinek. Pro izolaci β -glukanů byly optimalizované dva izolační postupy. Následné testování β -glukanů bylo provedeno pomocí MTT testů cytotoxicity na lidských buněčných liniích HaCaT.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 β -glukany

β -glukany jsou významné látky s léčivými účinky. Nalezneme je v buněčných stěnách kvasinek, ve vyšších houbách, řasách nebo u vyšších rostlin. V buňce slouží jako zdroj energie a tvoří pevnou buněčnou stěnu [1] [2].

β -glukany, které jsou obsažené v buněčné stěně kvasinek. Tedy β -(1,3)-glukan a β -(1,6)-glukan. β -(1,3)-glukan tvoří kostru buněčné stěny kvasinek a β -(1,6)-glukan tvoří jakési lepidlo, díky kterému drží jednotlivé stavební kameny buňky u sebe [3].

β -glukany se přidávají do doplňků stravy. Jedná se o stimulanty imunitního systému, dále dokážou snížit hladinu cholesterolu, napomoci při cukrovce, pomoci při léčbě popálenin nebo při léčbě rakoviny. Jedná se o silné antioxidanty, které mají vysokou schopnost záchytu volných radikálů a tím chránit náš organismus před nežádoucími účinky [2] [3] [4] [5].

2.1.1 Stavba β -glukanů

Jedná se o polysacharidy s dlouhým řetězcem, které se rozdělují podle umístění glykosidické vazby. Jejich základní jednotkou je glukóza. Glukóza se váže do pozice 1,3 a 1,6. Menší postranní řetězce najdeme na pozicích 1,3 a 1,4 i 1,6. Struktura tohoto polysacharidu je dále stabilizována pomocí vodíkových můstků. Jednotlivé β -glukany se od sebe liší polohou glykosidické vazby a postranními řetězci. Nejméně aktivní formou jsou β -(1,3)-D-glukany, které mají tvořeny základní řetězec z molekul glukózy spojený v pozicích 1,3 a obsahují postranní řetězce na pozicích 1,6 [1] [2] [6].

Přírodní β -(1,3)-D-glukan je charakterizován primární strukturou, rozpustností, molekulární hmotností, stupněm větvení, nábojem polymeru a konformací v roztoku (tzn. Jednoduchá šroubovice, trojitá šroubovice, náhodná smyčková konformace). Struktura makromolekul β -glukanů též závisí na zdroji a metodě izolace. Aktivita β -glukanů je ovlivněna stupněm větvení, nejvyšší biologickou aktivitu mají ty, které mají stupeň větvení v intervalu 0,20 – 0,33. Biologická aktivita je schopnost neutralizovat volné radikály [1] [2] [6].

2.1.2 Působení β -glukanů v organismu

Přesný mechanismus působení β -glukanů zatím není objasněn. Ovšem víme, že β -glukany kvasinek a hub podporují nervový systém, imunitní systém a hormonální systém. Fungují jako imunomodulátory. Imunomodulátor je látka, která mění rozsah imunitní odpovědi. Funguje jako stimulátor imunocytů a zároveň dokáže regulovat jejich počet. V případě poklesu imunocytů, kdy klesá obranyschopnost organismu, se díky přítomnosti β -glukanů začne tvořit větší počet imunocytů v krevním oběhu. Tato funkce β -glukanů, chrání organismus například během stresových podmínek. S pozitivním účinkem β -glukanů na imunitní systém též souvisí protinádorová aktivita, protizánětlivý efekt a podpora hojení ran [1] [4] [5] [7] [8].

β -glukany, které jsou obsaženy v obilovinách, působí pozitivně na hladinu cholesterolu a glukózy v krvi. A dají se použít jako prebiotikum. Prebiotikum je nestravitelná látka, obsažená v potravě či v doplňcích stravy, která podporuje růst a aktivitu střevní mikroflóry [8].

Biologická aktivita β -glukanu je ovlivněna jeho strukturou, molekulovou hmotností a rozpustností. Například β -(1,4)-glukany obsažené v obilovinách nevykazují žádné imunostimulační účinky, zatímco β -(1,3)-glukany tyto účinky mají [5] [9].

Lidský organismus vstřebává β -glukany postupně od žaludku až po dvanáctník, v případě perorálního podání. β -glukany se kromě zdravotnictví též využívají v zemědělství, v kosmetice nebo ve veterinární medicíně [1].

2.1.3 Přírodní zdroje β -glukanů

V cereální vláknině nalezneme β -glukany, které mají glykosidické vazby v polohách (1,3) a (1,4). Když porovnáme obsah β -glukanů ve všech obilovinách, tak nejvyšší obsah β -glukanů nalezneme u ječmene a ovsa. V případě ječmenu je obsah β -glukanů v rozmezí 3 – 11 %. A oves má 3 – 7 % β -glukanů. β -glukany u obilovin nalezneme ve vnitřních buněčných stěnách [10].

Dalším zdrojem β -glukanů jsou houby. β -glukany zde tvoří důležitou povrchovou složku hub, nalezneme zde především β -(1,3) a β -(1,6)-glukany. Mezi nejstudovanější β -glukany z hub patří lentinan [11].

β -D-glukany obsažené v kvasinkách se nachází v buněčných stěnách spolu s mannany a chitinem. Tyto β -glukany se skládají z primárního řetězce a rozvětvených polymerů. Primární řetězec je tvořen glukózovými polymery vázanými (1,3) a (1,6) glykosidickými vazbami. Rozvětvené polymery se skládají z hlavního řetězce a větvení. Kvasinkami, které obsahují β -glukany je např. *Saccharomyces cerevisiae*, *Cystofilobasidium informominitatum* a *Rhodotorula kratochvilovae* [12].

2.1.4 Léčivé účinky β -glukanů

β -glukany mají rozsáhlé léčivé účinky. Jedná se o silné antioxidanty, slouží jako prevence proti kardiovaskulárním onemocněním, mají imunomodulační účinky, mají protinádorové účinky, podporují růst kožních buněk, omezují nárůst hladiny glukózy v krvi po jídle, snižují hladinu cholesterolu a mají protizánětlivé účinky [1] [2].

β -glukany mají schopnost vychytávat volné radikály. Jsou významnou ochranou proti peroxidaci lipidů v krvi nebo plazmě. V kosmetickém průmyslu se využívají lokálně k aktivaci epidermálních makrofágů, tím se zabrání průniku mikrobů přes poranění a také se urychlí zotavení poškozené tkáně [2].

Jelikož jsou některé β -glukany nerozpustné, je prakticky vyloučené podání nitrožilně. Když byly β -glukany z buněk kvasinek podávány nitrožilně krysám, tak to mělo za následek rozvoj plicního granulomu. Tento granulom byl složen z monocytů a makrofágů [13].

2.1.4.1 Využití β -glukanů u léčení infekce

β -glukany mají protizánětlivé účinky. U několika studií bylo zjištěno, že β -glukany stimulují imunitní systém po napadení viry nebo bakteriemi, tím se zvýší tvorba protilátek. A při následné léčbě antivirotiky či antibiotiky můžeme snížit dávku těchto léčiv. Přičemž účinek léčby zůstane zachován [14] [15].

2.1.4.2 Snížení hladiny cholesterolu pomocí β -glukanů

Cholesterol je organická látka, která tělu pomáhá zpracovávat tuky. Též je důležitou látkou při tvorbě buněčných membrán. Je potřeba při tvorbě hormonů a vitamínů. U teplokrevných živočichů nalezneme cholesterol v játrech, v nadledvinách, žlučníku a ovlivňuje metabolismus tuků. Zvýšená hladina cholesterolu má negativní vliv na náš kardiovaskulární systém a způsobuje nám tím jeho onemocnění. V případě použití β -glukanů z hub, u kterých ještě mechanismus působení není zcela objasněn. Jejich účinek vysvětluje tím, že β -glukany vytvoří v tenkém střevě viskózní vrstvu, která snižuje absorpci žlučových kyselin. Žlučové kyseliny jsou produktem odbourávání cholesterolu [16] [17].

β -glukany jsou výhodné pro diabetiky, jelikož snižují hladinu cholesterolu, cukru a tuku v krvi, přičemž se nesnižuje množství inzulínu. V případě hub β -glukany obsahují např. látky lovastatin a purinový alkaloid eritadenin. Lovastatin nalezneme u hlívy ústříčné. Purinový alkaloid zase nalezneme u boltcovitce bezové, žampionu brazilském a v lesklokorce lesklé [16] [17].

2.1.4.3 Snižování hladiny cukru v krvi pomocí β -glukanů

Snižování hladiny cukru v krvi je potřeba u pacientů, kteří mají problémy s produkcí inzulínu. Tato nemoc je označována jako Diabetes a jedná se o chronické onemocnění. Inzulín se vytváří v slinivce břišní. Pokud si tělo inzulín nedokáže vytvořit, jedná se o tzv. diabetes. Existují dva typy tohoto onemocnění. Diabetes I. typu se nachází u lidí, kteří jsou závislí na injekčním podáním inzulínu, protože jejich tělo má absolutní nedostatek inzulínu. Diabetes II. typu je forma onemocnění, kdy si tělo vytvořilo rezistenci na inzulín a má relativní nedostatek inzulínu. Nejčastější příčinou Diabetesu II. typu je obezita [17].

Výzkum spojený s β -glukany stále probíhá. Podle studií z Japonska bylo zjištěno, že u laboratorních krys s vysokým obsahem glukózy v těle došlo k jeho snížení. Přesněji je uvedeno, že hodnota glukózy se snížila z hyperglykémie 43,3 % na 6,7 %. Z výzkumů vyplývá, že β -glukany nějak ovlivňují činnost Langerhansových ostrůvků a tím mohou zpomalit rozvoj diabetu [16].

2.1.4.4 Účinky β -glukanů při kožním onemocnění

Je potvrzeno, že výrobky s obsahem β -glukanů přispívají k revitalizaci kůže a působí lokálně. Dají se použít k léčbě povrchových zranění, dále k vyhlazení vrásek, k redukci vlhkosti kůže. Pro tyto účely se β -glukany izolují více z ovsu než z hub [15] [18].

2.1.5 Rozpustnost β -glukanů

β -glukany hub a kvasinek můžeme rozdělit dle rozpustnosti na:

- nerozpustné v zásadě, nerozpustné v octové kyselině β -(1,3)-glukany
- v zásadě rozpustné (β -(1,3)-glukany
- vysoce větvené β -(1,6)-glukany

Přípravky z nerozpustného β -glukanu mají nevhodné toxikologické účinky. Při intravenózním podání nerozpustných β -glukanů došlo u krysu k rychlému rozvoji plicního granulomu, který byl složen z monocytů a makrofágů. Dále se u jedinců, kterým byl podán nerozpustný β -(1,3)-glukan zvýšila náchylnost ke gramnegativním infekcím a endotoxinům. Dále byl u zvířat zjištěn rozvoj plicního granulomatózního zánětu cév, rozvoji mikroembolie a k dalším negativním účinkům [19].

Při použití přípravku z mírně rozpustného β -glukanu, tyto přípravky opět nejsou dostupné k nitrožilnímu podání, jelikož jsou ve formě vodných roztoků velice viskózní. V případě testů na zvířatech mělo toto podání za následek změny v cytoplazmě makrofágů v játrech, ledvinách, slezině, plicích, mízních uzlinách, v tenkém střevě a také způsobilo kožní léze a tromboembolii. Vezmeme-li přípravky z rozpustných β -glukanů, nacházíme u nich problém s jejich odbouráváním v těle. Jelikož při jejich dlouhodobém podávání bylo u myši zjištěno, že se hromadí v játrech, slezině a v dalších orgánech z retikuloendoteliálního systému. Rozpustnost β -glukanů ve vodě závisí na jejich struktuře. Čím více 1,4 vazeb bude mít v molekule, tím nižší bude rozpustnost polymeru. Při rozpuštění ve vodě tvoří gel [19].

2.2 Mikrobiální produkce β -glukanů kvasinkami

2.2.1 Kvasinky

Jedná se o jednobuněčné mikroorganismy, patřící mezi houby. Tento mikroorganismus se dokáže rozmnožovat pohlavně (pučením) nebo nepohlavně (dělením). Kvasinky jsou pro nás velice zajímavý organismus, který používáme především jako producenta látek, jako jsou ethanol, β -glukany, lipidy a další. Jejich využití nacházíme v potravinářství, v zemědělství, v biochemických laboratořích atd. V potravinářství je využíváme například u výroby piva, výroby pečiva, při výrobě mlékárenských produktů, při výrobě vína a dalších. Dále jsou biotechnologicky využívány ke zpracování odpadů z potravinářského a zemědělského průmyslu. Ale používáme je též k izolaci látek, které si sami průmyslově vyrobit nedokážeme. Naše neschopnost vyrobit si některé látky, se odvíjí od složitosti enzymů, které tyto látky produkují [20] [21].

2.2.1.1 Rod *Saccharomyces*

Jedná se o technologicky významný rod. Je většinou schopný zkvašovat několik cukrů. Kvasinky v tomto rodě nepoužívají laktosu jako zdroj uhlíku, ani dusičnany jako zdroje dusíku. Mezi zástupce tohoto rodu patří *Saccharomyces kluyeveri*, *Saccharomyces servazzii*, *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* je kvasinka oválného tvaru. Využívá se jako vinařská, lihovarská, pekařská a pivovarská kvasinka. Zkvašuje sacharózu, maltózu, glukózu a galaktózu. Kvasinka se dále využívá jako modelový organismus pro biochemické a genetické práce [21] [22].

2.2.1.2 Rod *Metschnikowia*

Mezi zástupce tohoto rodu patří *Metschnikowia pulcherrima*. Tato kvasinka má věččitý až elipsoidní tvar. Povrch kolonií je hladký a lesklý. Reprodukce je zajištěna pučením. Má antimikrobiální účinek na řadu kvasinek způsobující kažení potravin, mezi ně patří například rody *Brettanomyces*, ale zároveň má nedostatečnou antimikrobiální aktivitu na růst *Saccharomyces cerevisiae*. Tohoto účinku se využívá ve vinařství. Kdy tato kvasinka pokrývá povrchy bobulí čímž bobule chrání před kažením. Zároveň je tato kvasinka fermentativní druh a uvolňuje aromatické látky [21] [22].

2.2.1.3 Karotenogenní kvasinky

Jedná se o červené kvasinky, které jsou charakteristické produkcí karotenoidů. Karotenoidy se v kvasinkách syntetizují jako β -karoten, torulen, torulenhodin a astaxanthin. V kvasinkách dále nalezneme lipidy, ergosterol, ubichinon (koenzym Q10). Tyto látky slouží především jako ochrana před UV zářením ze slunce. Mezi tyto kvasinky patří rod *Cystofilobasidium*, rod *Rhodotorula*, rod *Sporidiobolus*, rod *Rhodospiridium*. Využívají se ke zpracování odpadních substrátů z výroby kávy, odpadních olejů [20] [21].

2.2.1.4 Rod *Cystofilobasidium*

Tento rod je příbuzný s rodem *Rhodotorula*, liší se typem basidia. Mezi zástupce rodu patří *Cystofilobasidium bisporei*, *Cystofilobasidium capitatum* a *Cystofilobasidium informominiatum*. Buňky mají kulovitý až oválný tvar. Povrch kolonií je hladký a lesklý. V kvasinkách tohoto rodu nedochází ke zkvašování cukrů. Kvasinky se vyskytují ve vodním prostředí v chladnějších oblastech [20] [22].

2.2.1.5 Rod *Rhodotorula*

Mezi zástupce tohoto rodu patří *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* a *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula kratochvilovae*. Tento rod nezksvašuje žádné cukry, ale má silně vyvinutý pentosový cyklus, který využívá glukózy. Buňky obsahují karotenoidní barviva, díky kterým mají barvu od žluté přes oranžovou až k červenofialové. Karotenoidní barviva chrání buňku před účinkem UV složky záření ze slunce. Tvoří kulovité až oválné buňky. Jedná se o oxidační látky, které vykazují lipolytickou, proteolýtickou a pektolytickou aktivitu. Bývají příčinou kontaminace masa, ovoce, zeleniny, mléčných výrobků a pekařských produktů. Za určitých podmínek mohou být některé kmeny patogenní. *Rhodotorula kratochvilovae* se využívá jako lihovarská kvasinka a patří do skupin karotenogenních kvasinek [21] [22] [24] [25] [26].

2.2.2 Buněčná stěna kvasinek

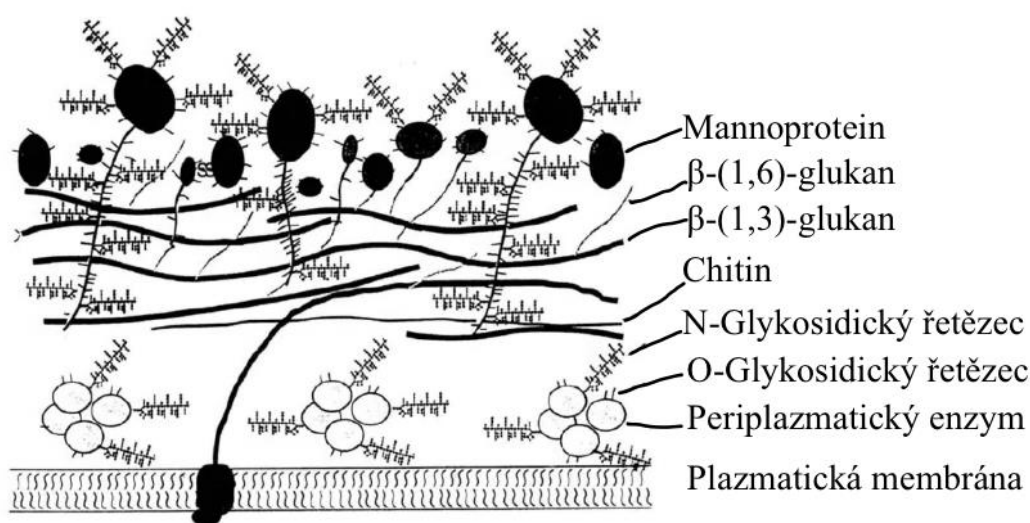
Jedná se o pevnou, polopropustnou ochrannou vrstvu buňky, která tvoří vnější plášť buňky. Tato stěna má funkci zachování tvaru a formy buňky, ochrany, podpory, regulace růstu, regulace difúze, komunikace a skladování. Tuto buněčnou stěnu nalezneme u většiny rostlinných buněk, řas, hub, kvasinek a bakterií. U rostlinných buněk se skládá především z vláken sacharidů polymeru celulózy. U bakteriální buňky zase nalezneme peptidoglykan. Houby mají buněčnou stěnu složenou především z chitinu, glukanu a proteinu [21].

Hlavní složkou buněčné stěny kvasinek jsou polysacharidy, tvoří asi 80 % sušiny buněčné stěny. Polysacharidy utvářejí vlákna, která se splétají dohromady. Tuto spleť vyplňují bílkoviny, bílkoviny tvoří asi 10 % sušiny buněčné stěny. V buněčné stěně můžeme dále nalézt malé množství lipidů, fosfolipidů a také fosforečnany, které jsou na polysacharidy vázány esterovými vazbami. Hlavní složkou polysacharidů v buněčné stěně kvasinek jsou glukany. Stavebními kameny glukanu v buněčné stěně jsou glukózové jednotky. Dále v buněčné stěně můžeme nalézt mannany, glukosamin a chitin [21].

U kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* je vnitřní vrstva buněčné stěny tvořena glukany a bílkoviny, v další vrstvě leží glukomannan a bílkoviny. A v poslední vnější vrstvě buněčné stěny se nacházejí mannany, bílkoviny a malé množství lipidů. Sedimentační schopnost kvasinek ovlivňuje složení vnější vrstvy buněčné stěny [21].

β -glukany v buněčné stěně mají dvě funkce. β -(1,3)-glukan tvoří páteř buňky. β -(1,6)-glukan působí jako lepidlo pro stavební kameny buněčné stěny, díky jeho rozvětvené polymer amorfní struktuře. V buněčné stěně jsou proteiny, β -(1,3)-glukanem, β -(1,6)-glukan a chitin vázány kovalentně [27] [28].

Na obrázku můžeme vidět průřez buněčnou stěnou, tato buněčná stěna se skládá ze dvou vrstev. Vnitřní vrstva tvořena chitinem, β -(1,3)-glukanem a β -(1,6)-glukanem. Tato vrstva dodává buňce pevnost. Vnější vrstva je tvořena mannoproteiny, které jsou připojeny k vnitřní vrstvě pomocí kovalentních vazeb [29].



Obrázek 1: Znárodnění buněčné stěny *Saccharomyces cerevisiae*. Obrázek byl převzat a přeložen [29].

2.2.3 Biologicky aktivní látky

Jedná se o látky, které působí příznivě nebo nepříznivě na lidský organismus. Dělí se na rostlinné a živočišné. Tyto látky můžeme dále dělit podle účinků na člověka na: látky podporující nervový systém, látky podporující oběhový systém, látky podporující respirační systém, látky podporující trávicí systém, látky podporující endokrinní systém a látky podporující imunitní systém [6] [30].

2.2.3.1 *Karotenoidy*

Jedná se o lipofilní žluté, oranžové a červené pigmenty. Karotenoidy jsou rostlinná barviva, která spadají do skupiny terpenů. Tyto sloučeniny jsou v lidském těle hlavním zdrojem vitamínu A, posilují imunitní systém, mají antioxidační účinky a urychlují hojení ran. Lidské tělo není schopno tyto sloučeniny syntetizovat, proto musí být doplněny v potravě [6] [30] [31].

Nalezneme je v ovoci, zelenině, rybách, vejcích, řasách a v oleji. V zelených pletivech rostlin je nalezneme vedle chlorofylu. V buňce je nalezneme v membráně. V rostlinách slouží k ochraně před slunečními paprsky, dále díky jejich barvám lákají hmyz na květy. Přidávají se do potravinových doplňků, do potravin a do kosmetiky. Jednotlivá barviva lze dělit chromatograficky [6] [31].

Sloučeniny terpenů obsahují aktivované formy izoprenů, které slouží jako jejich stavební jednotky. Izopren je nenasycený uhlovodík s 5 uhlíky a jedním methylovým rozvětvením. Jejich barevnost způsobují konjugované dvojně vazby, které se vyskytují v několika základních skupinách a v jejich kombinacích. Karotenoidy jako doplňkové pigmenty absorbují záření v oblasti 480 až 570 nm. Nejvíce karotenoidů najdeme v rostlinách ve formě β -karotenu (provitamínu A) [6].

Karotenoidy se dělí na dvě hlavní skupiny: uhlovodíky, které se nazývají karoteny. A na kyslíkaté sloučeniny odvozené od karotenů, které se nazývají xantofyly. Xantofyly vznikají oxidací karotenů. Xantofyly jsou polárnější sloučeniny než karoteny. Příkladem karotenů je β -karotenu, torulen, lykopen, neurosporen. Mezi xantofyly patří lutein, astaxantin, neoxantin, violaxantin, torularhodin [6] [30].

Lykopen je silný přírodní antioxidant ze skupiny karotenoidů. Patří do skupiny karotenů, jeho strukturu tvoří alifatické nenasycené uhlovodíkové řetězce. Tento karoten tvoří základ pro další karoteny, například pro α -karoten, β -karoten nebo torulen. β -karoten je prekurzor vitamínu A, který je rozpustný v tucích a patří do skupiny karotenoidů. Jeho hlavním zdrojem je ovoce a zelenina. β -karoten se stanovuje metodou HPLC nebo extrakční metodou se spektrofotometrickým měřením [6].

2.2.3.2 *Mastné a vyšší mastné kyseliny*

Mastné kyseliny jsou významnou složkou lipidů. Řadí se mezi karboxylové kyseliny, počet uhlíků v řetězci je 4 až 26 uhlíků. Jednotlivé složky mají své specifické účinky [6].

