

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

STUDIUM BIOTECHNOLOGICKY VÝZNAMNÝCH  
MIKROORGANISMŮ POMOCÍ RAMANOVY  
SPEKTROFOTOMETRIE

RAMAN SPECTROSCOPY AS A TOOL FOR ANALYSIS OF BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT  
MICROORGANISMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Linda Záhorská

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr.Ota Samek, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1076/2016  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: Bc. Linda Záhorská  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: Mgr. Ota Samek, Ph.D.  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Studium biotechnologicky významných mikroorganismů pomocí Ramanovy spektrofotometrie

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše
2. Studium vybraných mikroorganismů pomocí Ramanovy spektroskopie
3. Vyhodnocení experimentálních výsledků

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

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

-----  
Bc. Linda Záhorská  
student(ka)

-----  
Mgr. Ota Samek, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Diplomová práca sa zaoberá štúdiom biotechnologicky významných mikroorganizmov pomocou Ramanovej spektroskopie. Obsahom teoretickej časti je stručná charakteristika Ramanovej spektroskopie ako metódy, jej využitie v praxi a tiež jej využite ako nástroja pre monitoring biotechnologických procesov. Práca bola ďalej zameraná na biotechnologicky významný mikroorganizmus *Aureobasidium pullulans*, jeho využitie v biotechnológiách a tiež na prehľad ním produkovaných látok, a to najmä kyseliny poly-L-jablčnej a pullulánu.

Náplňou experimentálnej časti práce bolo štúdium vybraných kmeňov *A. pullulans*, a to kmeňa DSMZ, kmeňa CCM F148 a kmeňa CCM 8182, pomocou Ramanovej spektroskopie na rôznych typoch kultivačných médií. Predmetom výskumu experimentálnej časti bola tiež produkcia extracelulárnych polymérov, kyseliny poly-L-jablčnej a pullulánu pomocou vybraných kmeňov *A. pullulans*. Cieľom práce bolo popísať a určiť spektrá jednotlivých kmeňov ako aj extracelulárnych produktov, predovšetkým pullulánu, vybrať vhodné produkčné médium, a najvhodnejší produkčný kmeň *A. pullulans*.

Počas experimentálnej práce bolo zistené, že najvhodnejším produkčným kmeňom bol kmeň DSMZ kultivovaný na minerálnom médiu s prídavkom kvasničného autolyzátu, ktoré bolo tiež najvhodnejším typom média. Obsah naprodukovaného pullulánu bol pri gravimetrickom stanovení 6,3 g/L, čo potvrdili aj výsledky metódy HPLC. Experimentálne bolo zistené však aj to, že Ramanova spektroskopia ako metóda, nie je vhodná na kvantifikáciu extracelulárnych produktov, avšak je vhodná a tiež bola využitá na PCA analýzu jednotlivých kmeňov.

## KLÚČOVÉ SLOVÁ

Ramanova spektroskopia, *Aureobasidium pullulans*, pullulán

## **ABSTRACT**

The diploma thesis deals with the study of biotechnologically significant microorganisms, using the Raman spectroscopy. Content of the theoretical part is brief characteristic of Raman spectroscopy as a method, its use in practice and also use as a tool for monitoring of biotechnologically processes. Thesis was further focus on the biotechnologically significant microorganism *Aureobasidium pullulans*, its use in biotechnology and also for over-produced substances and in particular poly-L-maleic acid and pullulan.

The content of the experimental part was study of selected strains *A. pullulans*, specifically stains as DSMZ, CCM F148 and CCM 8182, using Raman spectroscopy on the various types of culture media. Subject of practical part research was too production of extracellular polymers, acid poly-L-apple and pullulan, by selected strains *A. pullulans*. Objective of my thesis was described and determinate, spectra of individual strains as well as extracellular products, mainly pullulan, and then choose suitable production medium and optimal production strain *A. pullulans*.