SFA neboli nasycené mastné kyseliny jsou kyseliny, které neobsahují žádnou dvojnou vazbu a při pokojové teplotě mají tuhou konzistenci. Jedná se zpravidla o lineární nerozvětvené řetězce a často mají sudý počet uhlíků. Do této skupiny patří např. kyselina palmitová, stearová nebo myristová kyselina. MUFA neboli mononenasyčené mastné kyseliny obsahují 1 dvojnou vazbu. Do této skupiny patří např. kyselina olejová a kyselina palmitolejová. PUFA neboli polynenasycené mastné kyseliny obsahují více dvojných vazeb. Nejvýznamnější z nich je kyselina linolová [6].

2.3 Stanovení polysacharidů, exopolysacharidů

Sacharidy se dělí na monosacharidy, obsahují jen 1 monosacharidovou jednotku. Disacharidy obsahují 2 monosacharidové jednotky. Oligosacharidy obsahují méně než 10 monosacharidových jednotek. Polysacharidy obsahují více než 10 monosacharidových jednotek spojených glykosidickou vazbou. Polysacharidy jsou přírodní látky. Mezi zástupce polysacharidů patří škrob, glykogen, celulóza, chitin a β -glukan [6].

2.3.1 Enzymatické stanovení kitem

Metoda je založená na hydrolýze buněčné stěny a na enzymatickém rozkladu polysacharidů na jednotlivé D-glukózy. Množství β -glukanů se určí z rozdílu celkového obsahu glukanů a obsahu α -glukanů. Jedná se o stanovení β -glukanů z kvasinek pomocí komerčně dodávané sady od firmy Megazyme [32].

Nejdříve se stanovují celkové glukany. 1,3- β -D-glukany, 1,6- β -D-glukany a α -glukany jsou rozpuštěny v ledové H_2SO_4 . Zbývající glukany se kvantitativně hydrolyzují na glukózu díky vysoce purifikované směsi *exo*-1,3- β -glukanázy a β -glukosidázy. Stanovení α -glukanů a sacharózy se provádí specifickou hydrolýzou na D-glukózu a D-fruktózu. Obsah glukózy se měří pomocí amyloglukosidázy a invertázy díky činidlu GOPOD [32].

2.3.2 Stanovení neutrálních cukrů podle Dubois

Toto stanovení je založeno na dehydrataci cukrů pomocí koncentrované kyseliny sírové. Barevné kondenzační produkty vznikají kondenzací furfuralu případně 5-hydroxymethylfurfuralu s fenolem. Barevné kondenzační produkty lze stanovit spektrofotometricky [33].

2.4 Spektrofotometrické a chromatografické metody

Jedná se o instrumentální analytické metody, které slouží ke kvantitativnímu a kvalitativnímu stanovení vzorku [34].

2.4.1 Spektrofotometrie

Spektrofotometrie je metoda založená na detekci absorpce ultrafialového a viditelného záření paprsku procházejícího roztokem. Při absorpci záření roztokem dochází k excitaci valenčních elektronů. Procházející paprsek má vlnovou délku podle nastavení štěrbin, která slouží k výběru paprsku o určité vlnové délce. Pro výpočet koncentrace nám slouží Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (1)$$

kde A je absorbance, ε je molární absorpční koeficient a l je tloušťka květy a c je molární koncentrace [34].

Metoda slouží ke zjištění koncentrace vzorku na základě absorpce záření o různých vlnových délkách. Jako zdroj záření slouží žárovka nebo výbojka (xenonová), zdroj záření je rozdílný podle rozsahu vlnových délek, při kterých chceme měřit. Monochromátor je část spektrofotometru, která upravuje polychromatické záření na monochromatické záření o námi požadované vlnové délce. Následně paprsek prochází kyvetou se vzorkem a po průchodu kyvetou dopadá neabsorbovaný paprsek na detektor. Díky tomu zjistíme, jaká je hodnota absorbovaného záření [34].

Pro stanovení byl použit jednopaprskový spektrofotometr na vyhodnocení vzorků v kyvetách. Na vyhodnocení antimikrobiální aktivity a MTT testů, které byly na destičkách byla použita ELISA [34].

2.4.2 Stanovení karotenoidů HPLC

HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Jedná se o separační techniku, která je založena na rozdílné distribuci dělených složek vzorku mezi dvě nemísitelné fáze v separační koloně. Jedná se o mobilní fázi a stacionární fázi [34].

Pro distribuci musí existovat fázové rozhraní mezi stacionární a mobilní fází. Mobilní fáze unáší složky vzorku po stacionární fázi. Složky vzorku jsou rozdílně zadržovány a zpomalovány stacionární fází. Při dělení složek dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi mobilní a stacionární fází [34].

Tuto metodu lze využít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Výstupem tohoto měření bude chromatogram. Jedná se o graf, na kterém vidíme jednotlivé píky. Tyto píky označují jednotlivé složky roztoku. Kvalitu vzorku zjistíme pomocí šířky píku, pokud píky budou hezky úzké ukazuje to na čistotu vzorku. Když budou píky širší ukazuje to, že jednotlivé složky nebyly zcela oddělené. Kvantitu vzorku zjistíme pomocí výpočtu plochy pod píkem [34].

2.4.3 Stanovení lipidů GC

GC neboli plynová chromatografie, jedná se o separační metodu, sloužící k identifikaci jednotlivých složek vzorku. Principem plynové chromatografie je rovnovážná distribuce mezi dvě fáze mobilní (plynná fáze) a stacionární (kapalná nebo tuhá fáze). Mobilní pohyblivá fáze se nazývá nosný plyn. Stacionární nepohyblivá fáze je umístěna v chromatografické koloně. Existují dva typy kolon pro GC. Náplňové kolony nebo kapilární kolony. Náplňové kolony mají stacionární fázi v podobě pevné látky (aktivní uhlí, silikagel) nebo vysoko vroucí kapaliny (kapalina je nanášena v tenké vrstvě přímo na pevném, inertním nosiči). Kapilární kolony mají stacionární fázi nanášenou v tenké vrstvě přímo na upravenou vnitřní stěnu křemenné kapiláry [34].

V plynné fázi dochází k separaci složek na základě rozdílné afinity složek ke stacionární fázi. Způsob vypařování daných složek musí být definovaný, z tohoto důvodu je metoda vhodná spíše pro organické látky, které mají teplotu varu do 400 °C [34].

Princip separace látek: kolonou se stacionární fázi prochází neustále nosný plyn. Vzorek se nastříkne do vyhřívané nástřikové kolony (injektoru), kde se odpaří a dále do kolony postupuje ve formě par unášen nosným plynem. Nosný plyn unáší složky vzorku postupně až ke konci kolony, každá složka postupuje kolonou svou vlastní rychlostí na základě distribuční konstanty

$$K_D = c_s/c_m, \quad (2)$$

kde c_s je koncentrace stacionární fáze a c_m je koncentrace mobilní fáze. Látky vstupují do detektoru v pořadí rostoucích hodnot distribučních konstant. Detektor detekuje koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Výsledný graf závislosti signálu detekce na čase se nazývá chromatogram. Na chromatogramu se vykreslují píky, kdy poloha píku určuje druh látky a plocha pod píkem je úměrná množství látky ve vzorku [34].

2.5 Testy in vitro

Testy in vitro se provádějí mimo živý organismus. Živým organismem, na kterém se testy provádí, může být izolovaná lidská či zvířecí buněčná kultura. Testy se využívají při testování látek s potenciálně léčivými účinky, při testování kosmetiky, léčiv nebo též při testování potravinových doplňků. Díky těmto testům se dá zjistit účinek přímo na určitou tkáň bez toho, aby se museli použít testy in vivo na zvířatech. Tyto testy na zvířatech jsou časově i finančně náročnější, navíc často zde bývá problém s etickou stránkou testů na zvířatech [35].

Testy in vitro mají i jiné výhody, díky testům přímo na lidských buněčných liniích odpadá problém s odlišností účinků u různých živočišných druhů, se kterými musíme počítat v případě testování na zvířatech. Při testování toxicity in vitro se výsledky porovnávají s testovacími modely. Výsledky při testech in vitro se mohou lišit od účinků v lidském organismu, protože při testech testujeme pouze jednu buněčnou linii, ovšem v těle je mikrobiální prostředí, ve kterém spolu interagují různé druhy buněk. Při testování může dojít k vyhodnocení falešných výsledků, se kterými je nutno počítat, a proto se testování opakuje [35] [36].

2.5.1 Testy viability a cytotoxicity

Tyto testy jsou důležité při testování kosmetických přípravků, léčiv a potravinových doplňků. Viabilita jedná se o životaschopnost buněčné linie v testovaném prostředí. Cytotoxicita je schopnost sloučeniny usmrtit buňku, pomocí změn v buněčných procesech a změny v chování buňky. Při testu in vitro vystavíme buňku sledované sloučenině a sledujeme její reakci. Neboli sledujeme viabilitu buněk. Při posuzování viability buněk sledujeme několik důležitých parametrů, jako jsou:

- proliferace buněk – rychlé a opakované množení
- integrita buněčné membrány – neporušení buněčné membrány
- sledování aktivity mitochondrií a další.

Výhodou těchto metod je, že jsou ve většině případů poměrně jednoduché a zároveň umožňují otestování velkého množství vzorků za krátkou dobu. Po dokončení těchto testů se přistupuje k dalšímu farmakologickému testování a též k testování in vivo, tyto další testy jsou důležité při vývoji nových přípravků, léčiv a doplňků [35] [36].

2.5.1.1 MTT test

Jedná se o metodu založenou na kolorimetrickém stanovení. Metoda je založena na měření absorbance použitých barviv pomocí spektrofotometru. Cytotoxicita byla stanovena pomocí 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromidu (MTT). Tato metoda je založená na redukci žlutého MTT na fialový formazan. Tato redukce probíhá pomocí mitochondriálních enzymů dýchacího řetězce buněk, formazan zůstává uvnitř buňky ve formě nerozpustných granulí. Po přidání SDS detergentu dochází k uvolnění a rozpuštění barviva z buněk. Díky tomu získáváme čirý fialový roztok, který se měří spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm [37].

Jedná se o test, který se používá k vyhodnocení viability, proliferace a cytotoxicity buňky. Pokud máme jamky fialové, detekuje to přítomnost živých buněk. Čím světlejší je fialové zbarvení roztoku, tím víc obsahuje roztok mrtvých buněk. V případě žlutých jamek nám MTT test detekuje, že dané buňky jsou mrtvé [37] [38].

2.5.2 Buněčné kultury pro testování in vitro

Buněčné kultury jsou pro testování velice výhodné, jelikož při jejich testování jde o kontrolované prostředí, kdy výsledek není ovlivněn interakcí s jinými tkáněmi nebo jinými buněčnými populacemi. Navíc máme zde přesně definovaný druh buňky a jeho reakci. Výhodou též je, že práce s buněčnými kulturami je poměrně jednoduchá a během krátké doby lze získat velké množství homogenního materiálu. Oproti práci se živými pokusnými zvířaty, zde nenastává etický problém v případě zničení buněčné kultury [35].

Práce s buněčnými kulturami v buněčných laboratořích má svá pravidla, kterými se musí každý, kdo s nimi pracuje řídit. V buněčných laboratořích jsou buňky kultivovány za přesně definovaných podmínek jako jsou pH, vlhkost, teplota a živné médium specifické pro daný buněčný druh. Vhodný typ buněčné kultury volíme vždy s ohledem na následné použití látky [35].

Buněčné kultury jsou získávány izolací z lidského těla. Vzorek tkáně se musí nejdříve mechanicky rozmělnit a následně se vzorek enzymaticky natráví a dále se postupuje tak, aby se od sebe rozdělily jednotlivé druhy buněčných kultur, čehož lze docílit po důkladném rozbití všech vazeb centrifugací, jelikož každý buněčný druh má jinou hmotnost a pomocí centrifugace se nám frakce rozdělí. Takto oddělené kultury přeneseme do nové kultivační nádoby. Tyto kultury můžeme dále pěstovat a pasážovat, čímž získáme dostatek potřebného homogenního materiálu. Existují i specifické typy buněk tzv. buněčné linie nebo také kontinuální kultury. Tyto kultury se získávají izolací z nádorové tkáně lépe se množí a nepodléhají stárnutí [35].

2.5.2.1 B16F1 linie

Jedná se o buněčnou linii myších melanocytů. Jedná se o kožní nádorové buňky, které produkují melanin. Melanin je látka zodpovědná za barvu kůže a také chrání před účinky slunečním UV záření [39].

2.5.2.2 HaCaT

Lidská buněčná linie keratinocytů, která byla imortalizovaná. U této linie je výhodou snadnější kultivace a pomalejší stárnutí buněk oproti normálním keratinocytům. HaCaT buněčná linie se využívá při testování kožní senzitivity a cytotoxicity [35].

3 CÍL PRÁCE

V rámci této práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) Zpracování rešerše na dané téma
- 2) Optimalizace metod pro izolaci a stanovení glukánů
- 3) Testování glukánů a vyhodnocení výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

4.1.1 Chemikálie pro kultivaci

Agar, Roth (SRN)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach:ner (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach:ner (ČR)
Dusičnan draselný p.a., Lach:ner (ČR)
Kvasničný autolyzát, Roth (SRN)
Pepton, Roth (SRN)
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach:ner (ČR)

4.1.2 Chemikálie pro enzymatické stanovení kitem

Sada kitu, K-YBGL (IRL)
Kyselina sírová (96%), Lach:ner (ČR)
Hydroxid sodný p.a., Lach:ner (ČR)
Kyselina octová, p.a., Lachema (ČR)

4.1.3 Chemikálie pro stanovení antioxidační aktivity

Trolox-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-dikarboxylová kyselina, Sigma Aldrich (SRN)
ABTS, 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonoová kyselina, Sigma Aldrich (SRN)
Ethanol pro UV/VIS, Lach:ner (ČR)
Peroxodisíran draselný, Sigma Aldrich (SRN)

4.1.4 Chemikálie pro stanovení antimikrobiální aktivity

Kvasničný autolyzát, Roth (SRN)
Pepton, Roth (SRN)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach:ner (ČR)
Nutrient Broth (NB médium), Himedia (IND)
Agar Power, Bacteriological, Himedia (India)
LB broth, Miller, Sigma (SRN)
Ampicilin, Sigma Aldrich (UK)

4.1.5 Chemikálie pro stanovení karotenoidů (HPLC)

Methanol HPLC kvality, Lach:ner (ČR)
Methanol, p.a., Lach:ner (ČR)
Chloroform, p.a., Penta (ČR)
Acetonitril HPLC kvality, Lach:ner (ČR)
Ethylacetát HPLC kvality, Lach:ner (ČR)
trisHCl, p.a., Lach:ner (ČR)

4.1.6 Chemikálie pro stanovení mastných kyselin (GC)

Kyselina heptadekanová GC kvality, Sigma Aldrich (SRN)

Kyselina sírová (96%), Lach:ner (ČR)

Methanol, p.a., Lachema (ČR)

Hydroxid sodný, p.a., Lach:ner (ČR)

Hexan, p.a., Lach:ner (ČR)

Vodík 5.5 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

Dusík 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

Vzduch 5.0 SIAD v tlakové bombě s redukčním ventilem

4.1.7 Chemikálie pro MTT test

Trypanová modř, Biotech (SRN)

DMEM médium, Sigma Aldrich (SRN)

Dihydrogenfosforečnan draselný dihydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

Chlorid sodný, p.a., Lach:ner (ČR)

MTT, Duchefa Biochemie (NL)

SDS dodecylsírán sodný, Serva (SRN)

Ethanol pro UV/VIS, Lach:ner (ČR)

Trypsin, Versene EDTA, P-Lab (ČR)

FBS fetální bovinné sérum, HyClove (USA)

Antibiotic 100X (Biosera), BioTech (SRN)

4.1.8 Chemikálie pro izolaci glukánů (I. postup)

Hydroxid sodný, p.a., Lach:ner (ČR)

Chlorid sodný, p.a., Lach:ner (ČR)

Kyselina octová, p.a., Lachema (ČR)

Trypsin from Porcine Pancreas, Sigma Aldrich (SRN)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

4.1.9 Chemikálie pro izolaci glukánů (II. postup)

Hydroxid sodný, p.a., Lach:ner (ČR)

Chlorid sodný, p.a., Lachema (ČR)

Trypsin from Porcine Pancreas, Sigma Aldrich (SRN)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

4.1.10 Chemikálie pro barvení podle Grama

Krystalová violet, Sigma Aldrich (SRN)

Lugolův roztok (vodný roztok I₂ a KI)

Karbofuchsin

Ethanol, Lach:ner (ČR)

4.1.11 Chemikálie pro stanovení neutrálních sacharidů dle Duboise

Kyselina sírová (96%), Lach:ner (ČR)

D-glukóza monohydrát p.a., Lach:ner (ČR)

Fenol, Lach:ner (ČR)

4.1.12 Chemikálie pro stanovení proteinů dle Biureta

Chlorid sodný, p.a., Lachema (ČR)

Vinan draselno-sodný tetrahydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

Hydroxid sodný, p.a., Lach:ner (ČR)

Síran měďnatý pentahydrát, p.a., Lach:ner (ČR)

Hovězí Albumin, Serva (SRN)

4.2 Přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco

Předvážky Scout Pro, OHAUS

Automatické pipety, Biohit (DE) a Discovery

Vortex, OHAUS

Spektrofotometr UV/VIS, Boeco

ELISA Synergy HTX, BioTech

Stolní centrifuga, Hermile

Skříňová třpačka ZWYR-D2401, Labwirt

Autokláv Systec

Sterilační life box, Esco Technologies, Inc.

Lyofilizátor FreeZone 4.5 l Freeze Dry Systém, Labconco

HPLC, Thermo Fischer Scientific s kolonou kinetex

Termoblok SBH200D Stuart

pH metr pH 50 VioLab

Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z 36 HK, HERMILE Labortechnik

Mikroskop L II ooA, Itraco Micro

Homogenizátor BeadBug, Benchmark Scientific

Vakuová odparka HB4 basic, HBA Labortechnik

Fermentor RALF 7 l, Bioingeniring

Magnetická míchačka Stir HP 10M

Sestava HPLC/PDA

Sestava GC/FID

4.3 Mikroorganismy

Pro kultivaci byly vybrány následující kvasinky:

Rhodotorula kratochvilovae CCY 20-2-26

Cystofilobasidium infirmominatum CCY 17-18-4

Metschnikowia pulcherrima CCY 29-2-149

Kultury pro Antimikrobiální testy:

Candida glabrata CCM 8270

Micrococcus luteus CCM 1569

Serratia marcescens CCM 8587

Escherichia coli CCM 3954

4.4 Kultivace kvasinek

Kvasinky použité při kultivaci byly očkované z kryozkumavek, které byly uchovány v glycerolu při teplotě -80 °C.

Samotná kultivace má 4 fáze:

1. Fáze: příslušný kmen byl v naočkován na YDP agar, na kterém byl kultivován po dobu 72 h při laboratorní teplotě. Za tuto dobu kmen narostl.
2. Fáze: Inokulum I příslušný kmen byl přeočkován do Erlenmeyerové baňky s tekutou živnou půdou YPD, kde byl kultivován po dobu 24 h na třepačce při laboratorní teplotě.
3. Fáze: kvasinky byly přeneseny do produkčního média v poměru 1:5 pro optimalizaci produkce β -glukanu, byly kultivovány po dobu 48 h ve fermentoru. Tato kultivace byla rovněž prováděna v Erlenmeyerově baňce, kde kultivace probíhala na 96 h.
Nejvyšší výtěžek biomasy byl 10 g/l za optimálních podmínek.

4.4.1 YPD agar

YPD agar se používá k zaočkování kvasinek z kryozkumavek, aby zde podobu 72 h rostly. Po uběhnutí této doby jsou kvasinky zaočkovány do tekutého YPD inokula. Před použitím byl YPD agar vysterilizován v autoklávu a za horka naléván ve sterilním prostředí do Petriho misek. Složení směsi je uvedeno v následující tabulce:

Tabulka 1: Složení pevného YPD agaru

Složka	Množství [g/l vody]
Kvasničný extrakt	10
Pepton	20
D-glukóza	20
Agar	20

4.4.2 YPD inokulum

Kultivace v YPD inokulu probíhala po dobu 24 h při laboratorní teplotě. YPD inokulum bylo intenzivně mícháno na třepačce (120 rpm). YPD inokulum bylo před použitím vysterilizován v autoklávu. Složení směsi je uvedeno v následující tabulce:

Tabulka 2: Složení YPD inokula

Složka	Množství [g/l vody]
Kvasničný extrakt	10
Pepton	20
D-glukóza	20

4.4.3 Produkční médium

Produkční médium se míchá s YPD inokulem v poměru 5:1. Kultivace probíhala po dobu 96 h za intenzivního míchání na třepačce při laboratorní teplotě. Složení směsi je uvedeno v následující tabulce:

Tabulka 3: Složení produkčního média

Složka	Množství [g/l vody]
D-glukóza	69,29
KNO ₃	1,52
KH ₂ PO ₄	4
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,7

4.5 Charakterizace vzorků biomasy

4.5.1 Enzymatické stanovení kitem

Enzymatické stanovení bylo provedeno dle návodu od výrobce kitu [32]. Metoda slouží pro izolaci a stanovení β -D-glukanů z kvasinek. Metoda je založena na enzymatickém rozkladu polysacharidů na jednotlivé D-glukózy.

4.5.1.1 Roztoky obsažené v balení pro stanovení β -glukanů kitem

Láhev 1: 2 ml suspenze síranu amonného obsahující exo-1,3- β -glukanázu (100 U/ml) + β -glukosidázu (20 U/ml). Roztok vydrží stabilní 4 roky při teplotě 4 °C.

Láhev 2: 20 ml 50 % roztoku glycerolu obsahujícího amyloglukosidázu (1630 U/ml) + roztok invertázy (500 U/ml). Roztok vydrží stabilní asi 2 roky při teplotě 4 °C nebo 4 roky při teplotě -10 °C.

Láhev 3: 50 ml reakční pufr GOPOD o pH= 7,4. Tento pufr obsahuje p-hydroxybenzoovou kyselinu a azid sodný (0,09 %). Pufr vydrží stabilní 4 roky při teplotě 4 °C.

Láhev 4: Enzymy činidel GOPOD ve formě lyofilizovaného prášku. Enzymy obsahují glukózooxidázu (GOD)+ peroxidázu (POD) + 4-aminoantipyrin. Enzymy jsou stabilní 5 let při teplotě pod -10 °C.

Láhev 5: Roztok kyseliny benzoové (0,2 %) se standardním roztokem D-glukózy (5 ml, 1 mg/ml). Roztok je stabilní 5 let, skladuje se při pokojové teplotě.

Láhev 6: Kontrolní vzorek β -glukanů (2 g). Stabilní 5 let při pokojové teplotě.

4.5.1.2 Pomocné roztoky

1. **Acetátový pufr (200 mM, pH= 4,5):** 11,6 ml ledové kyseliny octové (1,05 g/ml) se přidá do 900 ml destilované vody. Pomocí 4 M (16 g/100 ml) roztoku hydroxidu sodného je pH upraveno na 4,5. A objem je následně doplněn na 1 l. Roztok vydrží stabilní 1 rok při teplotě 4 °C.
2. **Acetátový pufr (1,2 M, pH= 3,8):** 68,6 ml ledové kyseliny octové (1,05 g/ml) do 800 ml destilované vody. Pomocí 4 M hydroxidu sodného je pH upraveno na 3,8. Následně se objem doplněn destilovanou vodou na 1 l. Roztok vydrží stabilní 2 roky při pokojové teplotě.
3. **Hydroxid sodný (8,0 M):** 320 g NaOH se přidá do 700 ml destilované vody. Příprava se provádí v digestoři za stálého míchání. Následně se nechá roztok vychladit na pokojovou teplotu a poté se doplňuje objem na 1 l. Roztok vydrží stabilní 2 roky při pokojové teplotě.
4. **Hydroxid sodný (1,7 M):** 68 g NaOH se přidá do 800 ml destilované vody a mícháním se rozpustí. Následně se objem upraví na 1 l. Roztok vydrží stabilní po dobu 2 let při pokojové teplotě.
5. **Kyselina sírová (12 M):** 640 ml koncentrované kyseliny sírové se přidá do 300 ml destilované vody. Přídavek kyseliny se provádí v digestoři, následně je objem doplněn na 1 l. Roztok vydrží stabilní 4 roky.

4.5.1.3 Příprava reakčních roztoků

1. Do lahve 1 se přidá 9 ml 200 mM acetátového pufru (pH= 4,5). Roztok je následně rozdělen na vhodné alikvoty a skladuje se v polypropylenových zkumavkách při teplotě -10 °C mezi použitím a v ledu při používání. Po naředění je činidlo stabilní 2 roky při teplotě pod -10 °C.
2. Obsah lahve 2 se použije ve formě dodání. Roztok vydrží stabilní 2 roky při 4 °C a 4 roky při -10 °C.
3. Obsah lahve 3 se naředí 1 l destilované vody. Toto je roztok 1.
4. Obsah lahve 4 se rozpustí v 20 ml roztoku 1 a kvantitativně se převede do lahve obsahující zbytek roztoku 1. Lahev se zakryje hliníkovou fólií, aby se reagent GODPOD chránil před světlem. Vydrží stabilní 3 měsíce při teplotě 2-5 °C nebo 12 měsíců při teplotě -10 °C. Při skladování ve zmrzlé podobě se reagent rozdělí do vhodných alikvot. Rozmrazuje se vždy jen 1 alikvota. Když je činidlo čerstvé má světle žlutou nebo světle růžovou barvu. Během 2-3 měsíců při 4 °C bude mít tmavší růžovou barvu. Absorbance roztoku by měla být menší než 0,05 při odečtu proti destilované vodě.
5. Obsah lahve 5 se použije ve formě dodání. Roztok vydrží stabilní 5 let při pokojové teplotě.
6. Obsah lahve 6 se použije ve formě dodání. Roztok vydrží stabilní 5 let při pokojové teplotě.

4.5.1.4 Stanovení celkových glukánů

1. Do reakčních zkumavek se závitěm se odvážílo 90 mg vzorku přidali 2 ml ledově studené kyseliny sírové (12 M). Vzorek byl promíchán a vložen do ledové lázně na 2 hodiny. Během této doby byl vzorek několikrát intenzivně promíchán (aby se zajistilo úplné rozpuštění β -glukanu).
2. Do každé zkumavky byli přidány 4 ml vody, vzorky byly intenzivně promíchány na vortexu po dobu 10 s. Následně se přidalo 6 ml vody a znovu se vzorek promíchal na vortexu po dobu 10 s.
3. Zkumavky se umístily na 2 hodiny do termobloku (100 °C). Po 5 minutách se zkumavky uzavřely zátkami.
4. Zkumavky byly ochlazeny na pokojovou teplotu a opatrně se uvolnily zátky.
5. Obsah každé zkumavky se kvantitativně převedl do 100 ml odměrných baněk za pomoci promývací lahve, která obsahovala 200 mM acetátového pufru (pH= 4,5).
6. Do odměrných baněk se přidalo 6 ml 8,0 M roztoku NaOH a objem byl upraven pomocí 200 mM acetátového pufru (pH= 4,5). Obsah baňky byl dobře promíchán a odebrala se alikvotní část vzorku do centrifugační zkumavky.
7. Tato alikvotní část vzorku se centrifugovala při 13 000 rpm po dobu 5 minut.
8. Z každé alikvotní části bylo převedeno 0,1 ml odstředěného extraktu na dno dvou skleněných zkumavek.
9. Na dno zkumavek bylo přidáno 0,1 ml směsi exo-1,3- β -glukanázy + β -glukosidázy ve 200 mM acetátovém pufru. Obsah zkumavek se promíchal a inkuboval při teplotě 40 °C po dobu 60 minut.
10. Do zkumavek byli přidány 3 ml činidla GOPOD a zkumavky se inkubovaly při teplotě 40 °C po dobu 20 minut.
11. Byl připravený slepý vzorek z 0,2 ml acetátového pufru (200 mM, pH= 4,5) + 3 ml činidla GOPOD. Standardní vzorek D-glukózy byl připravený z 0,1 ml standardu D-glukózy + 0,1 ml acetátového pufru (200 mM, pH= 4,5) + 3 ml činidla GOPOD. Standard i slepý vzorek byli provedeny celým inkubačním procesem s činidly GOPOD.
12. Následně byla změřena absorbance při 510 nm proti slepému vzorku.

4.5.1.5 Stanovení α -glukanů

1. Navážilo se 100 mg vzorku do kultivační zkumavky a přidali se 2 ml 1,7 M NaOH. Zkumavky se dají na 20 minut do ledu a průběžně se míchají na vortexu.
2. Za míchání se do každé zkumavky přidalo 8 ml 1,2 M acetátového pufru (pH= 3,8). Okamžitě se přidalo 0,2 ml amyloglukosidázy + invertázy z lahve 2. Zkumavky se promíchají a vloží vodní lázně na 30 minut při 40 °C za občasného míchání.
3. Pro vzorky obsahující > 10 % obsahu α -glukanu. Obsah zkumavky se kvantitativně převede do 100 ml odměrné baňky (pomocí lahve s pomocným roztokem) a objem se doplní destilovanou vodou. Zkumavka se promíchá a alikvotní část roztoku ze zkumavek se centrifuguje při 13 000 rpm po dobu 10 minut.

4. Pro vzorek obsahující <10 % obsahu α -glukanu. 2 ml roztoku byli převedeny do centrifugační zkumavky a centrifugovány při 13 000 rpm po dobu 5 minut.
5. Byl 0,1 ml zředěného nebo nezředěného roztoku bylo převedeno do skleněné zkumavky a přidalo se 0,1 ml acetátového pufru (200 mM, pH= 4,5), 3 ml činidla GOPOD a inkubovalo se 20 minut při 40 °C.
6. Následně byla změřena absorbance při 510 nm proti slepému vzorku.

4.5.2 Stanovení antioxidační aktivity

Ke stanovení antioxidační aktivity byla použita metoda TEAC, která hodnotí schopnosti vzorku zhaset kation-radikál ABTS^{•+}. Zhášení se sleduje spektrofotometricky díky změně absorpčního spektra při vlnové délce 734 nm. Výsledná antioxidační aktivita vzorku se porovná s antioxidační aktivitou syntetické standardní látky (derivátem vitamínu A s názvem Trolox) [33].

Kation-radikál ABTS^{•+} se získá rozpuštěním ABTS ve vodě na koncentraci 7 mM a následnou reakcí s 2,45 mM peroxidisíranem draselným. Takto připravený roztok se nechal stát ve tmě 12 hodin při pokojové teplotě.

Zásobní roztok ABTS^{•+} se zředil ethanolem pro UV/VIS na absorbanci 0,70 +/- 0,02 při 734 nm, měření se provádělo proti ethanolu pro UV/VIS. Do kyvety byl napipetován 1 ml zředěného roztoku ABTS^{•+} a 10 μ l destilované vody, ihned byla změřena absorbance v čase 0. Do další kyvety byl napipetován 1 ml ABTS^{•+} a 10 μ l extraktu vzorku biomasy. Zapnou se stopky a kyvetu uchováme ve tmě. Po uplynutí 10 minut se měří pokles absorbance.

Pro výpočet se použije rozdíl absorbancí ($A=A_0 - A_{10}$) a kalibrační křivka pro Trolox v rozmezí koncentrací 50–400 μ g/ml.

4.5.3 Antimikrobiální test

Pro stanovení antimikrobiální účinku byly použity následující kultury *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens* a kvasinka *Candida glabrata*. *Micrococcus luteus* je bakteriální kmen grampozitivní bakterie. *Serratia marcescens* je bakteriální kmen gramnegativní bakterie.

Očkování bylo prováděno z kryozkumavek do tekutého média a následná kultivace byla prováděna ve sterilním boxu. Média byla před každou kultivací vysterilizována. Do Erlenmayerovy baňky bylo nalito NB médium pro kultivaci bakterií nebo YPD médium pro kultivaci kvasinky. NB je komerčně dostupné médium, které se naředí podle návodu (25 mg/l). Kultivace mikroorganismů probíhala 24 hodin při 37 °C.

Po uběhnutí této doby bylo na antimikrobiální destičku pipetováno 150 μ l nakultivovaného média a k tomu 50 μ l vzorku. Takto připravený vzorek byl dále naředěn do celého řádku, v poslední jamce byl napipetovaný blank. Blank byl složen z 150 μ l nakultivovaného média a 50 μ l destilované vody. Blank byl nutný pro sledování růstu kvasinky. Antimikrobiální aktivita byla stanovena po 24hodinové kultivaci spektrofotometricky pomocí ELISA readeru při 630 nm.

4.5.4 Antimikrobiální stanovení – Agarová difúzní metoda

Vybrané mikrobiální kultury byly zaočkovány do vhodných tekutých médií na 24 h. Kvasinka *Escherichia coli* byla zaočkována do média LB. Grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus* byla zaočkována do média NB. Po uplynutí 24 h bylo na Petriho misku s příslušným agarem napipetováno 100 µl mikrobiální kultury na agarovou misku. Napipetovaná mikrobiální kultura se rozetřela sterilní hokejkou po celé ploše agarové misky. Takto připravená miska se nechala 20 minut stát, po uplynutí této doby byl vytvořen potřebný počet jamek do každé agarové misky. Do těchto jamek se pipetovalo 50 µl vzorku. Jako kontrolní vzorek bylo použito antibiotiku ampicilin. Po uplynutí 24 h byla odečtena průměrná inhibiční zóna okolo jamek.

4.5.5 Stanovení karotenoidů (HPLC)

4.5.5.1 Extrakce karotenoidů

Extrakce probíhala dle Folche a byly při ní zároveň extrahovány karotenoidy, ergosterol a ubichinon. Pro extrakci bylo na analytických vahách naváženo 20 mg biomasy do šroubovacích plastových vialek o objemu 2 ml. Ve vialkách byla biomasa hydratována 1 ml destilované vody po dobu 30 minut. Následně byla biomasa zcentrifugovaná a supernatant byl vylit. K takto připravené biomase bylo přidáno cca 0,5 ml skleněných kuliček a 1 ml methanolu. Vialky byly umístěny do multipozičního vortexu a po dobu 20 minut byly intenzivně protřepávány. Celý obsah vialky byl přelit do 15 ml zkumavky se závitkem, do zkumavky byly přidány 2 ml chloroformu. Vzniklá směs byla opět 20 minut třepána na vortexu. Následně se přidal 1 ml destilované vody a vzorek se zcentrifugoval (1500 ot/min, 1 minutu). Směs se rozdělila na dvě části a pomocí pipety byla odebrána spodní chloroformová fáze do 15 ml zkumavky. Chloroform byl odpařen pod dusíkovou inertní atmosférou v termobloku, který byl vyhřátý na 35 °C. Zbýlý odparek byl rozpuštěn ve 2 ml směsi HPLC rozpouštědel o složení 2:1 acetonitrilu na ethylacetát. Směs byla důkladně protřepána na vortexu a přefiltrována přes PTFE filtr do skleněné vialky pro HPLC/GC. Připravený vzorek mohl být ihned analyzován nebo mohl být uskladněn v mrazničce.

4.5.5.2 Analýza karotenoidů metodou HPLC

Připravené vzorky s obsahem karotenoidů, ergosterolu a ubichinonu byly analyzovány na HPLC. Pro analýzu byl použit HPLC značky Thermo Fischer Scientific, na koloně kinetex EVO C18 o rozměrech 150x4,6x2,6 mm. Eluce probíhala v gradientovém módu o průtoku mobilní fáze 1,2 ml/min s dobou analýzy 25 minut. Vzorek byl detekován na PDA detektoru při vlnových délkách 480 nm pro karotenoidy a 280 nm pro ergosterol a ubichinon. Na základě naměřených standardů a jejich kalibračních křivek byla provedena identifikace a kvantitativní stanovení vzorku. Vyhodnocení bylo provedeno v programu Chromeleon.

Tabulka 4: Složení mobilní fáze

Mobilní fáze	Složka	Obj. %
A	Methanol	2
	Acetonitril	84
	100 mM trisHCl pufr o pH=8	14
B	Methanol	60
	Ethylacetát	40

Tabulka 5: Gradientová eluce analýzy karotenoidů

Čas analýzy [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]
0	100	0
13	0	100
19	0	100
20	100	0
23	100	0

4.5.6 Stanovení mastných kyselin (GC)

4.5.6.1 Transesterifikace a extrakce mastných kyselin pro GC analýzu

Stanovení lipidů je založeno na transesterifikaci a extrakci mastných kyselin vzorku. Na analytických vahách bylo naváženo 20 mg biomasy do krimplovacích vialek. Následně bylo přidáno 1,8 ml transesterifikační směsi s obsahem rozpuštěného interního standardu C17 o koncentraci 0,5 mg/ml v 15 % kyselině sírové v HPLC methanolu. Připravené krimplovací vialky byly zakrimplovány, byly dány do termobloku vyhřátého na 85 °C k transesterifikaci a ponechány tam 2 hodiny. Po vychladnutí byl celý obsah krimplovacích vialek převeden do 4 ml vialky s 0,5 ml 0,05 M roztoku NaOH.

Ke vzorku byl pipetován 1 ml HPLC hexanu. Poté byla vzniklá směs 5 minut intenzivně třepána na vortexu. Po oddělení fází bylo 100 µl vrchní hexanové fáze odebráno do skleněné vialky pro HPLC/GC s předem napipetovanými 900 µl HPLC hexanu. Vzorek byl připraven pro analýzu GC.

4.5.6.2 Analýza mastných kyselin metodou GC/FID

Vzorky s methylestery mastných kyselin byly následně analyzovány na plynovém chromatografu. Byl použit plynový chromatograf Thermo Scientific TRACETM Gas Chromatograph s autosamplerem Thermo Scientific A1 1310, automatickým dávkovačem se splitterem, kolonou Zebron ZB-FAME o rozměrech 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm a s plamenově ionizačním detektorem (FID). Tabulka 6 obsahuje podmínky analýzy.

Tabulka 6: Podmínky analýzy mastných kyselin metodou GC/FID.

Mobilní fáze	Průtok vodíku	1 ml/min
	Objem nástřiku vzorku	1 µl
	Teplota injektoru	250 °C s poměrem děliče toku 10
	Teplota detektoru	260 °C (průtok vzduchu 350 ml/min, průtok vodíku 25 ml/min, průtok dusíku 30 ml/min)
Teplotní program	80 °C 1 minutu	
	140 °C s teplotním gradientem 15 °C za minutu (t _R = 5 minut)	
	190 °C s teplotním gradientem 3 °C za minutu (t _R = 21,7 minut)	
	260 °C s teplotním gradientem 25 °C/ min (t _R = 24,5 minut)	
	Udržení teploty při 260 °C po dobu 1 minuty (t _R = 25,5 minut)	
	Celková doba analýzy 25,5 minut	

4.5.7 Stanovení cytotoxicity

Pro testy cytotoxicity byly použity myši melanomové buňky B16-F1 pasáž 11.

4.5.7.1 Počítání buněk

Dostatečně narostlé buňky byly centrifugovány a byl slit supernatant. Buňky byly rozsuspenzované v 5 ml média. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 100 μ l suspenze buněk a 100 μ l trypanové modře, tento roztok byl důkladně rozsuspenzován pipetou. Směs byla za pomoci pipety dávkována pod krycí skličko na Bürkerovu komůrku. Následně byl spočítán počet buněk v 5 čtvercích (4 rohové a střední). Díky tomu byl získán počet buněk v 1 ml. Na MTT test bylo potřeba zaplnit 60 jamek na mikrobiální destičce, na test bylo potřeba $1,3 \cdot 10^6$ buněk, toto množství odpovídá $2 \cdot 10^4$ buněk v jamce.

4.5.7.2 MTT test

Počet nasazených buněk pro MTT test by měl být ideálně $2 \cdot 10^4$ buněk v jamce. Naředěné se důkladně promíchaly a nalily do korýtky. Následně se pipetovalo 100 μ l vhodně naředěných buněk a PBS do destičky. PBS se pipetovalo do krajních jamek, aby nevysychaly. Buňky se pipetovaly do středových jamek. Inkubace probíhala 24 hodin při 37 °C, poté následovala kontrola růstu buněk pod mikroskopem. Následně bylo z destičky odpipetováno médium, napipetovalo se 100 μ l vzorku a kontroly (Cc, Vc, ethanol). Inkubace probíhala 24 hodin, poté byly vzorky odpipetovány. Bylo připraveno MTT (2,5 mg/ml PBS, přefiltrováno přes bakteriol. Filtr), do jamek bylo napipetováno 20 μ l MTT a inkubace probíhala 3 hodiny při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby bylo MTT odpipetováno a přidalo se 100 μ l 10 % roztoku SDS v PBS (10 g SDS/100 ml PBS). Destičky byly zabaleny do alobalu a schovaly se do tmy, kde se nechaly přes víkend. Nakonec se změřila absorbance při 540 nm.

4.6 Izolace a stanovení glukanů

V rámci této bakalářské práce byly otestovány dva postupy izolace čistých β -glukanů z kvasinkové biomasy, které byly založeny na postupech z dostupné literatury [40] [41].

4.6.1 Izolace β -D-glukanů z kvasinek (I. Postup)

V prvním extrakčním postupu byla testovaná biomasa extrahována dle postupu z publikace [40], který byl pro potřeby tohoto experimentu upraven. Jedná se o šetrnou metodu spočívající v autolýze buněk kvasinek, následovanou postupnou extrakcí jednotlivých komponent buňky. Finálním produktem jsou izolované β -glukany s intaktní strukturou a nezměněnou konformací.

Bylo naváženo 20 g lyofilizované biomasy (*Rhodotorula Kratochvilovae* CCY 20-2-26), která byla doplněna 3 % roztok NaCl. Směs byla zahřívána za stálého míchání 24 hodin při teplotě 55 °C. Následně byla směs krátce zahřáta na 80 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla směs zcentrifugována a promyta destilovanou vodou. Následujícím krokem byla úprava horkou vodou při 80 °C po dobu 1 hodiny. Po centrifugaci byl sediment doplněn roztokem 0,02 M fosfátového pufru o pH= 7,5. Ke směsi bylo přidáno dvojnásobné množství skleněných kuliček a směs byla umístěna do autoklávu na 4 hodiny při 121 °C. Po ochlazení na 45 °C byl roztok zcentrifugován a promyt destilovanou vodou.

Dalším krokem byla vícenásobná extrakce sérií organických rozpouštědel s rozdílnou polaritou. Po odstranění lipidů byla biomasa podrobena poslednímu kroku, a to proteolýze. Proteolýza probíhala 2 hodiny při 37 °C. Promyté a zcentrifugované β-glukany byly zlyofilizovány a uloženy při -40 °C pro další analýzy.

Stanovení glukánů bylo provedeno dvěma způsoby: stanovením celkových sacharidů dle Duboise a enzymatickým kitem.

4.6.2 Izolace β-glukanů z kvasinek (II. Postup)

Tato metoda byla provedena podle postupu z publikace [41], který byl pro potřeby tohoto experimentu upraven. Jednalo se o méně šetrnou metodu za použití zásad a kyselin.

Obdobně jako v předchozím experimentu bylo naváženo 20 g lyofilizované biomasy (*Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26). Biomasa byla předupravena alkalickým promytím s roztokem NaOH o pH= 10 po dobu 30 minut. Následně byla zcentrifugována, promyta destilovanou vodou, poté byla smíchána s 3 % roztokem NaCl. Roztok byl inkubován 24 hodin při teplotě 55 °C za stálého míchání, po uplynutí této doby byl roztok zahříván 15 minut, po uplynutí této doby byl roztok zahříván 15 minut na 80 °C. Po ochlazení byl roztok opět centrifugován a promyt destilovanou vodou. K alkalické úpravě byl použit 1 M roztok NaOH. Směs byla po 2 hodinách za stálého míchání při 90 °C promyta a následně podrobena kyselé hydrolyze 1 M kyselinou octovou za stejných podmínek při 80 °C. Následovala vícenásobná organická extrakce sérií rozpouštědel s rozdílnou polaritou. Po organické extrakci byl sediment rozdělen na dvě části, kdy 1. část byla zlyofilizována a ponechána pro budoucí analýzy. Druhá část byla podrobena proteolýze za stejných podmínek jako v předchozím postupu.

Vyextrahované glukany byly zcentrifugovány a zlyofilizovány. Stanovení glukánů bylo provedeno dvěma způsoby: stanovením neutrálních sacharidů dle Duboise a enzymatickým kitem.

4.6.3 Enzymatické stanovení kitem

Metoda zde sloužila ke stanovení vyizolovaných glukánů. Postup u metody byl stejný jako při stanovení biomasy [32].

4.6.4 Stanovení neutrálních sacharidů metodou dle Duboise

Tato metoda byla použita na stanovení množství vyizolovaných glukánů a dalších sacharidů. Princip metody je založený na dehydrataci sacharidů za pomoci koncentrované kyseliny sírové za vzniku furalu (v případě pentos) či 5-hydroxy-methylfuralu (v případě hexos). Červené zbarvení vzniká vlivem kondenzace furalu s fenolem. Absorbance byla měřena při 490 nm.

Kalibrační řada byla připravena ze standardu manózy o koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Rozmezí koncentrací bylo 0 až 100 μg·ml⁻¹. Do zkumavek bylo pipetováno 1 ml vzorku, 1 ml 5 % fenolu a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Blank obsahoval místo vzorku 1 ml destilované vody. Směs se následně inkubovala při laboratorní teplotě 30 minut. Poté se změřila absorbance při 490 nm proti blanku [33].

4.6.5 Gramovo barvení

Toto barvení se provádělo pouze u postupu izolace I., hned po kroku homogenizace. Do středu podložního sklíčka byla dána kapka vzorku po homogenizaci, tato kapka byla rozetřena po podložním skle. Nátěr se nechal zaschnout a zafixoval se plamenem. Následně se preparát převrstvil na 20 sekund roztokem krystalové violeti. Po této době byla krystalická violet slita a preparát se opláchnul vodou. Po skončení se preparát převrstvil asi na 1 minutu Lugolovým roztokem. Lugolův roztok se po 1 minutě slil a preparát se opláchnul vodou. Poté se preparát odbarvoval asi 20 až 30 sekund 96 % ethanolem. A oplachoval se tak dlouho dokud odcházel barvivo, následně se roztok opláchnul vodou. Dobarvování se provádělo zředěným roztokem karbolfuchsinu po dobu 1 minuty. Po skončení dobarvování se preparát opláchnul vodou a byl sušen na vzduchu. Po usušení se preparát sledoval pod mikroskopem. Po mikroskopem bylo vidět růžově zbarvené rozbité buňky kvasinky a neporušené buňky měly fialovou barvu.

4.6.6 Stanovení celkových proteinů dle Biureta

Princip této metody spočívá ve tvorbě fialově zbarvených chelátů mědi s bílkovinou. Nejdříve se připravila kalibrační řada, kde se pipetovalo 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 ml bílkovinného standardu (3 mg/ml) a objem se doplnil na 3 ml fyziologickým roztokem. Do každé zkumavky se přidalo 0,3 ml Biuretova činidla. Kalibrační řada se nechala 20-30 minut stát a po této době se změřila absorbance při 550 nm proti slepému vzorku. Při měření vzorku se do 2 zkumavek odměřil 1 ml vzorku a objem se doplnil na 3 ml fyziologickým roztokem. Nakonec se přidalo 0,3 ml Biuretova činidla a vzorek se nechal 20-30 minut stát. Absorbance se měřila při 550 nm [33].

4.6.7 MTT test

Metoda zde sloužila ke stanovení účinku vyizolované směsi glukanů a sacharidů na lidskou buněčnou linii HaCaT. Postup u metody byl stejný jako při stanovení biomasy.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce se zaměřuje na charakterizaci vzorků biomasy u všech vybraných kmenů kvasinek. A dále na izolaci a stanovení glukánů.