During experimental work was found, that optimal production strain was DSMZ strain culture on the mineral medium with the addition of yeast autolysate, which was optimal medium type. The content of the pullulan produced was for gravimetric determination, 6,3g/L, which also confirmed the results of the HPLC method. It was experimentally found, that Raman spectroscopy isn't suitable method for quantification of extracellular products, but is appropriate and was used for PCA analysis of individual strains.

## **KEYWORDS**

Raman spectroscopy, *Aureobasidium pullulans*, pullulan

ZÁHORSKÁ, L. *Studium biotechnologicky významných mikroorganismů pomocí Ramanovy spektrofotometrie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 64 s.  
Vedúci diplomovej práce Mgr.Ota Samek, Ph.D.

## **PREHLÁSENIE**

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

.....  
podpis študenta

## **POĎAKOVANIE**

Touto cestou by som sa chcela poďakovať vedúcemu diplomovej práce Mgr.Otu Samkovi, Ph.D. za účinnú metodickú, pedagogickú a odbornú pomoc a ďalšie cenné rady pri spracovávaní mojej diplomovej práce a taktiež Ústavu prístrojovej techniky AV v Brne, za možnosť spracovávanía experimentálnej časti v ich priestoroch. Ďalej by som sa chcela poďakovať doc. Ing. Stanislavovi Obručovi, Ph.D. za konzultácie, cenné rady a pomoc pri písaní práce. V neposlednej rade by som rada poďakovala Ing. Pavle Benešovej za praktické rady a pomoc pri práci v laboratóriu. Vďaka patrí aj mojej rodine za podporu a ústretovosť počas celej doby štúdia.

## OBSAH

ABSTRAKT .....	3
KLÚČOVÉ SLOVÁ .....	3
ABSTRACT .....	4
KEYWORDS .....	4
Obsah.....	6
Úvod.....	8
Teoretická časť .....	9
1.1    Vibračná molekulová spektroskopia .....	9
1.1.1    Vibrácie a rotácia molekúl .....	9
1.2    Ramanova spektroskopia .....	10
1.2.1    História .....	10
1.2.2    Princíp metódy .....	11
1.2.3    Inštrumentácia .....	13
1.2.4    Interpretácia a vyhodnotenie spektier .....	17
1.3    Aplikácia metódy.....	17
1.3.1    Ramanova spektroskopia biologických vzoriek.....	18
1.3.2    Využitie Ramanovej spektroskopie ako nástroja pre monitoring biotechnologických procesov.....	18
1.4    Kvasinka <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	20
1.4.1    Morfologické znaky .....	21
1.4.2    Biotechnologický význam.....	22
1.4.3    Produkcia extracelulárnych polymérov (ECP).....	22
1.4.3.1    Polyester poly-L-jablčnej kyseliny (PMLA) .....	22
1.4.3.2    Pullulán .....	24
2    Experimentálna časť .....	26
2.1    Použité kmene mikroorganizmov, chemikálie a prístroje .....	26
2.1.1    Kmeň <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	26
2.1.2    Chemikálie .....	26
2.1.3    Prístroje .....	26
2.2    Kultivácia <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	28
2.2.1    Tuhé médium.....	28
2.2.2    Tekuté médium.....	28
2.2.3    Stanovenie rastovej krivky .....	29
2.3    Analýza biomasy a produkovaných metabolitov.....	29
2.3.1    Gravimetrické stanovenie obsahu sušiny .....	29
2.3.2    Stanovenie celkových sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny.....	30