5.1 Stanovení vzorků biomasy

Tabulka 7 obsahuje výtěžnost jednotlivých lyofilizovaných biomas kvasinek z kultivace.

Tabulka 7: Množství získané lyofilizované biomasy z kultivace.

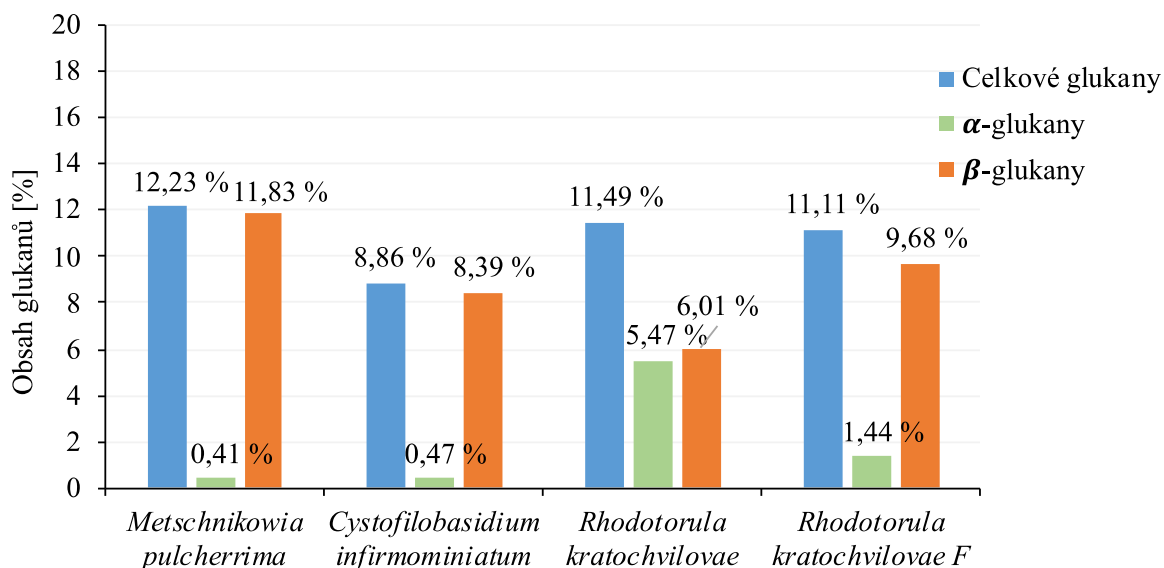
	Množství získané biomasy [g/l]
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	9,2
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	9,8
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	9,5
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i> z fermentoru	18,5

5.1.1 Stanovení glukánů enzymatickým kitem

Glukany jsou významné látky s léčivými účinky. Jedná se o dobré antioxidanty, imunomodulátory, dále dokážou snížit cholesterol, napomoci při cukrovce, nebo pomáhají při léčbě popálenin [3].

Metoda je založená na hydrolýze buněčné stěny a na enzymatickém rozkladu polysacharidů na jednotlivé D-glukózy. Množství β -glukanů se určí z rozdílu celkového obsahu glukánů a obsahu α -glukanů. Jedná se stanovení β -glukanů z kvasinek pomocí komerčně dodávané sady od firmy Megazyme [32].

Stanovení bylo provedeno na lyofilizovaných vzorcích biomasy. V grafu 1 je vidět, že nejvyššího obsahu glukánů dosahuje kvasinka *Metschnikowia pulcherrima* 12,23 %. Nejvyšší obsah α -glukanů obsahuje *Rhodotorula kratochvilovae* 5,47 %, kultivována v Erlenmeyerových baňkách. Nejvyšší obsah β -glukanů nalezneme u *Metschnikowia pulcherrima* 11,83 %.



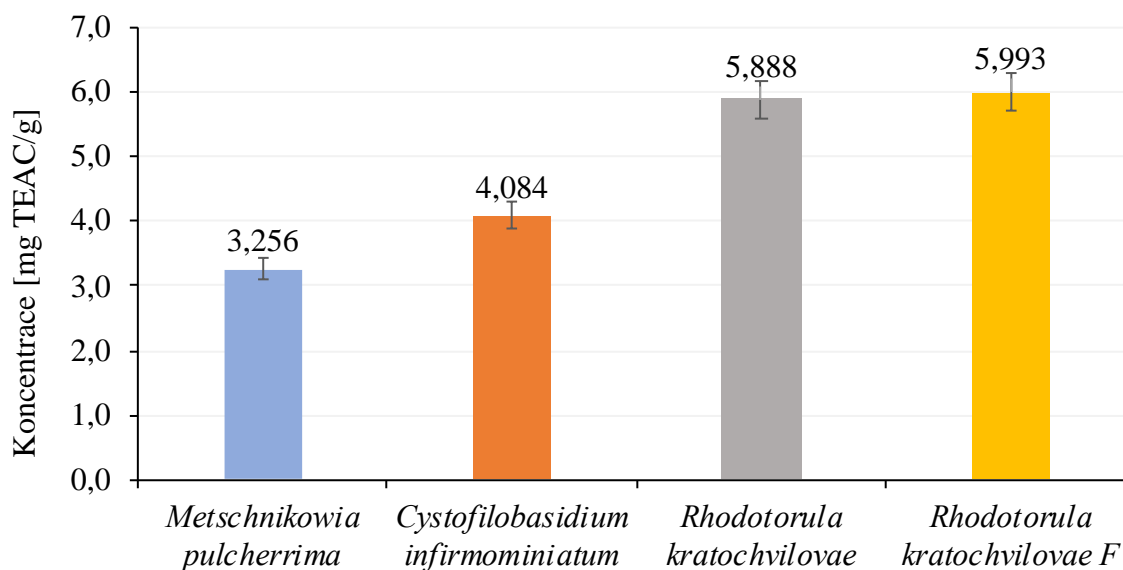
Graf 1: Obsah glukaniů ve vybraných lyofilizovaných biomasách kvasinek. *Rhodotorula kratochvilovae F* označuje kvasinku *Rhodotorula kratochvilovae*, která byla kultivována ve fermentoru. Ostatní kmeny byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách.

5.1.2 Antioxidační aktivita

Ke stanovení antioxidační aktivity byla použita metoda TEAC, která hodnotí schopnosti vzorku zhášet kation-radikál ABTS^{•+}. Zhášení se sleduje spektrofotometricky díky změně absorpčního spektra při vlnové délce 734 nm. Výsledná antioxidační aktivita vzorku se porovná s antioxidační aktivitou syntetické standardní látky (derivátem vitamínu A s názvem Trolox) [33].

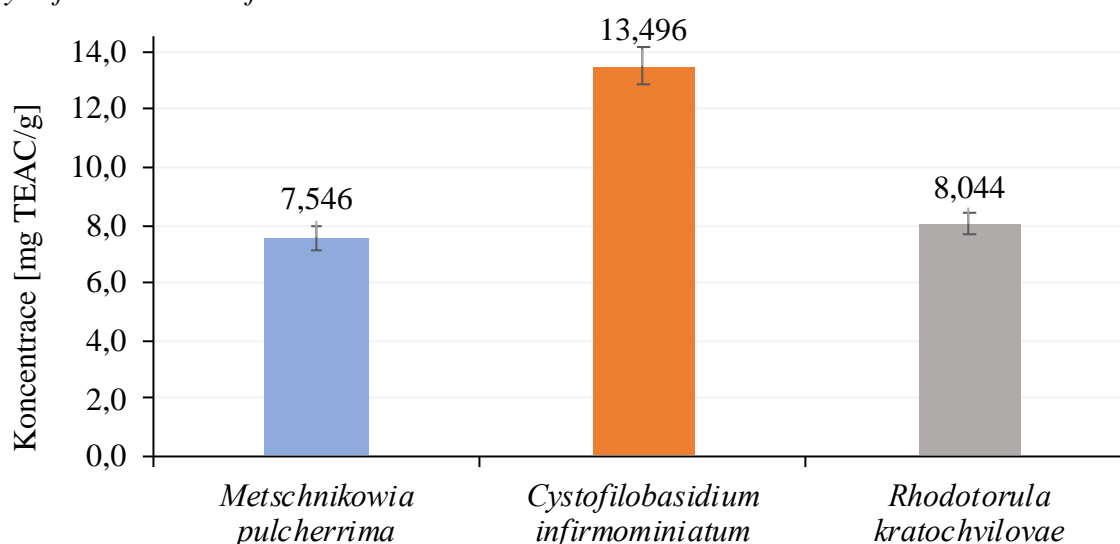
Byla stanovena antioxidační aktivita vzorků biomasy. Výsledná antioxidační aktivita je uvedena v mg/g vzorku. Výsledky byly vyhodnoceny podle kalibrační rovnice: $y = 1,0134x$. V grafu 2 máme uvedeny antioxidační účinky pro lyofilizovanou biomasu, která byla kultivována v Erlenmeyerových baňkách nebo ve fermentoru. Nejvyšší antioxidační aktivita 5,993 mg TEAC/g měla kvasinka *Rhodotorula kratochvilovae*, která byla jako jediná kultivována ve fermentoru. Když tento výsledek antioxidační aktivity porovnáme s antioxidační aktivitou zeleného čaje GREEN TEA od firmy TEEKANNE, který má v horkém nálevu antioxidační aktivitu 14,28 mg TEAC/ml po 10 minutách výluhu [42]. Je vidět, že antioxidační hodnota tohoto čaje je téměř trojnásobná oproti nejvyšší antioxidační aktivitě u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, která byla jako jediná kultivována ve fermentoru.

Rozdíl antioxidační aktivity mezi kvasinkou *Rhodotorula kratochvilovae* kultivovanou ve fermentoru a v Erlenmeyerových baňkách není velký. Pravděpodobně mohla být vyšší antioxidační aktivita způsobena řízeným provzdušňováním během kultivace ve fermentoru.



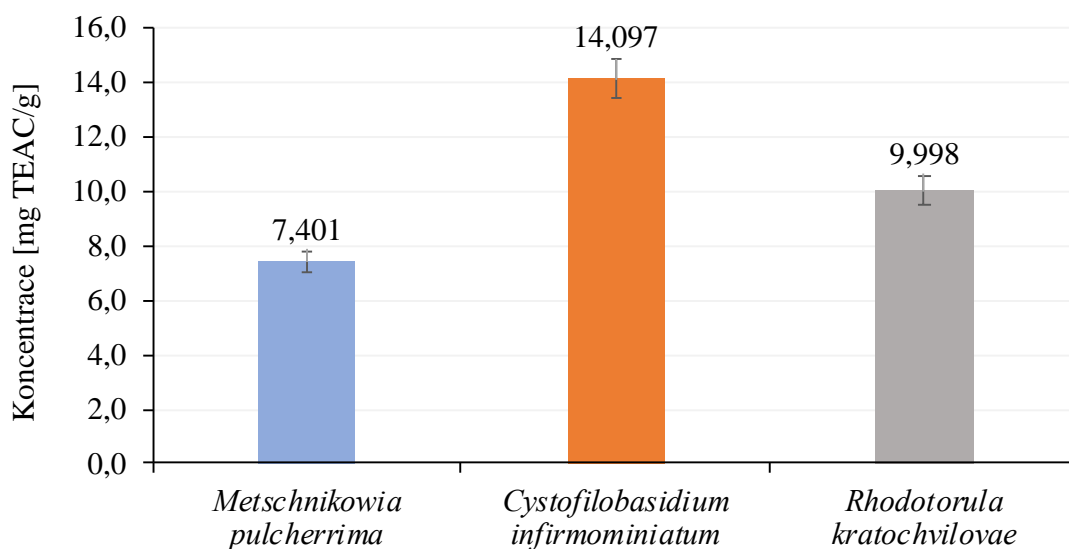
Graf 2: Antioxidační aktivita lyofilizované biomasy. *Rhodotorula kratochvilovae F* označuje kvasinku *Rhodotorula kratochvilovae*, která byla kultivována ve fermentoru. Ostatní kmeny byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách. TEAC neboli trolox equivalent antioxidant capacity, jedná se o vyjádření antioxidační kapacity v přepočtu na množství standardu troloxu.

V grafu 3 nalezneme antioxidační aktivitu pro živé biomasy, která byla stanovena pro kmeny kultivované v Erlenmeyerových baňkách. Nejvyšší antioxidační aktivitu 13,496 mg TEAC/g má kvasinka *Cystofilobasidium infirmominiatum*. V porovnání s antioxidační aktivitou zeleného čaje GREEN TEA od firmy TEEKANNE, který má v horkém nálevu antioxidační aktivitu 14,28 mg TEAC/ml po 10 minutách výluhu [42]. Je vidět, že antioxidační aktivita tohoto čaje je jen o trochu vyšší než naměřená hodnota antioxidační aktivity u živé biomasy *Cystofilobasidium infirmominiatum*.



Graf 3: Antioxidační aktivita živé biomasy. TEAC neboli trolox equivalent antioxidant capacity, jedná se o vyjádření antioxidační kapacity v přepočtu na množství standardu troloxu.

V grafu 4 nalezneme antioxidační aktivitu pro mrtvou biomasu, která byla stanovena pro kmeny kultivované v Erlenmeyerových baňkách. Nejvyšší antioxidační účinek 14,097 mg TEAC/g má kvasinka *Cystofilobasidium infirmominiatum*. V porovnání s antioxidační aktivitou zeleného čaje GREEN TEA od firmy TEEKANNE, který má v horkém nálevu antioxidační aktivitu 14,28 mg TEAC/ml po 10 minutách výluhu [42]. Je vidět, že antioxidační hodnota tohoto čaje je jen o trochu vyšší než naměřená hodnota antioxidační aktivity u mrtvé biomasy kvasinky *Cystofilobasidium infirmominiatum*.

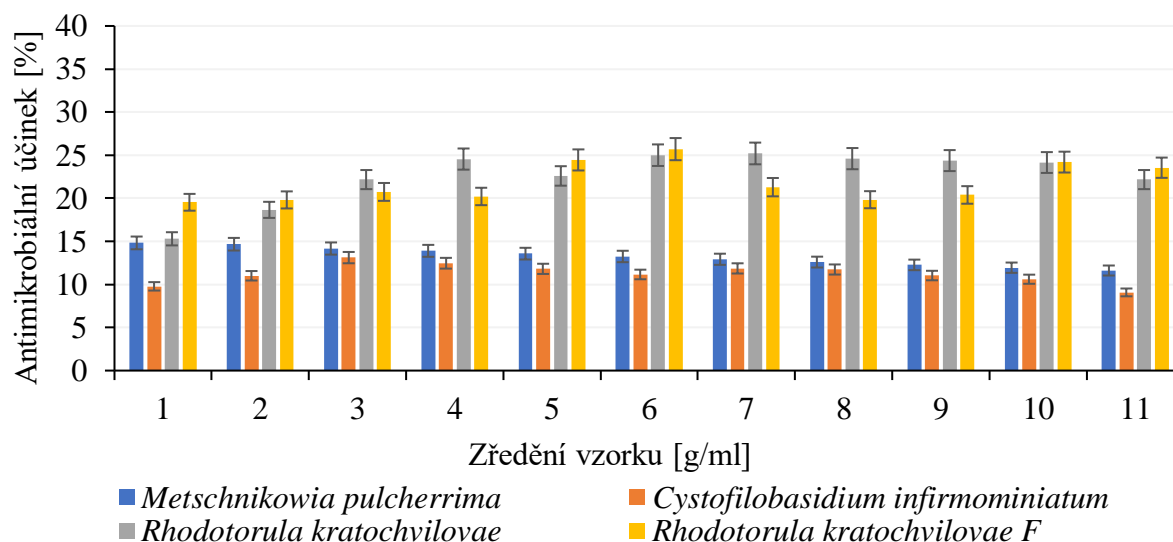


Graf 4: Antioxidační účinek mrtvé biomasy. TEAC neboli trolox equivalent antioxidant capacity, jedná se o vyjádření antioxidační kapacity v přepočtu na množství standardu troloxu.

5.1.3 Antimikrobiální účinek

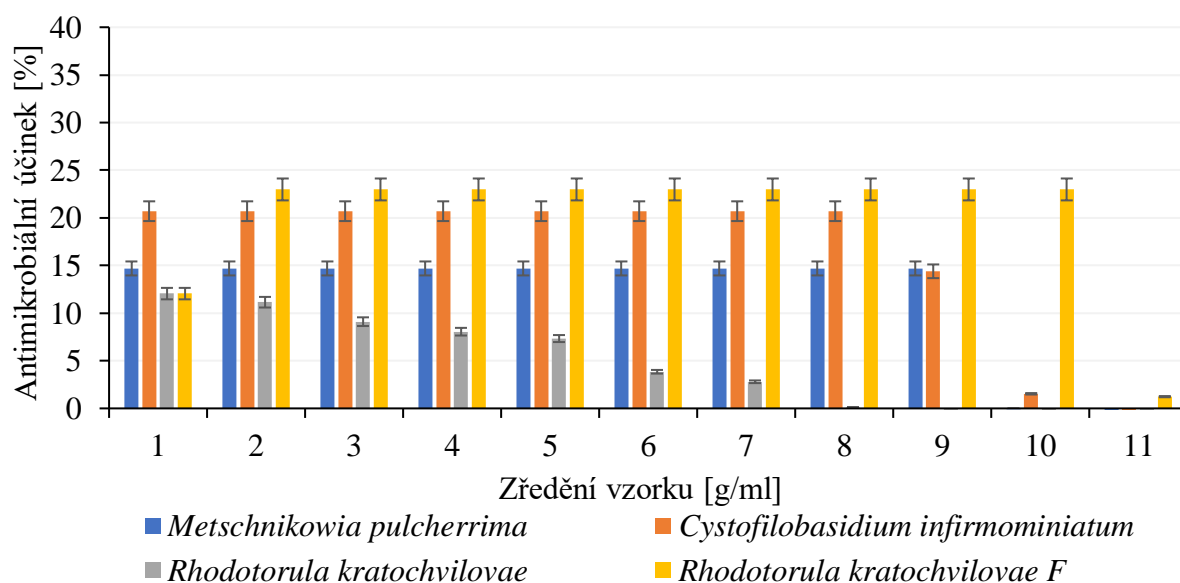
Antibakteriální účinek je schopnost látky inhibovat růst jiného mikroorganismu. Byl stanoven antimikrobiální účinek sledováním vzorků proti modelovým mikroorganismům. Antimikrobiální účinek vzorků biomasy byl stanoven proti modelovým mikroorganismům kvasince *Candida glabrata*, proti grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus* a proti gramnegativní bakterii *Serratia marcescens*. Tyto mikroorganismy byly vybrány jako zástupci z jednotlivých skupin mikroorganismů.

Byla stanovena antimikrobiální aktivita proti modelovému mikroorganismu kvasince *Candida glabrata*. V grafu 5 nalezneme antimikrobiální účinek lyofilizované biomasy proti kvasince *Candida glabrata*. Nejvyšší antimikrobiální účinek proti kvasince *Candida glabrata* u lyofilizované biomasy byl u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, v případě kvasinky kultivované v Erlenmeyerových baňkách i v případě kultivace ve fermentoru. Nejvyšší hodnota na antimikrobiálního účinku proti kvasince *Candida glabrata* byla naměřena 25,7 % u lyofilizované kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, kultivované ve fermentoru při zředění vzorku 0,0021 g/ml.



Graf 5: Antimikrobiální účinek proti kvasince *Candida glabrata*. *Rhodotorula kratochvilovae F* označuje kvasinku *Rhodotorula kratochvilovae*, která byla kultivována ve fermentoru. Ostatní kmeny byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách. Antimikrobiální účinek udává kolik % buněk modelového mikroorganismu se inhibuje vzorkem. Zředění vzorku udává koncentraci vzorku, která působí na modelový mikroorganismus. 1 odpovídá koncentraci 0,067 g/ml a 11 odpovídá zředění 0,000065 g/ml, vzorek byl naředěn vždy na poloviční koncentraci.

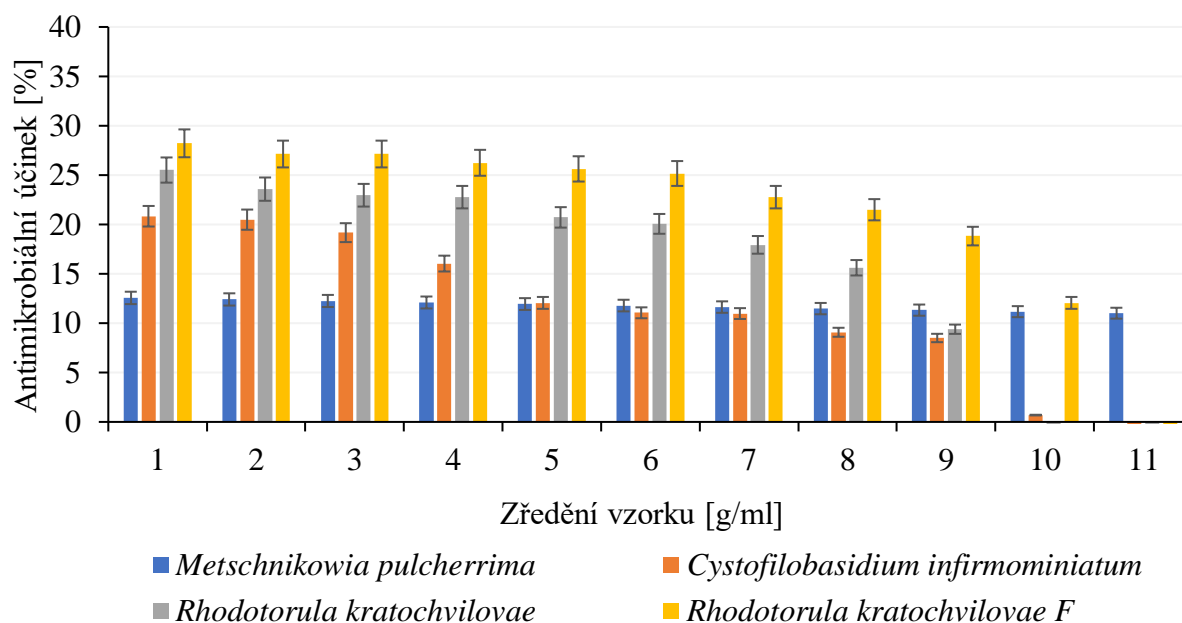
V grafu 6 nalezneme antimikrobiální účinek lyofilizované biomasy proti modelovému mikroorganismu grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus*. Nejvyšší antimikrobiální účinek byl u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* v případě kultivace ve fermentoru. Druhý nejvyšší antimikrobiální účinek měla kvasinka *Cystofilobasidium infirmoniatum*. Nejvyšší hodnota na antimikrobiálního účinku proti grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus* byla naměřená 22,98 % u lyofilizované kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, kultivované ve fermentoru při zředění 0,033 - 0,00013 g/ml. Při zředění 0,00026 g/ml nebyl detekován žádný mikrobiální účinek u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, kultivované v Erlenmeyerových baňkách. Dále nebyl antimikrobiální účinek detekován u zředění 0,00013 g/ml u kvasinek *Metschnikowia pulcherrima* a u *Rhodotorula kratochvilovae*, kultivované v Erlenmeyerových baňkách. U zředění vzorku 0,000065 g/ml byl antimikrobiální účinek detekován jen u kvasinky *Rhodotorula Kratochvilovae* kultivované ve fermentoru.



Graf 6: Antimikrobiální účinek proti grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus*. *Rhodotorula kratochvilovae F* označuje kvasinku *Rhodotorula kratochvilovae*, která byla kultivována ve fermentoru. Ostatní kmeny byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách. Antimikrobiální účinek udává kolik % buněk modelového mikroorganismu se inhibuje vzorkem. Zředění vzorku udává koncentraci vzorku, která působí na modelový mikroorganismus. 1 odpovídá koncentraci 0,067 g/ml a 11 odpovídá zředění 0,000065 g/ml, vzorek byl naředěn vždy na poloviční koncentraci.

V grafu 7 nalezneme antimikrobiální aktivita lyofilizované biomasy na gramnegativní bakterii *Serratia marcescens*. Nejvyšší antimikrobiální účinek byl u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* v případě kultivace ve fermentoru. Druhý nejvyšší antimikrobiální účinek měla kvasinka *Rhodotorula kratochvilovae* v případě kvasinky kultivované v Erlenmeyerových baňkách.

Nejvyšší hodnota na antimikrobiálního účinku proti negativní bakterii *Serratia marcescens* byla naměřená 28,21 % u lyofilizované kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, kultivované ve fermentoru při zředění vzorku 0,067 g/ml. Antimikrobiální účinek nebyl detekován u zředění 0,00013 g/ml u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, kultivované v Erlenmeyerových baňkách. U zředění vzorku 0,000065 g/ml byl antimikrobiální účinek detekován jen u kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*.



Graf 7: Antimikrobiální účinek proti gramnegativní bakterii *Serratia marcescens*. *Rhodotorula kratochvilovae F* označuje kvasinku *Rhodotorula kratochvilovae*, která byla kultivována ve fermentoru. Ostatní kmeny byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách. Antimikrobiální účinek udává kolik % buněk modelového mikroorganismu se inhibuje vzorkem. Zředění vzorku udává koncentraci vzorku, která působí na modelový mikroorganismus. 1 odpovídá koncentraci 0,067 g/ml a 11 odpovídá zředění 0,000065 g/ml, vzorek byl naředěn vždy na poloviční koncentraci.

5.1.4 Antimikrobiální účinek – Agarová difúzní metoda

Antimikrobiální účinek je schopnost látky inhibovat růst mikroorganismů. Test byl proveden pro zjištění, jestli se u některého z testovaných vzorků neobjeví inhibiční zóna, ta by znamenala, že daný vzorek má antimikrobiální účinek proti danému mikroorganismu.

Test na antimikrobiální účinek byl proveden proti modelovým mikroorganismům. Byl proveden test na antimikrobiální účinek proti gramnegativní bakterii *Escherichia coli*, zde nebyla zjištěna žádná inhibiční zóna u testovaných vzorků. Jedinou inhibiční zónu měl kontrolní vzorek antibiotik ampicilin o koncentraci 10 mg/100 ml. Ampicilin měl průměrnou inhibiční zónu 4,31 mm. Druhý test na antimikrobiální účinek byl proveden proti modelové grampozitivní bakterii *Micrococcus luteus*. Zde byla zjištěna jedna inhibiční zóna u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* kultivované ve fermentoru, kde průměrné inhibiční zóna byla 4,25 mm. Druhou inhibiční zónu měl kontrolní vzorek antibiotik, ampicilin měl průměrnou inhibiční zónu 11,5 mm.

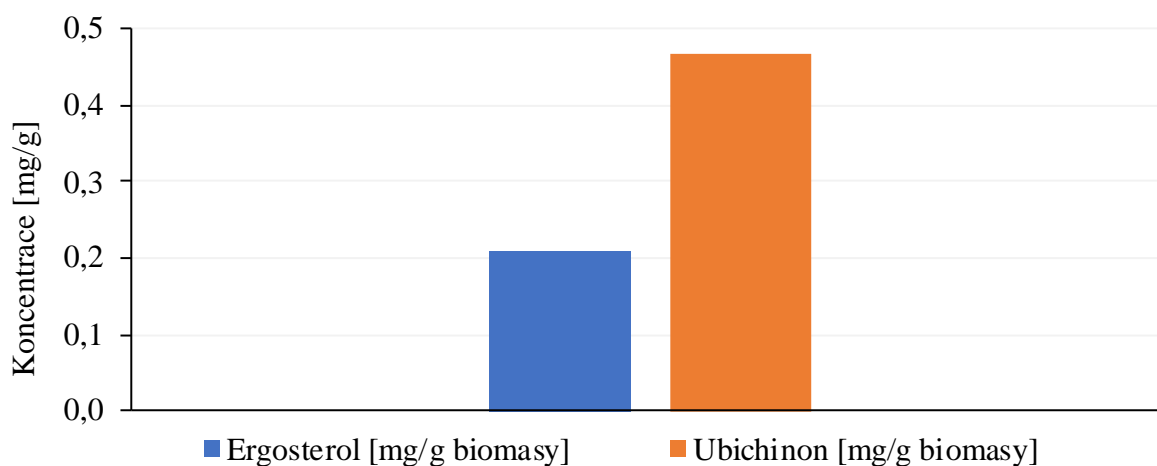
5.1.5 Stanovení karotenoidů (HPLC)

Toto stanovení bylo provedeno z důvodu charakterizace biomasy kvasinek, jelikož biomasa obsahuje různé aktivní látky, které mohou mít podobné účinky jako β -glukany. Pomocí metody HPLC byl stanoven obsah karotenoidů v lyofilizovaných kulturách kvasinek.

V tabulce 8 nalezneme charakterizaci složení kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*. V grafu 8 nalezneme obsah lipofilních látek v biomase kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*. U této kvasinky nebyly detekovány žádné karotenoidy, protože tato kvasinka obsahuje pigment pulcherimin, který není karotenoidní povahy.

Tabulka 8: Charakterizace složení kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*.

	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Koncentrace [mg/g suché biomasy]
Ergosterol	4,204	0,210
Ubichinon	9,374	0,469

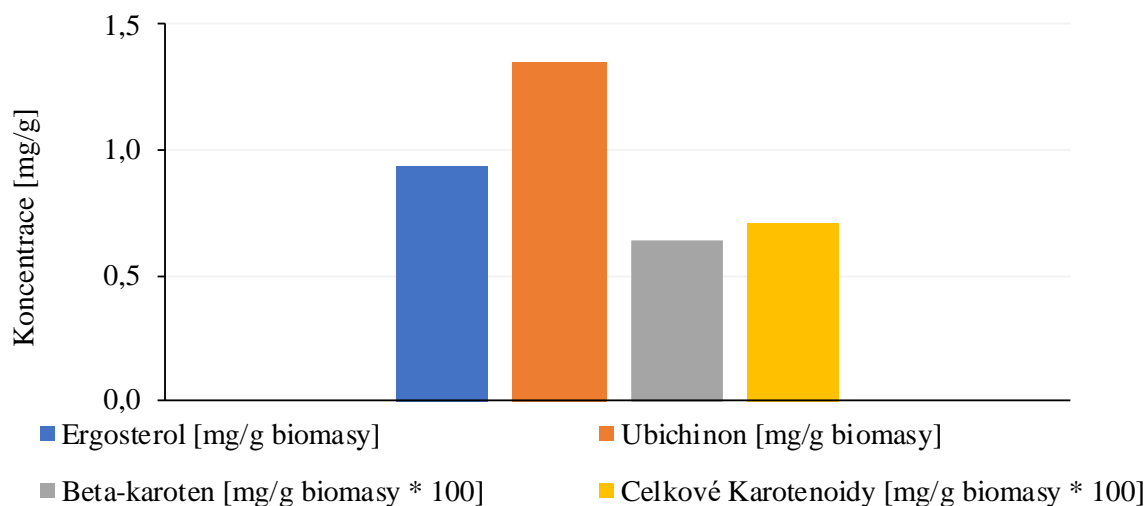


Graf 8: Obsah lipofilních látek v biomase kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*.

V tabulce 9 nalezneme charakterizaci složení kvasinky *Cystofilobasidium infirmominiatum*. V grafu 9 nalezneme složení lipofilních látek v biomase kvasinky *Cystofilobasidium infirmominiatum*, kde byl obsah celkových karotenoidů stanoven na 0,007 mg/g. Podmínky kultivace nebyly vhodné pro produkci karotenoidů, kde majoritu tvořil β -karoten. Produkce dalších karotenoidů typických pro tento kmen (torulen, torularhodin) byla pod limitem detekce, a tudíž není ve výsledcích zahrnuta.

Tabulka 9: Charakterizace složení kvasinky *Cystofilobasidium infirmominiatum*.

	Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]	Koncentrace [mg/g suché biomasy]
Ergosterol	18,807	0,940
Ubichinon	26,992	1,350
β -karoten	0,127	0,006
Celkové karotenoidy	0,142	0,007

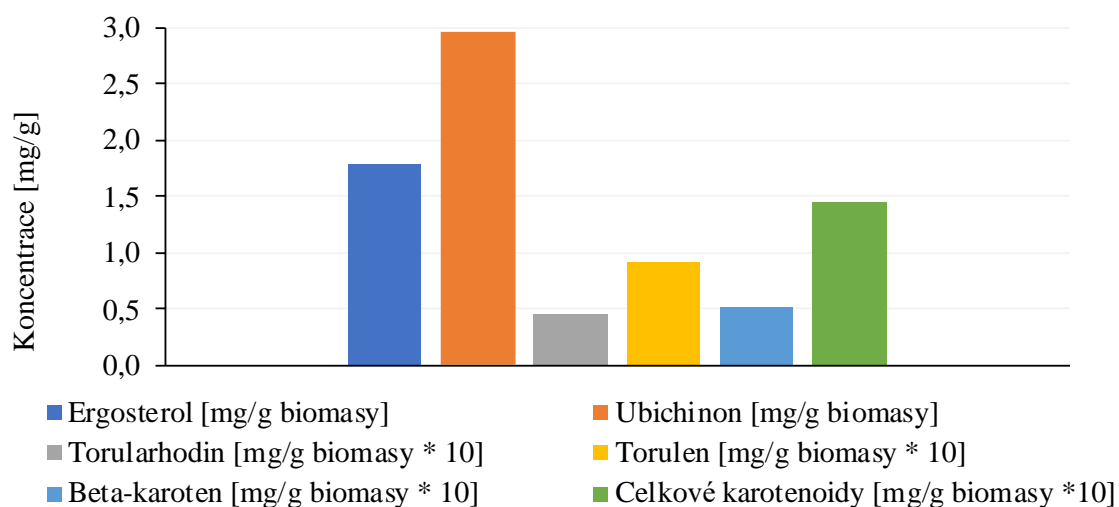


Graf 9: Obsah lipofilních látek v biomase kvasinky *Cystofilobasidium infirmominatum*.

V tabulce 10 nalezneme charakterizaci složení kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*. V grafu 10 nalezneme složení lipofilních látek v biomase u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*. U této kvasinky byl obsah celkových karotenoidů stanoven na 0,146 mg/g.

Tabulka 10: Charakterizace složení kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*.

	Koncentrace [μg/ml]	Koncentrace [mg/g suché biomasy]
Ergosterol	35,803	1,790
Ubichinon	59,096	2,955
Torularhodin	0,897	0,045
Torulen	1,841	0,092
β-karoten	1,056	0,053
Celkové karotenoidy	2,916	0,146

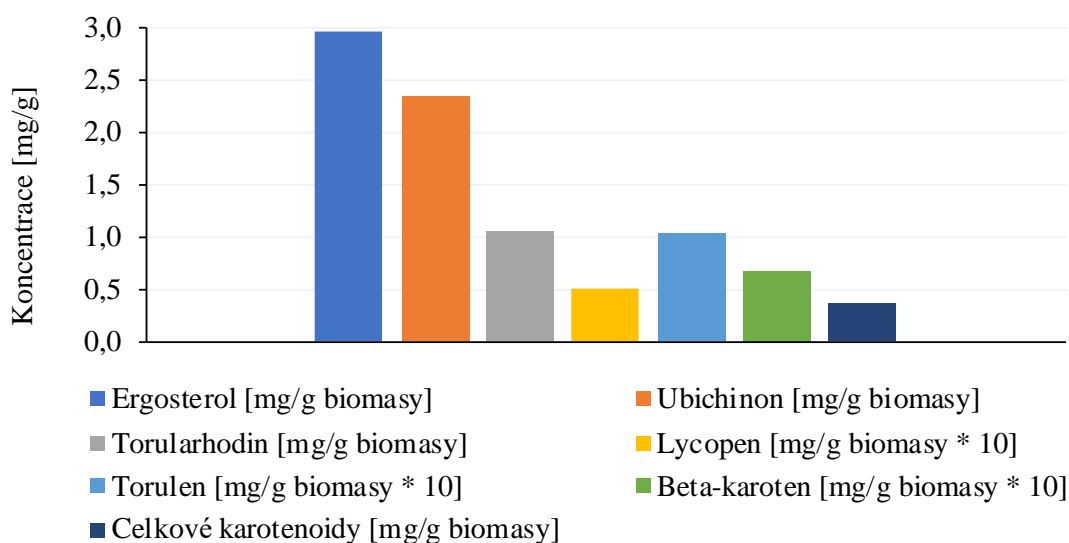


Graf 10: Obsah lipofilních látek v biomase kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*.

V tabulce 11 nalezneme charakterizaci složení kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, kultivované ve fermentoru. V grafu 11 nalezneme složení lipofilních látek v biomase u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae*, kultivované ve fermentoru. U této kvasinky byl obsah celkových karotenoidů stanoven na 0,374 mg/g. Větší množstvím celkových karotenoidů u *Rhodotorula kratochvilovae* kultivované ve fermentoru, než u kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* kultivované v Erlenmeyerových baňkách mohlo být způsobeno řízeným provzdušňováním během kultivace ve fermentoru.

Tabulka 11: Charakterizace složení kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* z fermentoru.

	Koncentrace [μg/ml]	Koncentrace [mg/g suché biomasy]
Ergosterol	59,091	2,955
Ubichinon	46,700	2,335
Torularhodin	21,254	1,063
Lycopen	1,022	0,051
Torulen	2,056	0,103
β-karoten	1,330	0,066
Celkové karotenoidy	7,473	0,374

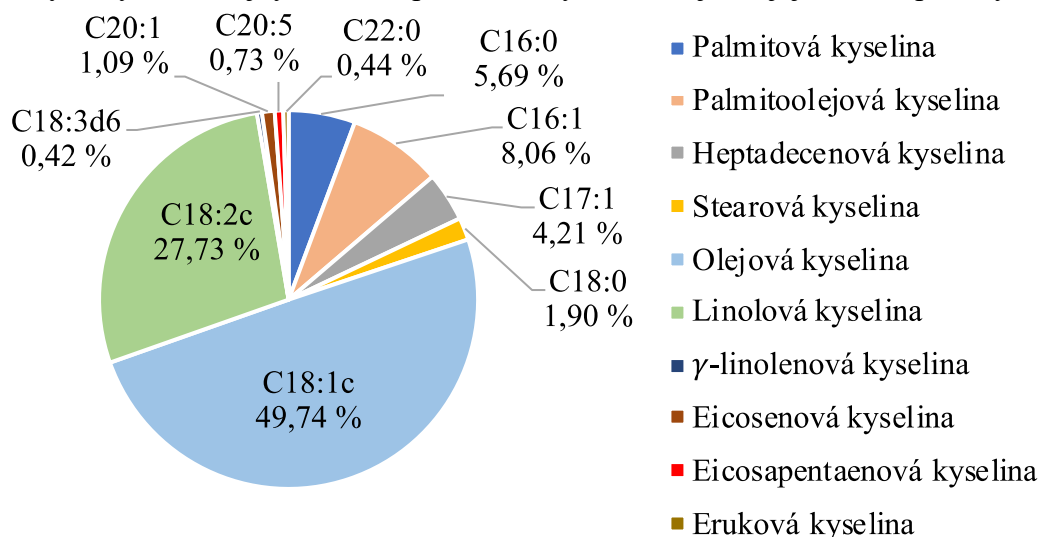


Graf 11: Obsah lipofilních látek v biomase kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* z fermentoru.

5.1.6 Stanovení mastných kyselin (GC)

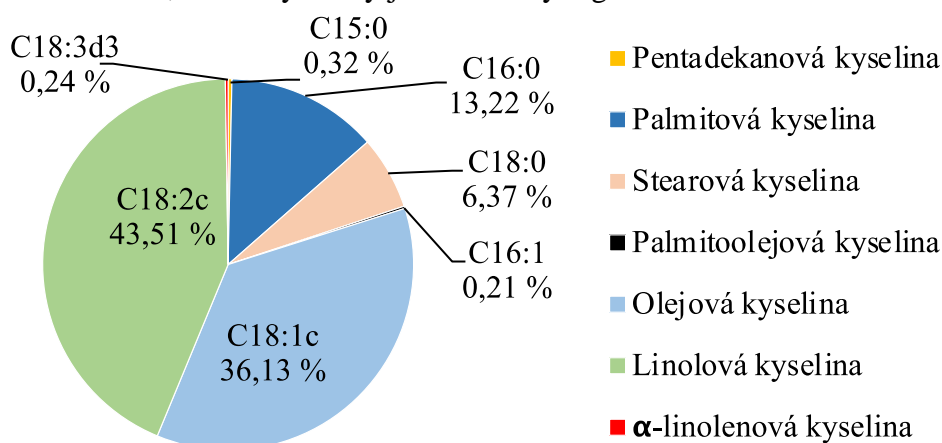
Mastné kyseliny patří do skupiny lipidů. Jedná se o karboxylové kyseliny, počet uhlíků v řetězci je 4 až 26 uhlíků. Mastné kyseliny jsou nejvýznamnější výživovou složkou lipidů [6].

Mastné kyseliny byly stanoveny pomocí transesterifikace, neboli převedením na methylestery. Měření probíhalo u lyofilizované biomasy. Stanovení bylo provedeno z důvodu potřeby charakterizace kvasinkové biomasy. V grafu 12 jsou uvedeny koncentrace mastných kyselin pro kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*. Bylo identifikováno 10 majoritních mastných kyselin. Nejvyšší zastoupení měla kyselina olejová, jejíž zastoupení bylo 49,74 %.



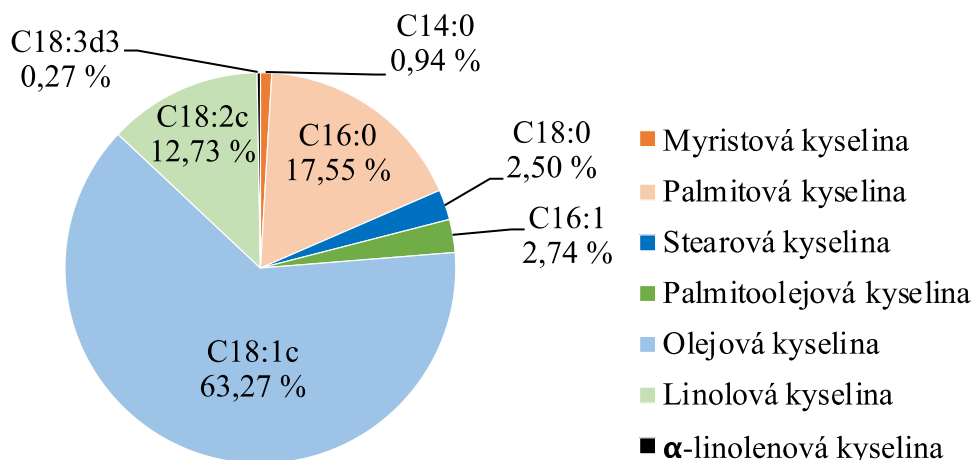
Graf 12: Zastoupení mastných kyselin v kvasince *Metschnikowia pulcherrima*.

Další stanovovanou kvasinkou byla *Cystofilobasidium infirmominiatum*, v této kvasince bylo identifikováno 7 majoritních mastných kyselin. Nejvyšší zastoupení v kvasince měla kyselina linolová 43,51 %. Výsledky jsou uvedeny v grafu 13.



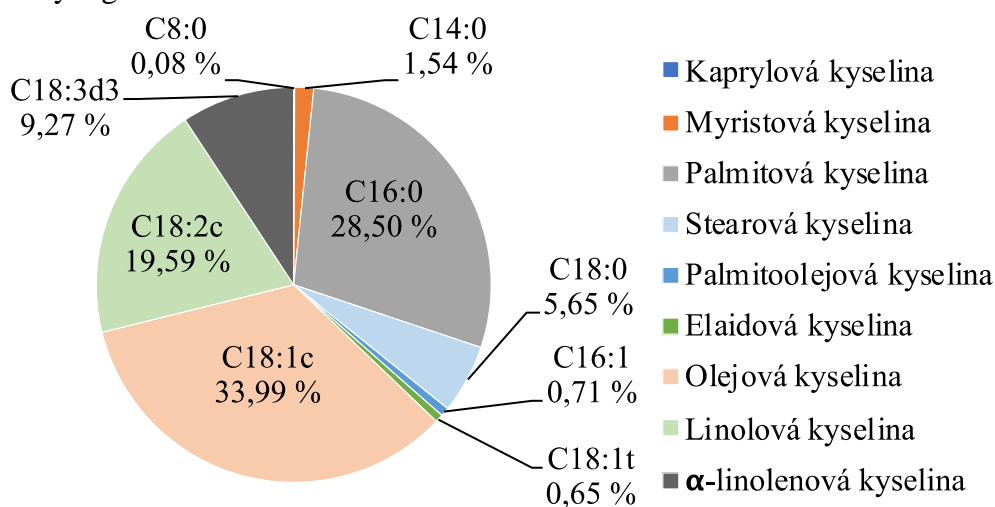
Graf 13: Zastoupení mastných kyselin v kvasince *Cystofilobasidium infirmominiatum*.

U kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* bylo zjištěno nejvyšší zastoupení kyseliny olejové 63,27%. Celkem se zjistilo, že kvasinka obsahuje 7 druhů mastných kyselin, které jsou uvedeny v grafu 14.



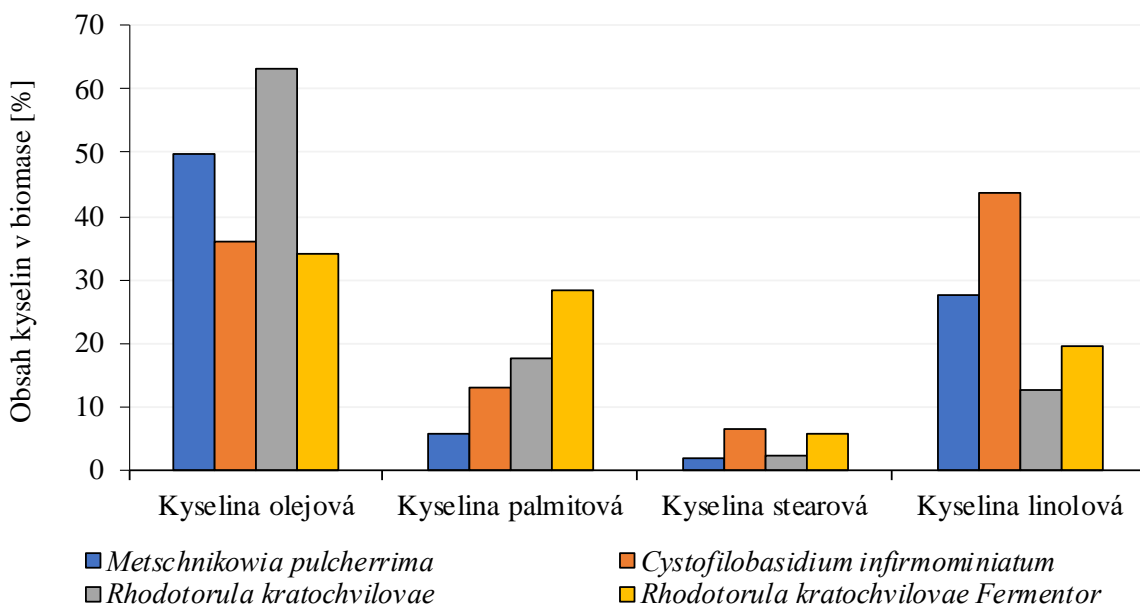
Graf 14: Zastoupení mastných kyselin v kvasince *Rhodotorule kratochvilovae*.

V *Rhodotorule kratochvilovae*, které byla kultivována ve fermentoru, byl zjištěn obsah 9 mastných kyselin. Nejvyšší obsah měla kyselina olejová 33,99 %. Zbylé hodnoty jsou uvedeny v grafu 15.



Graf 15: Zastoupení mastných kyselin v kvasince *Rhodotorule kratochvilovae* z fermentoru.

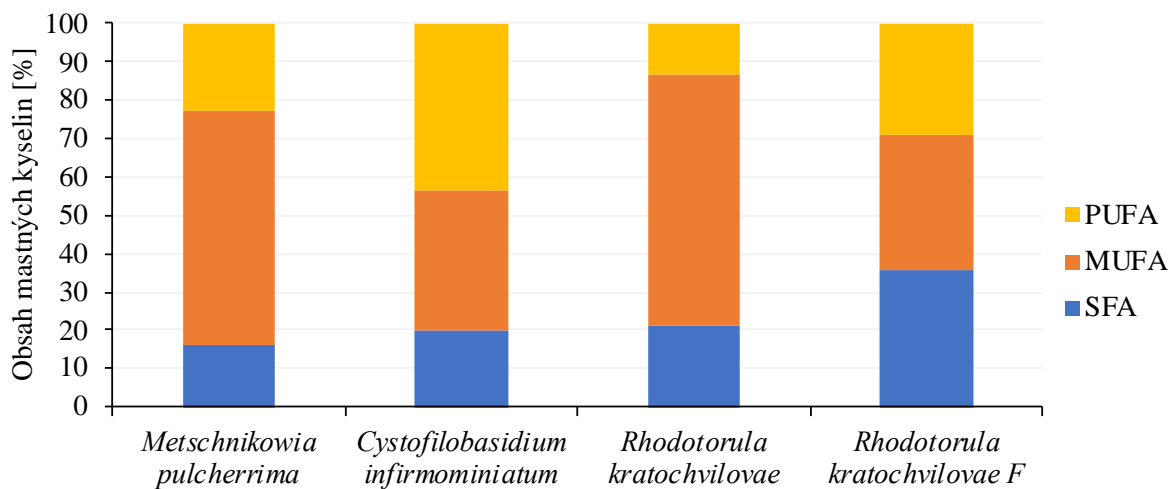
Celkové zastoupení důležitých mastných kyselin u námi testovaných lyofilizovaných biomas jsou uvedeny v grafu 16. Bylo zjištěno, nejvyšší zastoupení kyselin olejové má kvasinka *Rhodotorula kratochvilovae*, která byla kultivována v Erlenmeyerově baňce, pravděpodobně díky jejímu způsobu kultivace, bylo procento kyseliny olejové v kvasince vysoké. Nejvyšší obsah kyselina palmitová měla též kvasinka *Rhodotorula kratochvilovae*, ovšem tentokrát kultivovaná ve fermentoru. Nejvyšší obsah kyseliny stearové a kyseliny linolové byl detekován u kvasinky *Cystofilobasidium infirmominium*.



Graf 16: Graf celkového zastoupení důležitých mastných kyselin u lyofilizované biomasy.

V grafu 17 nalezneme množství PUFA, MUFA a SFA pro jednotlivé kvasinky. Bylo zjištěno, že nejvyšší hodnotu 35,78 % SFA má *Rhodotorula kratochvilovae* z fermentoru. Nejvyšší hodnotu 66,01 % MUFA má *Rhodotorula kratochvilovae*. A nejvyšší hodnotu 43,75 % PUFA má *Cystofilobasidium infirmominatum*.

Rozdíl v poměru PUFA, MUFA a SFA u *Rhodotorula kratochvilovae* z fermentoru a *Rhodotorula kratochvilovae* byl pravděpodobně způsobený rozdílným způsobem kultivace. Kdy při kultivaci ve fermentoru bylo vzdušnění řízeno, ale u kultivace v Erlenmeyerových baňkách bylo obsaženo menší množství vzduchu v roztoku. Dále u kultivace ve fermentoru byl větší objem biomasy, který mohl způsobit menší obsah živin v médiu a horší promíchávání roztoku. Jednotlivé složky mají své specifické účinky. SFA neboli nasycená mastná kyselina je kyselina, která neobsahuje žádnou dvojnou vazbu a při pokojové teplotě má tuhou konzistenci. MUFA neboli mononenasyčené mastné kyseliny obsahují 1 dvojnou vazbu. PUFA neboli polynenasycené mastné kyseliny obsahují více dvojných vazeb [6].



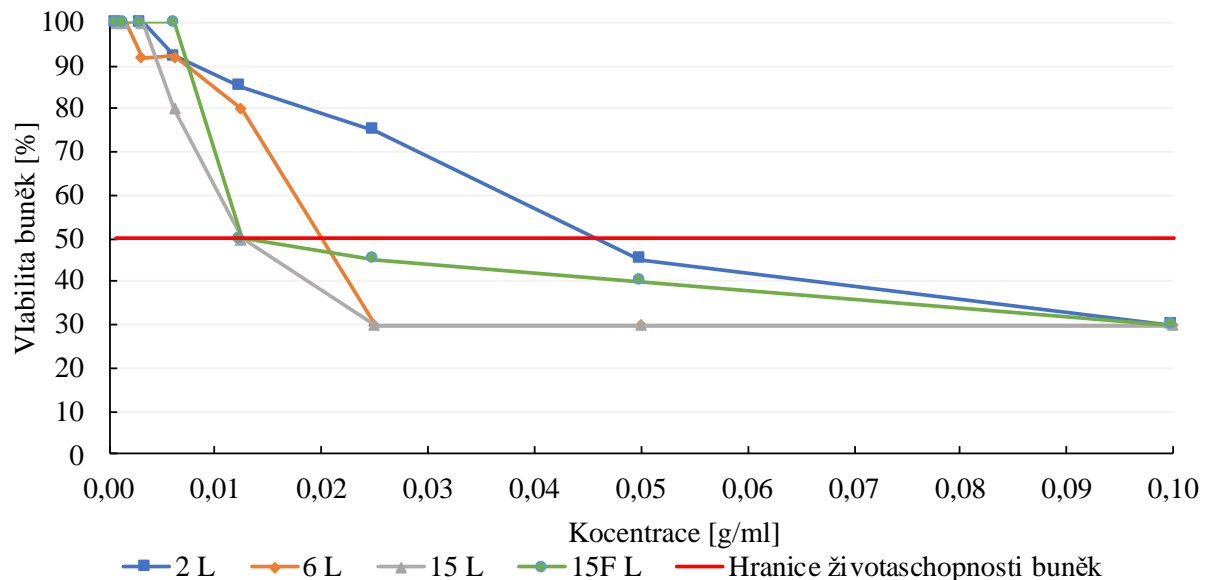
Graf 17: Složení mastných kyselin uvedeno v procentuálním zastoupení. F značí kultivaci ve fermentoru, ostatní kultivace byly provedeny v Erlenmeyerových baňkách.

5.1.7 MTT test

MTT tetrazoliový test je test pro zjištění metabolické aktivity živých buněk. Test je založen na enzymatické redukci slabě zbarvené tetrazoliové soli na formazan, který má intenzivně fialovou až modrou barvu. Pro tyto zbarvení lze změřit absorbanci pomocí spektrofotometru ELISA. Získaná absorbance by měla být přímo úměrná počtu živých buněk za správných podmínek [38].

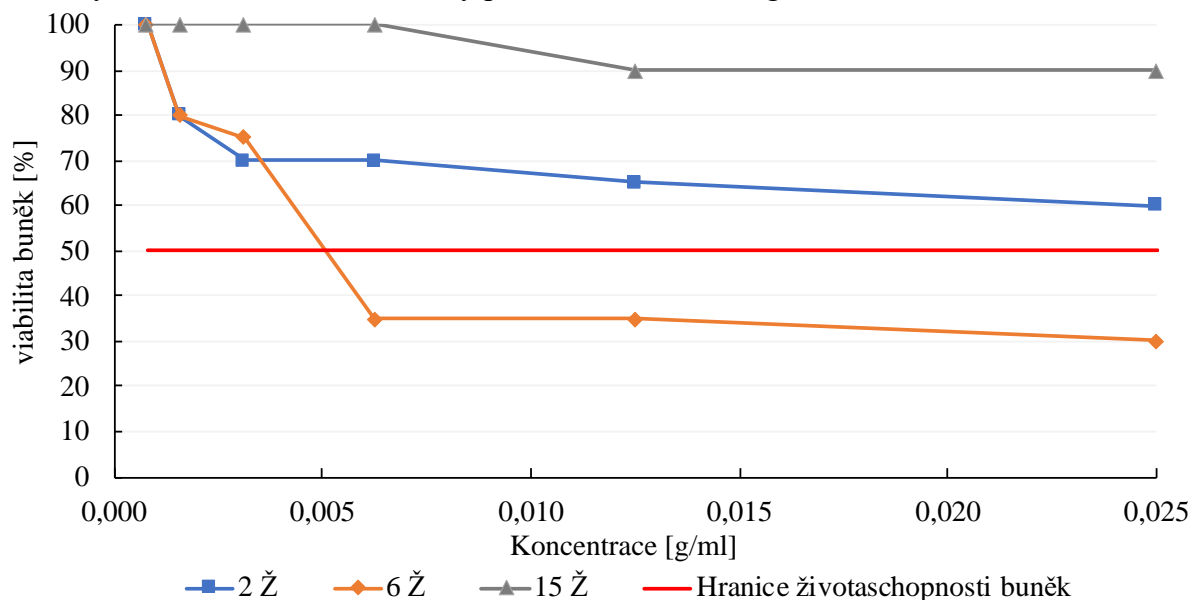
Při MTT testu byla testována živá, mrtvá a lyofilizovaná biomasa. Biomasa byla takto upravená, aby mohlo být zjištěno, která z úprav má nejlepší cytotoxické účinky na myších melanomních buňkách. Jako blank byly použity buňky bez extraktu biomasy. Testování probíhalo na myších melanomních buňkách B16F1 na 11 pasáži. Některé z pozorovaných vzorků vykazovaly cytotoxicitu při určité koncentraci.

Stanovované vzorky vykazovaly cytotoxicitu u všech vzorků lyofilizované biomasy s koncentrací nad 0,025 g/ml. Nejvyšší cytotoxicitu vykazovala lyofilizovaná kvasinka *Rhodotorula kratochvilovae* a *Cystofilobasidium infirmominiatum*, které vykazovaly viabilitu až 30 %, tedy inhibici 70 %, i při koncentraci 0,025 g/ml. Hodnoty viability buněk pro lyofilizovanou biomasu nalezneme v grafu 18.



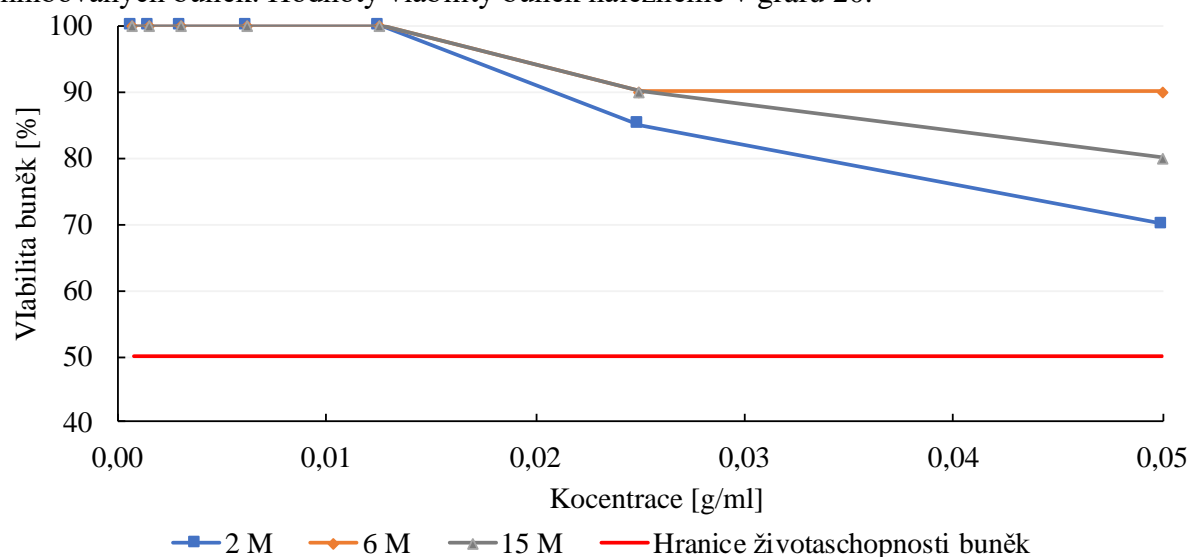
Graf 18: Závislost viability buněk na koncentraci vzorku. Viabilita buněk je uvedena v % a značí kolik procent buněk zůstane živých při určité koncentraci vzorku. Viabilita buněk byla sledována u lyofilizované biomasy: 2 – *Metschnikowia pulcherrima*, 6 – *Cystofilobasidium infirmominiatum*, 15 – *Rhodotorula kratochvilovae*, 15F – *Rhodotorula kratochvilovae* kultivována ve fermentoru.

V grafu 19 byl zaznamenán inhibiční účinek vzorků živé biomasy u kvasinek *Metschnikowia pulcherrima* a u kvasinek *Cystofilobasidium infirmominiatum*. U kvasinky *Metschnikowia pulcherrima*, dosahovala inhibice buněk 40 % při koncentraci 0,025 g/ml. Cytotoxicity dosahovat vzorek živé biomasy kvasinky *Cystofilobasidium infirmominiatum*, jejíž inhibiční účinek na buňkách byl 65 % při koncentraci 0,006 g/ml. Nejvyšší inhibice buněk 70 % (viability 30 %) bylo dosaženo u této kvasinky při koncentraci 0,025 g/ml.



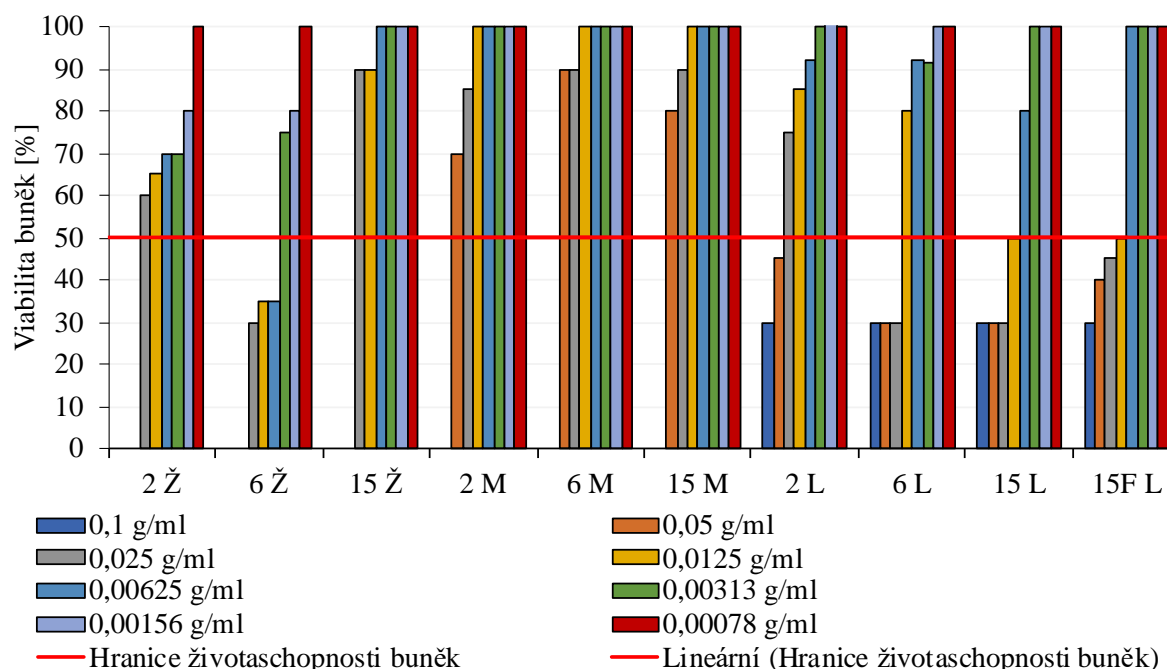
Graf 19: Závislost viability buněk na koncentraci vzorku. Viabilita buněk je uvedena v % a značí kolik procent buněk zůstane živých při určité koncentraci vzorku. Viabilita buněk byla sledována u živé biomasy: 2 – *Metschnikowia pulcherrima*, 6 – *Cystofilobasidium infirmominiatum*, 15 – *Rhodotorula kratochvilovae*.

U mrtvé biomasy bylo detekována výrazně nižší inhibice buněk. Maximální inhibice buněk byla detekována u kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* při koncentraci 0,05 g/ml a to 30 % inhibovaných buněk. Hodnoty viability buněk nalezneme v grafu 20.



Graf 20: Závislost viability buněk na koncentraci vzorku. Viabilita buněk je uvedena v % a značí kolik procent buněk zůstane živých při určité koncentraci vzorku. Viabilita buněk byla sledována u mrtvé biomasy: 2 – *Metschnikowia pulcherrima*, 6 – *Cystofilobasidium infirmominiatum*, 15 – *Rhodotorula kratochvilovae*.

V celkovém grafu 21 můžeme vidět, že výrazně vyšší cytotoxicitu dosahovala živá a lyofilizovaná biomasa. Naopak mrtvá biomasa, která se upravila povařením, vykazovala výrazně nižší cytotoxicitu. Při maximální koncentraci u mrtvé biomasy 0,05 g/ml, dosahovala nejvyšší cytotoxicity kvasinka *Metschnikowia pulcherrima*, která inhibovala 30 % myších nádorových buněk (živých zůstalo 70 %). Druhou nejvyšší cytotoxicitu vykazovaly kvasinky upravené lyofilizací, kde u kvasinek *Rhodotorula kratochvilovae* začala viabilita buněk výrazně klesat při koncentraci 0,0125 g/ml a nejvyšší cytotoxicity inhibice 70 % myších nádorových buněk dosahovaly všechny vzorky při koncentraci 0,1 g/ml. Ovšem první kvasinky, které této cytotoxicity dosáhly byly kvasinky *Cystofilobasidium infirmominiatum* a *Rhodotorula kratochvilovae* (kultivována v Erlenmeyerové baňce) již při koncentraci 0,025 g/ml. U živé biomasy můžeme vidět, že nejvyšší cytotoxicity dosahuje kvasinka *Cystofilobasidium infirmominiatum*, které se výrazně zvyšuje cytotoxicita na 65 % mrtvých buněk při koncentraci 0,00625 g/ml a nejnižší koncentrace živých buněk 30 % dosahuje při koncentraci 0,025 g/ml.



Graf 21: Celkový graf závislosti celkové viability buněk na koncentraci vzorků. Viabilita buněk je uvedena v % a značí kolik procent buněk zůstane živých při určité koncentraci vzorku. Celkový graf viability buněk, kde byla viabilita sledována na u vzorků biomasy: Ž – živá biomasa, M – mrtvá biomasa, L – lyofilizovaná biomasa, 2 – *Metschnikowia pulcherrima*, 6 – *Cystofilobasidium infirmominiatum*, 15 – *Rhodotorula kratochvilovae*, 15F – *Rhodotorula kratochvilovae* kultivována ve fermentoru.

5.2 Stanovení vyizolovaných směsí glukanů

Navážka pro každý izolační postup byla 20 g lyofilizované kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* kultivované ve fermentoru, z této navážky byly izolovány β -glukany pomocí dvou optimalizovaných izolačních postupů. Z I. postupu izolace bylo vytěženo 3,44 g směsi glukanů a jiných sacharidů z 20 g biomasy. Výtěžek I. postupu izolace po proteolýze byl 2,15 g směsi glukanů a jiných sacharidů z 20 g biomasy.

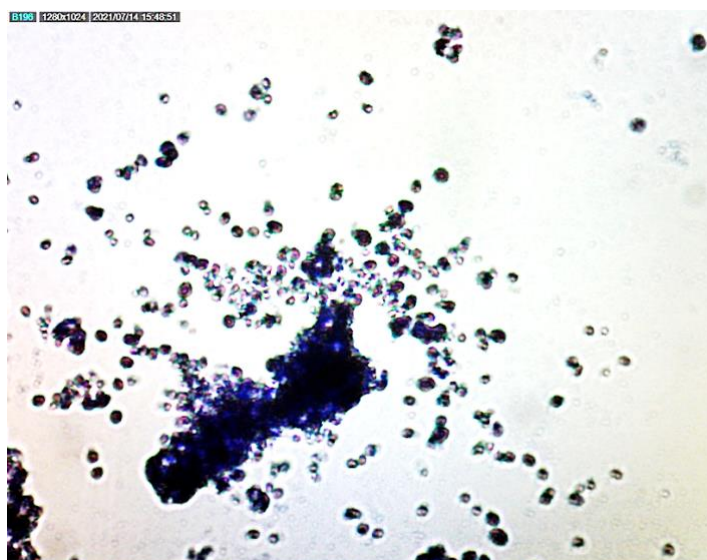
Z II. postupu izolace bylo vytěženo 2,98 g směsi glukanů a jiných sacharidů z 20 g biomasy. Výtěžek II. postupu izolace po proteolýze byl 2,92 g směsi glukanů a jiných sacharidů z 20 g biomasy.

Tabulka 12: výtěžnost jednotlivých postupů izolací glukanů.

	Před proteolýzou		Po proteolýze	
	Výtěžek (g)	% výtěžnost izolace	Výtěžek (g)	% výtěžnost izolace
I. postup	3,44	17,21	2,15	10,74
II. postup	2,98	14,90	2,92	14,60

5.2.1 Gramovo barvení

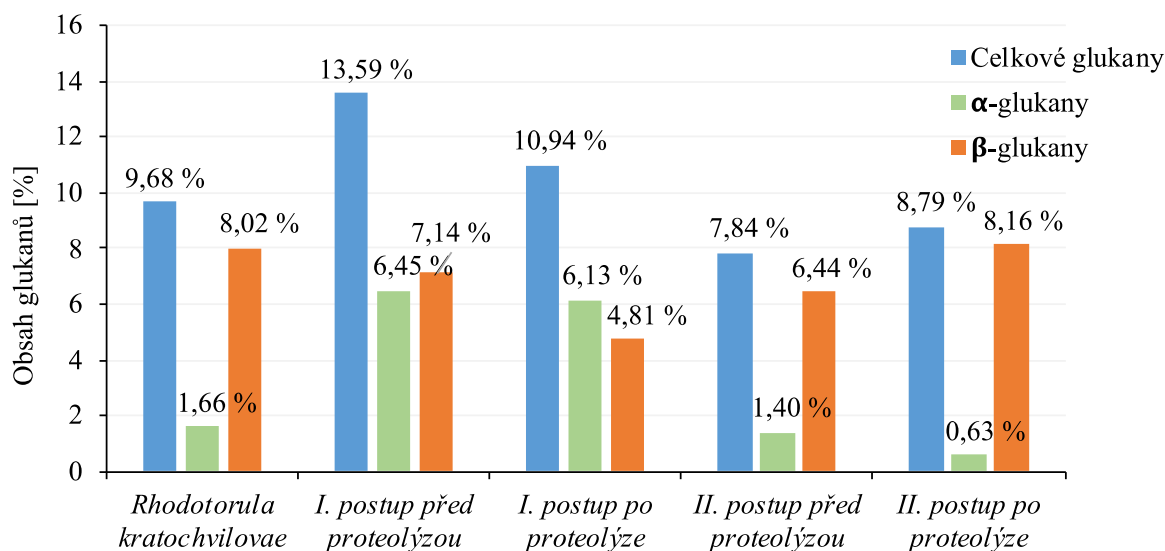
Toto kontrolní stanovení nám ukázalo, kolik buněk se homogenizací rozbilo a kolik jich zůstalo neporušených. Po homogenizaci ultrazvukem bylo zjištěno, že zhruba 50 % buněk je stále neporušených. Proto by bylo vhodné pro další experimenty zvolit účinnější a agresivnější formu na rozrušení buněk. Gramovo barvení bylo provedeno u 1. postupu izolace glukanů v kroku homogenizace.



Obrázek 2: Gramovo barvení 80 x zvětšeno. Po mikroskopem bylo vidět růžově zbarvené rozbité buňky kvasinek a neporušené buňky kvasinek měly fialovou barvu.

5.2.2 Stanovení glukánů enzymatickým kitem

Pomocí enzymatického kitu bylo stanoveno množství β -glukanů ve vyizolovaných vzorcích. Nejvíce vyizolovaných β -glukanů bylo stanoveno u postupu II. v kombinaci s proteolýzou, kde hodnota dosahovala 8,16 %. V grafu 22 je obsažený i srovnávací vzorek lyofilizované biomasy *Rhodotorula kratochvilovae*, u které se za pomoci izolačního postupu při enzymatickém stanovení kitem povedlo vyizolovat 8,02 %. V případě vyizolované směsi β -glukanů a jiných cukrů se předpokládá vyšší aktivita u této směsi než u β -glukanů obsažených v buněčné stěně kvasinek.



Graf 22: Obsah glukánů ve vzorcích vyizolovaných glukánů. První vzorek je kontrolní, jedná se o původní biomasu. Zbylé 4 vzorky jsou vyizolované glukany z I. a II postupu.

5.2.3 Stanovení neutrálních sacharidů dle Duboise

Pomocí stanovení neutrálních sacharidů dle Duboise, bylo zjištěno procentuální zastoupení sacharidů ve vyizolovaných vzorcích. Celkové množství sacharidů bylo potřeba zjistit pro charakterizaci testovaných vzorků. Kde nejvyšší množství sacharidů se povedlo vyizolovat u postupu II. před proteolýzou a to 98,60 % sacharidů.

Tabulka 13: Stanovení sacharidů podle Duboise ve vyizolovaných glukanech.

	Procentuální obsah sacharidů [%]
I. postup před proteolýzou	96,54
I. postup po proteolýze	75,55
II. postup před proteolýzou	98,60
II. postup po proteolýze	76,50

Dále se stanovoval obsah sacharidů v odpadních frakcích z organické extrakce. Zde bylo zjištěno, že nejvíce sacharidů se vyizolovalo u postupu I v kroku organické extrakce ve frakci 2, a to 28,05 %. Proto by bylo pro další práce s těmito postupy vhodné zvážit, zda v tomto kroku neupravit směs rozpouštědel. A bylo by pro další experimenty vhodné zjistit o kolik procent β -glukanů v tomto kroku přijdeme.

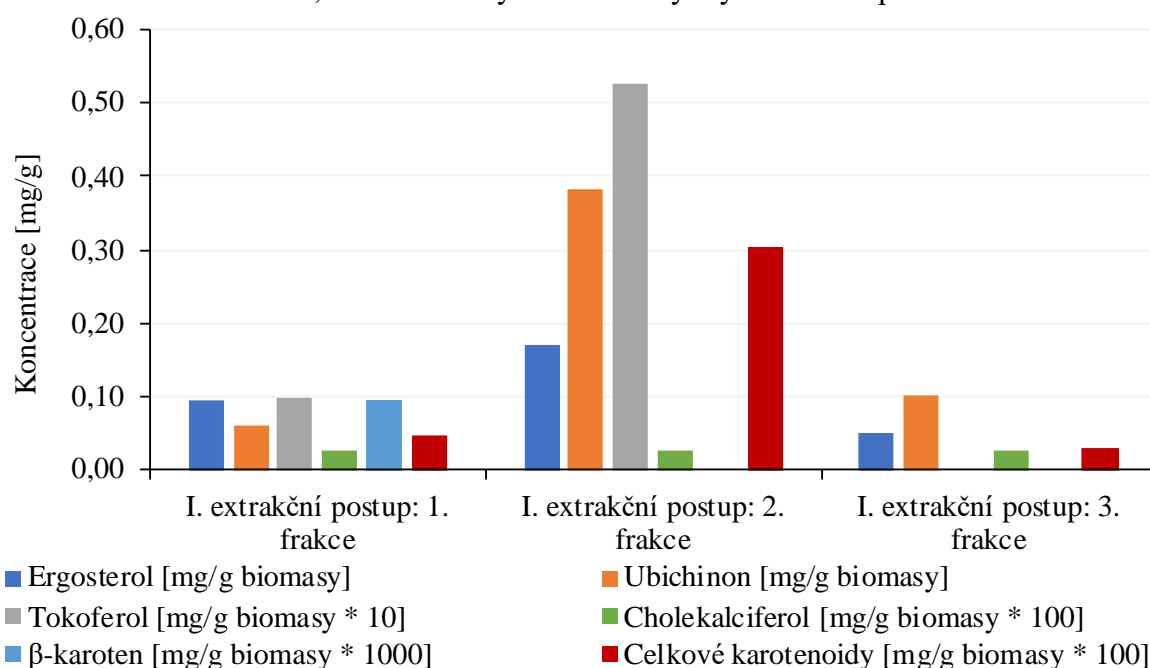
Tabulka 14: Obsah sacharidů ve vyextrahovaných rozpouštědlech po organické extrakci.

	Procentuální obsah sacharidů [%]
I. extrakční postup: 1. frakce	28,05
I. extrakční postup: 2. frakce	2,81
I. extrakční postup: 3. frakce	2,46
II. extrakční postup: 1. frakce	1,05
II. extrakční postup: 2. frakce	3,05
II. extrakční postup: 3. frakce	0,81

5.2.4 Stanovení karotenoidů (HPLC)

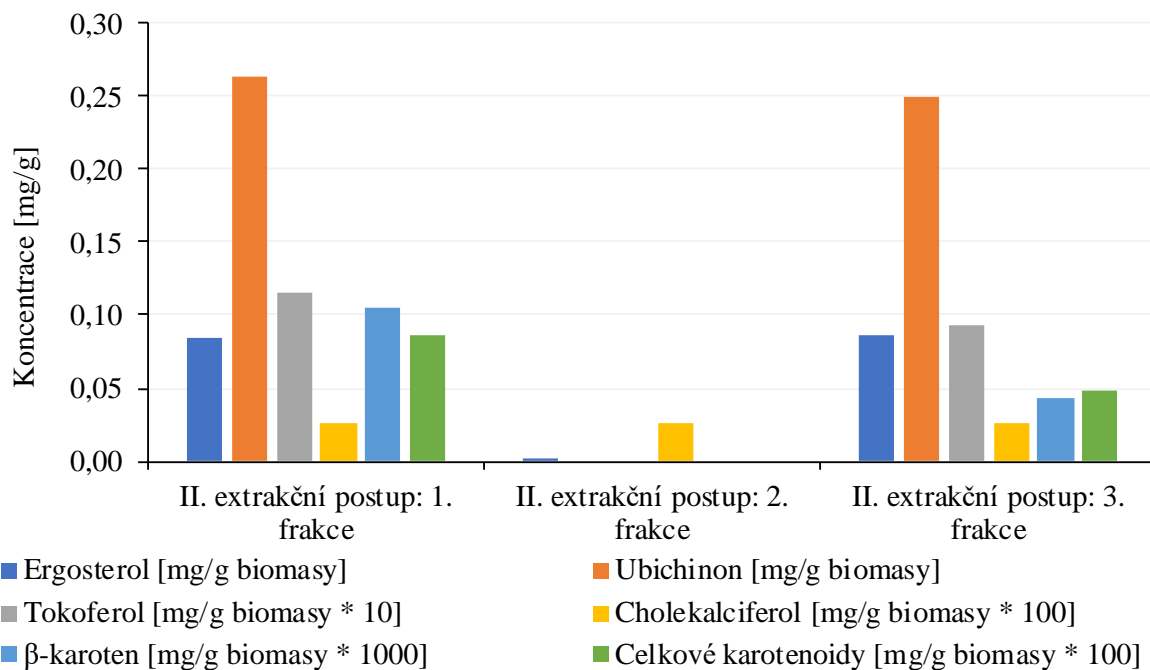
Dále bylo provedeno stanovení karotenoidů ve vzorcích odpadních frakcích po organické extrakci. Díky tomuto stanovení bylo zjištěno, zda by byla možnost odpadní frakce využít jako další zdroje karotenoidů. Ovšem při stanovení bylo zjištěno, že množství karotenoidů ve vzorcích je ve velice zanedbatelném množství, jelikož vzorky obsahují především zdegradované zbytky karotenoidů.

V grafu 23 nalezneme charakterizaci složení lipofilních látek jednotlivých frakcí po organické extrakci v I. postupu izolace. Nejvyšší obsah celkových karotenoidů nalezneme v 2. frakci, jeho hodnota je 0,003 mg/g. Ve frakci 2 a ve frakci 3 nebyl detekován žádný β -karoten, to bylo způsobené nejspíše předchozí izolací ve frakci 1. Ve frakci 3 nebyl detekován žádný tokoferol neboli vitamín E, neboť veškerý vitamín E byl vyizolován v předchozích frakcích.



Graf 23: Obsah lipofilních látek v odpadu po I. extrakčním postupu.

V grafu 24 nalezneme charakterizaci složení lipofilních látek jednotlivých frakcí po organické extrakci v II. postupu izolace. Nejvyšší obsah celkových karotenoidů nalezneme v 1. frakci, jeho hodnota je 0,00086 mg/g. V druhé frakci byl zjištěn ve zbytkovém množství pouze cholekalciferol neboli vitamín D3 a ergosterol, to bylo nejspíše způsobené tím, že ostatní látky se v tomto kroku nevyextrahovali, neboť v předchozím i v následujícím kroku nalezneme všechny látky.

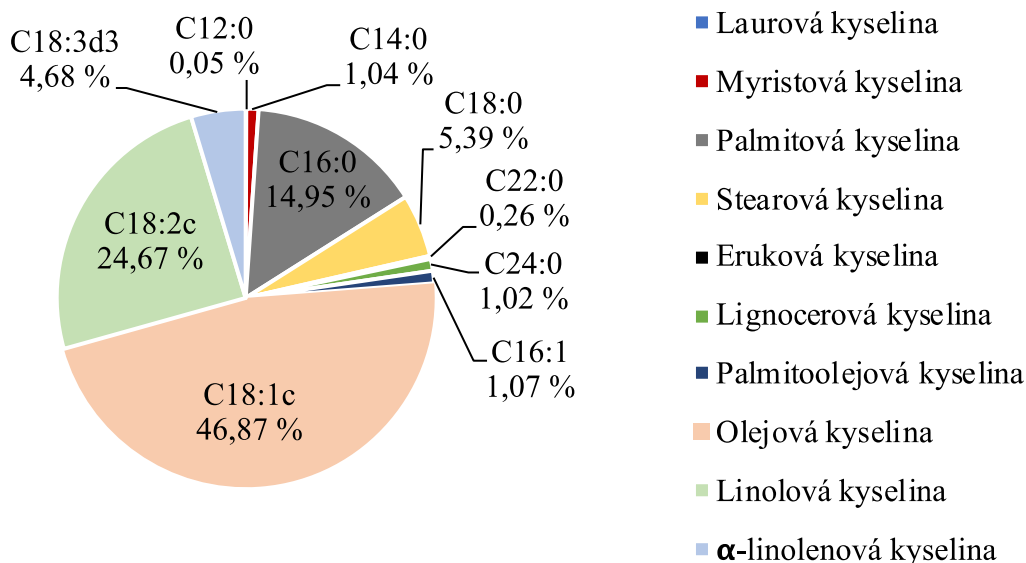


Graf 24: Obsah lipofilních látek v odpadu po II. extrakčním postupu.

5.2.5 Stanovení mastných kyselin (GC)

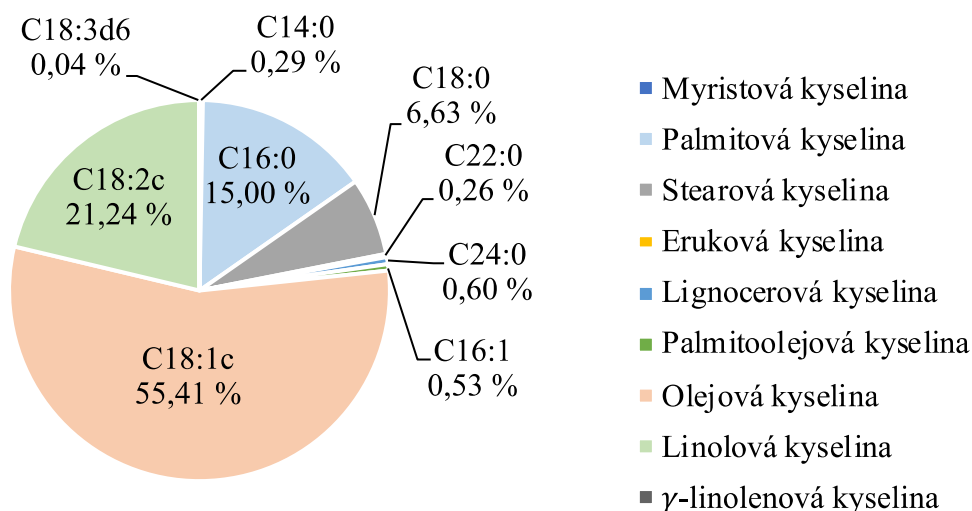
Pro toto stanovení byly použity odpadní frakce z organické extrakce při postupu izolace I a II. Stanovením bylo zjištěno kolik mastných kyselin se dá vyextrahovat z odpadních frakcí. Tato informace je důležitá pro případnou recyklaci odpadních frakcí.

Celkové množství lipidů ve frakci 1 z postupu I bylo 79,69 %. Stanovením bylo identifikováno 10 majoritních mastných kyselin, z nichž nejvyšší zastoupení měla kyselina olejová. Kyselina olejová měla hodnotu procentuálního zastoupení 46,87 %. Hodnoty pro stanovení obsahu mastných kyselin ve frakci 1 nalezneme v grafu 25.



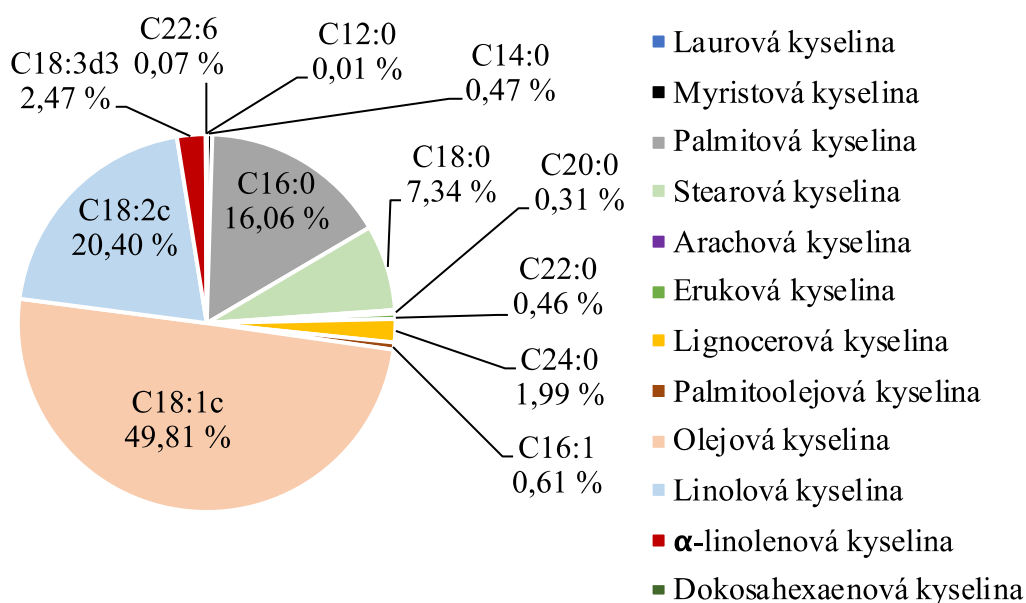
Graf 25: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve frakci 1 po organické extrakci z postupu I.

Zastoupení lipidů ve frakci 2 z postupu I bylo 9,09 %. Stanovením bylo identifikováno 9 majoritních mastných kyselin, z nichž nejvyšší zastoupení měla kyselina olejová. Kyselina olejová měla hodnotu procentuálního zastoupení 55,41 %. Hodnoty pro stanovení obsahu mastných kyselin ve frakci 2 nalezneme v grafu 26.



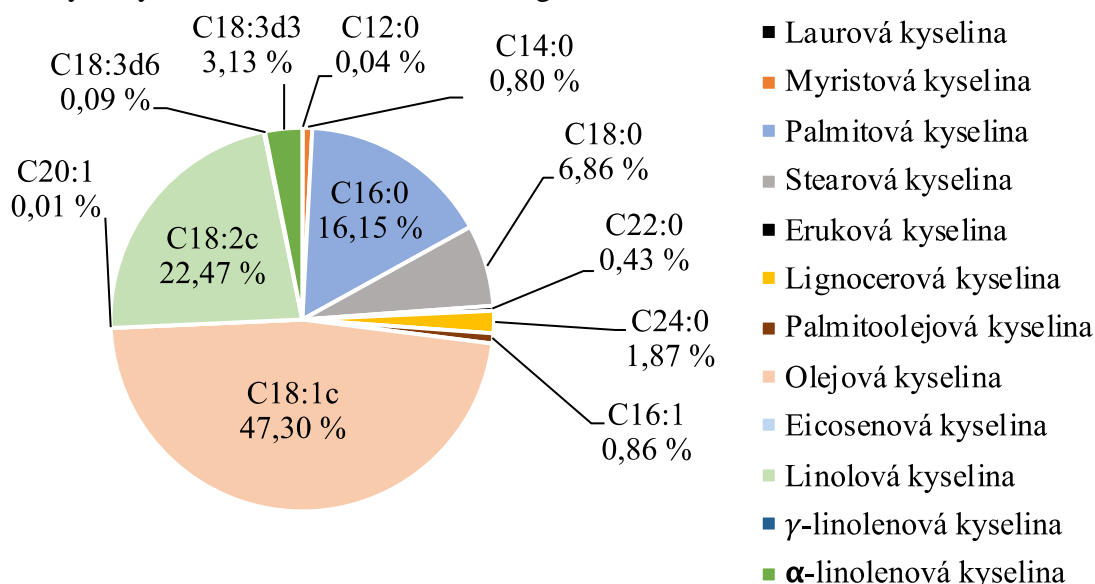
Graf 26: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve frakci 2 po organické extrakci z postupu I.

Stanovením bylo identifikováno 12 majoritních mastných kyselin ve frakci 3 z postupu I, z nichž nejvyšší zastoupení měla kyselina olejová. Kyselina olejová měla hodnotu procentuálního zastoupení 49,81 %. Hodnoty pro stanovení obsahu mastných kyselin ve frakci 3 nalezneme v grafu 27.



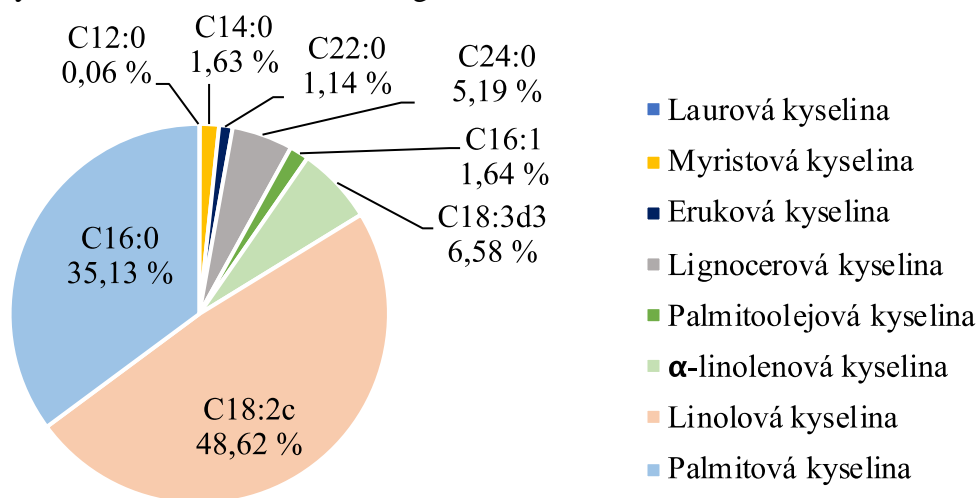
Graf 27: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve frakci 3 po organické extrakci z postupu I.

Zastoupení lipidů ve frakci 1 z postupu II bylo 81,08 %. Stanovením bylo identifikováno 12 majoritních mastných kyselin, z nichž nejvyšší zastoupení měla kyselina olejová. Kyselina olejová měla hodnotu procentuálního zastoupení 47,30 %. Hodnoty pro stanovení obsahu mastných kyselin ve frakci 1 nalezneme v grafu 28.



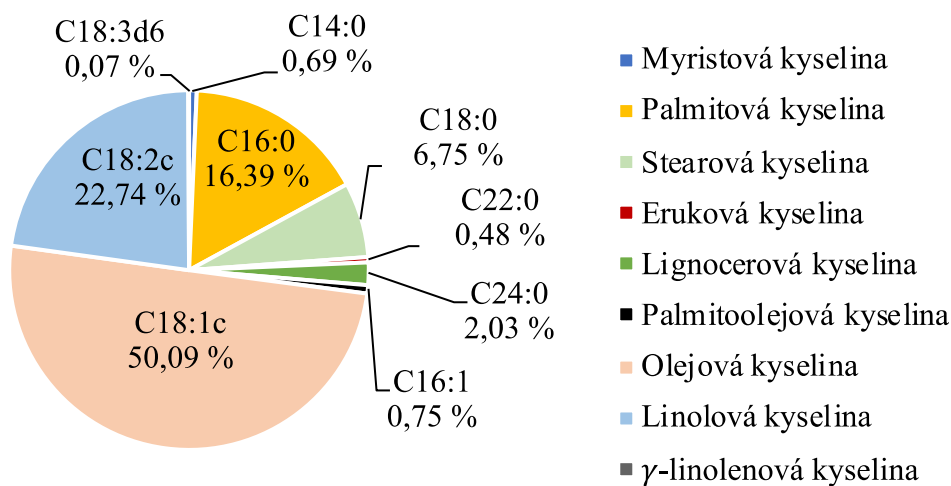
Graf 28: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve frakci 1 po organické extrakci z postupu II.

Zastoupení lipidů ve frakci 2 z postupu II bylo 35,39 %. Stanovením bylo identifikováno 8 majoritních mastných kyselin, z nichž nejvyšší zastoupení měla kyselina linolová. Kyselina linolová měla hodnotu procentuálního zastoupení 48,62 %. Hodnoty pro stanovení obsahu mastných kyselin ve frakci 2 nalezneme v grafu 29.



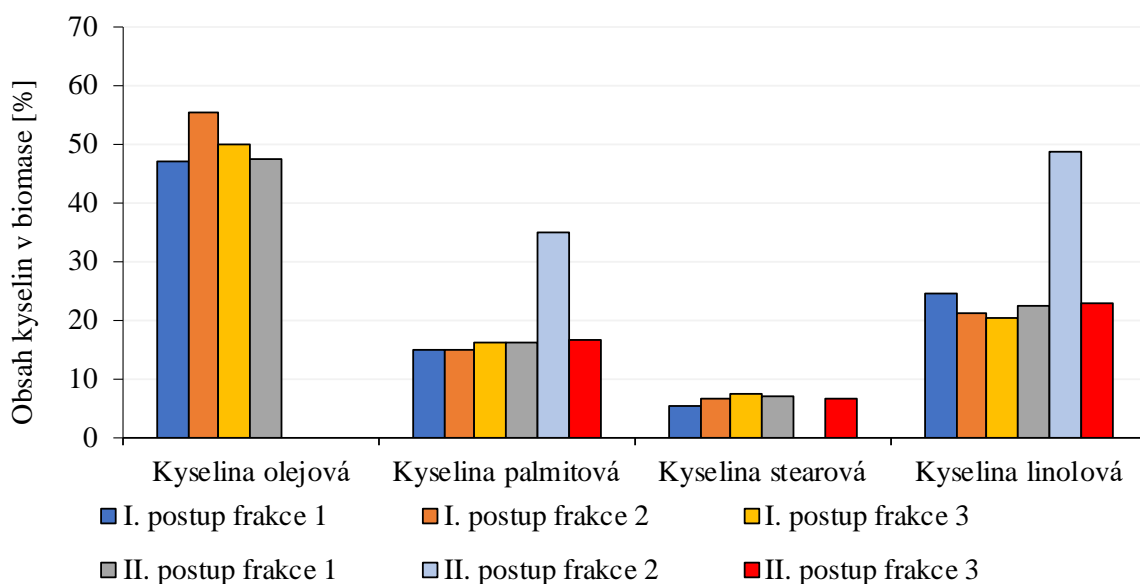
Graf 29: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve frakci 2 po organické extrakci z postupu II.

Zastoupení lipidů ve frakci 3 z postupu II bylo 86,67 %. Stanovením bylo identifikováno 9 majoritních mastných kyselin, z nichž nejvyšší zastoupení měla kyselina olejová. Kyselina olejová měla hodnotu procentuálního zastoupení 50,09 %. Hodnoty pro stanovení obsahu mastných kyselin ve frakci 3 nalezneme v grafu 30.



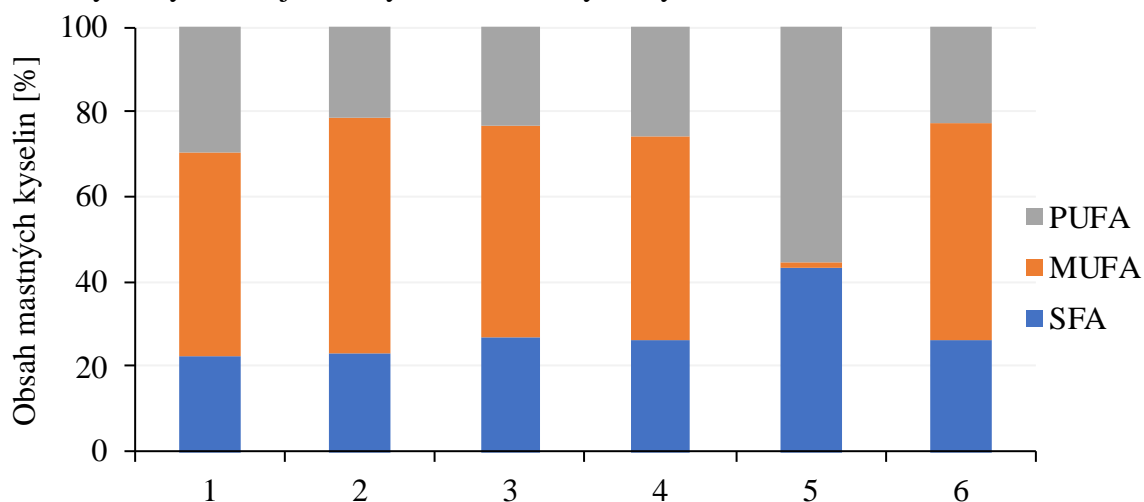
Graf 30: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve frakci 3 po organické extrakci v postupu II.

Celkové zastoupení důležitých mastných kyselin u odpadních frakcí je uvedeno v grafu 31. Bylo zjištěno, nejvyšší zastoupení kyselin olejové bylo ve frakci 2 po organické extrakci v postupu I. Nejvyšší obsah kyseliny palmitové byl u frakce 2 po organické extrakci v postupu II. Nejvyšší zastoupení kyseliny stearové bylo ve frakci 3 po organické extrakci v postupu I. Nejvyšší zastoupení kyseliny linolové bylo ve frakci 2 po organické extrakci v postupu II.



Graf 31: Celkové zastoupení důležitých mastných kyselin v odpadních frakcích.

V grafu 32 nalezneme množství PUFA, MUFA a SFA pro jednotlivé odpadní frakce. Bylo zjištěno, že nejvyšší hodnotu 43,16 % SFA má odpadní frakce 2 po organické extrakci v postupu II. Nejvyšší hodnotu 55,95 % MUFA má odpadní frakce 2 po organické extrakci v postupu I. A nejvyšší hodnotu 55,20 % PUFA má odpadní frakce 2 po organické extrakci v postupu II. PUFA jsou polynenasycené mastné kyseliny, MUFA jsou mononenasycené mastné kyseliny a SFA jsou nasycené mastné kyseliny.



Graf 32: Složení mastných kyselin uvedeno v procentuálním zastoupení. 1 – 1. frakce z postupu I organické extrakce, 2 – 2. frakce z postupu I organické extrakce, 3 – 3. frakce z postupu I organické extrakce, 4 – 1. frakce z postupu II organické extrakce, 5 – 2. frakce z postupu II organické extrakce a 6 – 3. frakce z postupu II organické extrakce.

5.2.6 Stanovení celkových proteinů dle Biureta

Stanovoval se celkový obsah proteinů pro zjištění celkového zastoupení proteinů ve vyizolovaných vzorcích β -glukanů. Bylo zjištěno, že po proteolýze se obsah celkových proteinů ve vzorcích sníží, v postupu I. se sníží o více než polovinu. V druhém postupu se obsah celkových proteinů po proteolýze sníží téměř na polovinu.

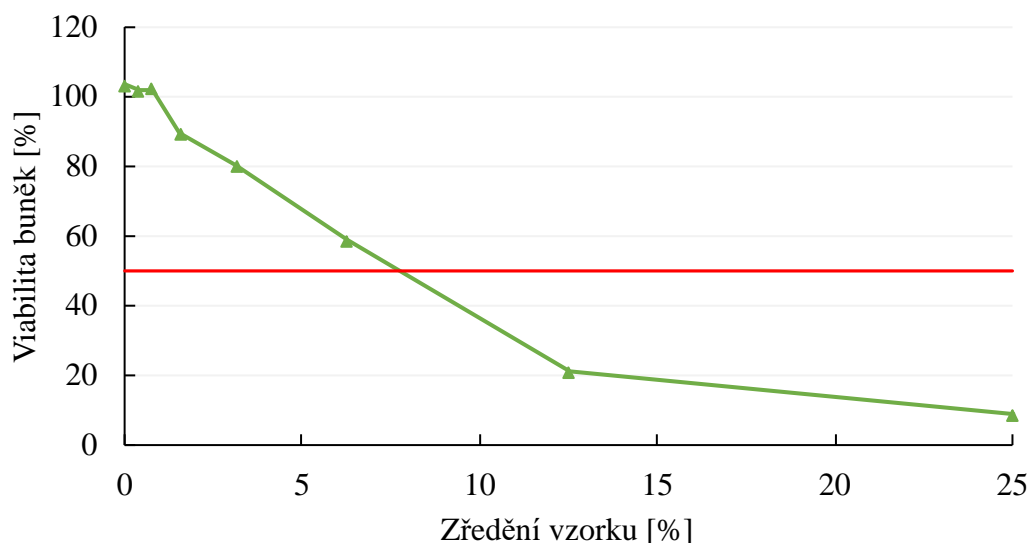
Tabulka 15: Koncentrace celkových proteinů ve vzorcích vyizolovaných glukanů.

	Koncentrace [mg/ml]	% zastoupení
I. postup před proteolýzou	0,086	2,27
I. postup po proteolýze	0,024	0,39
II. postup před proteolýzou	0,093	1,30
II. postup po proteolýze	0,032	0,72

5.2.7 MTT test

MTT tetrazoliový test je test pro zjištění metabolické aktivity živých buněk. Test je založen na enzymatické redukci slabě zbarvené tetrazoliové soli na formazan, který má intenzivně fialovou až modrou barvu. Pro tyto zbarvení lze změřit absorbanci pomocí spektrofotometru ELISA. Získaná absorbance by měla být přímo úměrná počtu živých buněk za správných podmínek [38].

Při MTT testu byl testován vybraný vyizolovaný lyofilizovaný vzorek glukanů. Byly zjišťovány cytotoxické účinky vyizolovaného vzorku na lidských keratinocytích buňkách HaCat. Jako blank byly použity buňky bez extraktu vyizolovaných glukanů. Lyofilizovaný vzorek vykazoval inhibici buněk 80 % při zředění 12,5 %, které odpovídalo koncentraci 0,003125 g/ml. Tato koncentrace je nejnižší zjištěná, která se dá využít v praxi pro inhibici keratinocytích buněk. Ovšem je zapotřebí dalších testů. Bylo by dobré tyto testy ještě podrobně přeměřit při zředění vzorku mezi 6,25 % a 12,5 %, aby bylo možné zjistit koncentraci, při které se inhibujeme přesně 50 % buněk.



Graf 33: Graf výsledků MTT testu. MTT test pro vyizolovaný vzorek glukanů z II. extrakčního postupu po proteolýze. Tento vzorek byl vybrán pro jeho vysoký obsah β -glukanu.

6 ZÁVĚR

Bakalářská práce na téma Testování biologického účinku glukanů na buněčných liniích in vitro se zabývala charakterizací biomasy, a následně izolací a testováním glukanů. Nejdříve byla v této práci charakterizována biomasa vybraných druhů kvasinek *Metschnikowia pulcherrima*, *Cystofilobasidium infirmominatum* a *Rhodotorula kratochvilovae*. Biomasa byla nakultivována v Erlenmeyerových baňkách a jeden vzorek byl nakultivován pro porovnání ve fermentoru. Testovala se biomasa ve třech formách lyofilizovaná, živá a mrtvá biomasa.

Obsah β -glukanů v lyofilizovaných, kvasinkových biomasách se pohyboval od 6,01 % do 11,83 %. Nejvyšší obsah β -glukanů byl stanoven u biomasy kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* a to 11,83 %. Dále byla stanovena antioxidační aktivita, u které bylo zjištěno, že antioxidační aktivita lyofilizované biomasy je výrazně nižší než antioxidační aktivita živé a mrtvé biomasy. U tohoto stanovení se výrazně měnil i poměr účinku mezi jednotlivými druhy kvasinek. U lyofilizované biomasy měla nejvyšší antioxidační efekt jednoznačně kvasinka *Rhodotorula kratochvilovae*. Ale u živé a mrtvé biomasy měla nejvyšší antioxidační aktivitu kvasinka *Cystofilobasidium infirmominatum*. Antioxidační účinek mohl být u kvasinek *Rhodotorula kratochvilovae* a *Cystofilobasidium infirmominatum* ovlivněny přítomností karotenoidů.

Pro optimalizaci izolace β -glukanů byla vybrána fermentovaná, lyofilizovaná biomasa kvasinky *Rhodotorula kratochvilovae* CCY 20-2-26. Tato biomasa byla izolována pomocí dvou optimalizovaných izolačních postupů. První postup byla šetrná izolační metoda, která je šetrná ke konformaci β -glukanů, kde byly buňky rozrušeny pomocí ultrazvukové lázně a dále byl β -glukan z buněčných stěn extrahován směsí rozpouštědel. Část vyizolované směsi byla odebrána a podrobena proteolýze. Druhý izolační postup byl proveden pomocí méně šetrné metody, kdy byly buňky rozrušeny pomocí kyseliny a zásady, a dále byly β -glukany extrahovány směsí rozpouštědel. Část vyizolované směsi byla odebrána a podrobena proteolýze.

Takto vyizolované vzorky byly dále testovány. Vyizolovaná směs glukanů a jiných cukrů se stanovovala podle Duboise, kde bylo zjištěno že obsah sacharidů ve vzorcích se pohybuje od 75,55 % do 98,60 %. Nejvyššího obsah sacharidů ve směsi 98,60 % bylo dosaženo v II. izolačním postupu bez proteolýzy. Toto stanovení nám ukázalo, že převážná většina vzorku je složená, ze sacharidů. Dále bylo určeno složení glukanů pomocí enzymatického kitu. Obsah β -glukanů se ve vyizolovaných vzorcích pohyboval od 4,81 % do 8,16 %. Nejvyššího obsahu β -glukanů bylo dosaženo u II. postupu izolace po proteolýze.

První MTT testy na upravené biomase byly provedeny na myších melanomních buňkách B16F1. Druhé MTT testy vyizolované směsi glukanů a polysacharidů byly provedeny na lidských buněčných liniích HaCaT. Při porovnání MTT testů bylo zjištěno, že u lyofilizovaných vzorků biomasy byla cytotoxicita nad 50 % inhibovaných buněk zjištěna ve všech vzorků s koncentrací nad 0,025 g/ml. Nejvyšší cytotoxicity zde dosahovala *Rhodotorula kratochvilovae* a *Cystofilobasidium infirmominiatum*, které vykazovaly inhibici buněk až 70 % při koncentraci 0,025 g/ml. U vzorků živé biomasy byla zjištěna cytotoxicita u vzorku kvasinky *Cystofilobasidium infirmominiatum*, která vykazovala při koncentraci 0,025 g/ml inhibici buněk 70 %. Cytotoxický účinek, který může být ve farmacii využitelný je již při koncentraci 0,006 g/ml, při které dosahuje inhibice 65 % myších melanomních buněk. Tohoto účinku by mohlo být využito při léčbě rakoviny. U mrtvé (považené) biomasy nedosahoval cytotoxicity žádný vzorek. Viabilita buněk 70 % se pohybovala nejnižší u kvasinky *Metschnikowia pulcherrima* při koncentraci 0,05 g/ml.

Pro MTT test, u vyizolovaných směsí glukanů a polysacharidů, byl vybrán vzorek s nejvyšším zastoupením β -glukanů. Testovaným vzorkem byl vzorek z optimalizovaného postupu izolace II po proteolýze. Vzorek byl testován na lidskou buněčnou keratinocytární linii HaCat. Tento vzorek vykazoval vysokou cytotoxicitu až 80 % inhibovaných buněk při zředění 12,5 %, které odpovídá koncentraci 0,00315 g/ml. Z toho výsledku je patrné, že vyizolovaný vzorek má vyšší inhibiční účinek i při výrazně nižší koncentraci. Pro další práce by bylo dobré zjistit cytotoxické účinky mezi zředěním vyizolovaného vzorku 6,25 % a 12,15 %, aby byla zjištěna konkrétní koncentrace pro 50 % inhibici buněk. Tento inhibiční účinek by mohl být využitelný v praxi při léčbě rakoviny, neboť byl zjištěn inhibiční účinek směsi na lidské kožní nádorové buňky.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Bc. Huong Tra Phan. *Analýza beta-glukanů ve vybraných druzích hub* [online]. Brno, 2018 [cit. 2021-05-29]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=170502. DIPLOMOVÁ PRÁCE. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [2] VÍT, Radek. *Analýza glukanů v rostlinných a mikrobiálních vzorcích*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123916>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ivana Márová.
- [3] ANTONÍN, Vladimír. *Houby jako lék*. Praha: Ottovo nakladatelství, 2013. ISBN 978-80-7451-257-5. Dostupné také z: <https://dnnt.mzk.cz/uuid/uuid:faacfec0-3e86-11e6-ab2f-005056827e52>
- [4] WIEGE, Iva; SLUKOVÁ, Marcela; VACULOVÁ, Kateřina, SKŘIVAN Pavel. *Není beta-glukan jako beta-glukan*. *Výživa a potraviny*. 2018, roč. 73, čís. 1, s. 22–26
- [5] BENCKO, Vladimír, Petr ŠÍMA a Bohumil TUREK. *Imunomodulační účinky betaglukanů*. *Hygiena*. 2016, roč. 16, čís. 4, s. 167–171.
- [6] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [7] NOVÁK, Miroslav. *β-glukany, historie a současnost*. *Chem. Listy*. 2007, roč. 101, s. 872–880.
- [8] SLUKOVÁ, Marcela, Kateřina VACULOVÁ a Pavel SKŘIVAN. *Přehled o beta-glukanech (nejen obilných)*. *Obiloviny v lidské výživě 2017*. 2017, s. 14–21.
- [9] SAMUELSEN, Anne Berit, Jurgen SCHREZENMEIR a Svein H. KNUTSEN. *Effects of orally administered yeast-derived beta-glucans: A review*. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2014, roč. 58, čís. 1, s. 183–193.
- [10] CHARALAMPOPOULOS, D., WANG, R., PANDIELLA, S. S., WEBB, C.: *Application of cereals and cereal components in functional food: a review*. *Int. J. Food Microbiol.*, 79, 2002, s. 131 – 141.
- [11] KARÁCSONYI, Š., KUNIAK, E.: *Polysaccharides of Pleurotus ostreatus: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β-D-glucan*. *Carbohydrate Polym.*, 24, 1994, s. 107 – 111.
- [12] BOHN, J. A., BeMILLER, J. N.: *(1-3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships*. *Carbohydrate Polym.*, 28, 1995, s. 3 – 14.
- [13] VÍT, Radek. *ANALÝZA A CHARAKTERIZACE BETA-GLUKANŮ Z VYBRANÝCH PŘÍRODNÍCH ZDROJŮ* [online]. Brno, 2018 [cit. 2021-05-29]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=175265. BAKALÁŘSKÁ PRÁCE. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [14] JABLONSKÝ, I. a ŠAŠEK, V. *Pěstování hub ve velkém i v malém*. Praha 1997. ISBN 80-209-0266-5

- [15] FOŘT, P.: *Zdraví a potravní doplňky*. Euromedia Group, Ikar, 1. vydání, Praha 2005, str. 400, ISBN 80-249-0612-0
- [16] VĚTVIČKA, V. *Beta Glukan: tajemství přírody*. Brno: Gynpharma, 2011, 126 s. ISBN 978-80-254-9143-0.
- [17] VALÍČEK, P. *Houby a jejich léčivé účinky*. Benešov: Start, 2011. ISBN 978-80-86231-54-9.
- [18] KRS, V. *Imunostimulační látky v kosmetice*. [online] [cit. 18. 3. 2021], Dostupné také z: <http://www.kosmetologie.cz/>
- [19] SMETANOVÁ, Kateřina. *Beta-glukany* [online]. Brno, 2007 [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/106798/lf_b/Bakprace_Beta-glukany.pdf. Bakalářská práce. MASARYKOVA UNIVERZITA, Lékařská fakulta
- [20] SZOTKOWSKI, Martin, Dana BYRTUSOVA, Andrea HARONIKOVA, Marie VYSOKA, Marek RAPTA, Volha SHAPAVAL a Ivana MAROVA. Study of Metabolic Adaptation of Red Yeasts to Waste Animal Fat Substrate. *Microorganisms*. 2019, 7(11). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7110578
- [21] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [22] KURTZMAN, Cletus a J.W. FELL. *The Yeasts – A Taxonomic Study*. 4. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1998, 1076 s. ISBN 0-444-81312-8.
- [23] ORO, L., M. CIANI a F. COMITINI. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2014, 116(5), 1209-1217 [cit. 2021-6-23]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.12446
- [24] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ A.: *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*, Alfa Bratislava, 1990
- [25] MANNAZZU, Ilaria, Sara LANDOLFO, Teresa Lopes DA SILVA a Pietro BUZZINI. *Red yeasts and carotenoid production: outlining a future for non-conventional yeasts of biotechnological interest*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2015, 31(11), 1665-1673 [cit. 2020-11-25]. DOI: 10.1007/s11274-015-1927-x. ISSN 0959- 3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-015-1927-x>.
- [26] AH YOUNG YOO, MAWADDA ALNAEELI, JAE KWEON PARK. Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01. *Process Biochemistry*. 2016, (51), 463-473.
- [27] GOW N.A., Gadd G.M. *The Growing Fungus*. London: Chapman & Hall, 1995. str. 496. ISBN: 0 412 46600 7.
- [28] WESSELS J.G.H. *Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi*. *New Phytology*. 1993, 123, stránky 397-413.
- [29] KAVANAGH, Kevin. *Fungi* [online]. WILEY, 2005 [cit. 2021-7-2]. ISBN 0-470-86702-7. Dostupné z: <https://www.academia.edu/30129000/Fungi>
- [30] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [31] KOT, A.M., Błażej, S., Gientka, I. et al. *Torulene and torularhodin: “new” fungal carotenoids for industry?*. *Microb Cell Fact* 17, 49 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0893-z>

- [32] *MUSHROOM and YEAST BETA-GLUCAN ASSAY PROCEDURE*. www.megazyme.com [online]. 2021 [cit. 2021-7-2]. Dostupné z: https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-YBGL_DATA.pdf
- [33] PRAKTIKUM Z BIOCHEMIE [online]. 2016 [cit. 2021-8-2]. Dostupné z: https://moodle-archiv-2019-2020.ro.vutbr.cz/pluginfile.php/252878/mod_resource/content/1/Pracovn%C3%AD%20s%20-%20praktikum%20z%20biochemie%20aktualizovan%C3%A9%20n%C3%A1vody.pdf. Ústav chemie potravin a biotechnologií FCH VUT v Brně.
- [34] KLOUDA, Pavel, 2016. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [35] BOKROVÁ, Ing. Jitka. PŘÍPRAVA A VYUŽITÍ VYBRANÝCH BIOPOLYMERŮ, NANOČÁSTIC A NANOVLÁKEN PRO KOSMETICKÉ A POTRAVINÁŘSKÉ ÚČELY [online]. Brno, 2018 [cit. 2020-11-20]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=178299. DIZERTAČNÍ PRÁCE. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Prof. RNDr. Ivana Márová, CSc
- [36] KROLL, Alexandra, Mike H. PILLUKAT, Daniela HAHN a Jürgen SCHNEKENBURGER. *Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2009(Volume 72, 2), 370-377. ISSN 0939-6411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2008.08.009
- [37] MILOVANOVIC, Vladimir, Rajna MINIC, Jelena VAKIC, Sasa IVANOVIC, Vitomir CUPIC, Suncica BOROZAN, Andrijana NESIC a Irena ZIVKOVIC. *MTT based L-aminoacid oxidase activity test for determination of antivenom potency against Vipera ammodytes envenomation*. Toxicon. 2021, 192(4), 57-65. ISSN 00410101. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxicon.2021.01.012
- [38] GRELA, Ewa, Joanna KOZŁOWSKA, Agnieszka GRABOWIECKA a H LIU. *Current methodology of MTT assay in bacteria – A review*. Acta Histochemica. 2018, 120(4), 303-311. ISSN 00651281. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2018.03.007
- [39] CHAMBERS, A. F., E. E. SCHMIDT, I. C. MACDONALD, V. L. MORRIS a A. C. GROOM. *Early Steps in Hematogenous Metastasis of B16F1 Melanoma Cells in Chick Embryos Studied by High-Resolution Intravital Videomicroscopy*. JNCI Journal of the National Cancer Institute [online]. 1992, 84(10), 797-803 [cit. 2021-7-3]. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/84.10.797
- [40] LIU, X, Q WANG, S CUI a H LIU. *A new isolation method of β -d-glucans from spent yeast Saccharomyces cerevisiae*. Food Hydrocolloids. 2008, 22(2), 239-247. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2006.11.008
- [41] ZOHRI, Abdel Naser A., Hani MOUBASHER, Hanfy M. ABDEL-HAY a Mohamed A. I. ORBAN. *Biotechnological β -glucan Production from Returned Baker's Yeast and Yeast Remaining after Ethanol Fermentation*. Egyptian Sugar Journal [online]. 2019(Vol. 13), 29-43 [cit. 2021-7-1]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/337317580>
- [42] ŠEDÝ, M. *Antioxidační aktivita extraktů zeleného čaje*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 34 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Mária Veselá, Ph.D.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Substances
NB	Nutrient Broth
LB	Lysogeny Broth
FID	Flame Ionization Detector
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
VIS	Visible light
UV	Ultraviolet radiation
SFA	Nasyčené mastné kyseliny
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny
MUFA	Mononenasyčené mastné kyseliny
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
PBS	Phosphate Buffer Solution
YPD	Yeast Extract-Pepton-Dextrose
pH	Vodíkový exponent
SDS	Sodium dodecyl sulfate
C_m	Koncentrace mobilní fáze
C_s	Koncentrace stacionární fáze
K_D	Distribuční konstanta
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromi
A	Absorbance
ϵ	Molární absorpční koeficient
c	Molární koncentrace
l	Tloušťka kyvety