2.4	Stanovenie obsahu extracelulárnych polymérov .....	30
2.4.1	Precipitácia a gravimetrické stanovenie obsahu extracelulárnych polymérov...	30
2.4.2	Úprava vzorky .....	30
2.4.3	Stanovenie obsahu glukózy a ECP metódou HPLC.....	31
2.5	Experimentálne podmienky Ramanovho spektrometra pri výskume <i>A. pullulans</i> ...	31
2.6	PCA analýza .....	31
3	Výsledky a diskusia .....	32
3.1	Spektrá štandardov .....	32
3.2	Kultivácia <i>A. pullulans</i> na tuhých médiách .....	35
3.2.1	Pevné YPD médium .....	35
3.2.2	Pevné minerálne médium s prídavkom kvasničného autolyzátu .....	36
3.2.3	Pevné minerálne médium .....	37
3.3	Kultivácia <i>A. pullulans</i> v kvapalných médiách .....	38
3.3.1	Stanovenie rastovej krivky pomocou <i>A. pullulans</i> .....	38
3.3.2	Stanovenie rastovej krivky produkcie pullulánu pomocou <i>A. pullulans</i> .....	40
3.4	Stanovenie celkových sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny .....	41
3.5	Stanovenie obsahu glukózy a ECP pomocou HPLC .....	42
3.6	Submerzná kultivácia pre meranie na Ramanovom spektrometri .....	44
3.6.1	Submerzná kultivácia <i>A. pullulans</i> pre produkciu kyseliny poly-L-jablčnej .....	44
3.6.2	Submerzná kultivácia <i>A. pullulans</i> pre produkciu pullulánu .....	46
3.7	PCA analýza .....	50
4	Záver .....	53
5	zoznam použitých zdrojov .....	55
6	Zoznam obrázkov.....	62
7	zoznam použitých skratiek a symbolov .....	64

## ÚVOD

Ramanova spektroskopia je analytická spektroskopická metóda, ktorá sa bežne využíva pri analýze pevných látok, kvapalín, plynov, tiež pri analýze povrchov a hlavne v neposlednej rade aj pri analýze biologických systémov. Táto metóda svoje uplatnenie nachádza v rôznych odvetviach priemyslu ako je chemický či farmaceutický priemysel, taktiež má uplatnenie v geochemii, lekárstve a biológii. V posledných rokoch sa čoraz častejšie Ramanova spektroskopia využíva pri monitoringu mnohých biotechnologicky významných organizmov, ako sú napríklad riasy, baktérie alebo kvasinky a ich produkty metabolizmu, napríklad lipidy, polyhydroxyalkanoláty a iné. Táto metóda má mimoriadne konkurenčnú pozíciu, ak je in situ, bezkontaktná, neinvazívna a je potrebná rýchla analýza, napríklad on-line analýza v biotechnologických procesoch.

*Aureobasidium pullulans* je priemyselne a biotechnologicky významný kvasinkový mikroorganizmus, ktorý je schopný produkcie mnohých metabolitov, ako sú enzýmy, komplexné bielkoviny a priemyselne významné polyméry. Určité kmene sú schopné produkcie týchto významných polymérov ako sú kyselina poly-L-jablčná a pullulán. Tieto biopolyméry nachádzajú uplatnenie v mnohých potravinárskych, medicínskych či farmaceutických aplikáciách. Pomerne veľkou výhodou extracelulárnych polymérov je, že sú netoxické, nekarcinogénne, biokompatibilné a odbúrateľné. Avšak ešte stále je nevýhodou pri takejto biologickej produkcii polymérov, ale aj iných látok ich cena oproti iným lacnejším spôsobom výroby, napríklad výroba kyseliny poly-L-jablčnej chemickou cestou. Preto je neustále snaha o zníženie nákladov a časovej náročnosti biotechnologických produkcií pomocou mikroorganizmov, na základe čoho bolo predmetom skúmania v tejto práci využívanie práve Ramanovej spektroskopie.



# TEORETICKÁ ČASŤ

## 1.1 Vibračná molekulová spektroskopia

Molekulárne vibrácie poskytujú dva typy spektier. Kvantá infračerveného žiarenia prevádzajú molekulu zo základného vibračného stavu do vyššieho vibračného stavu a ich absorpciou vzniká infračervené spektrum. Kvantá viditeľného, ultrafialového a infračerveného žiarenia poskytujú taktiež výsledky o vibračných hladinách, avšak získavame ich v spektrách neelastického rozptylu svetla, ktorý tiež nazývame Ramanovými spektrami. V praxi je najviac využívanou oblasťou analýzy organických látok oblasť v rozmedzí od 4000 do 666  $\text{cm}^{-1}$ , avšak v poslednej dobe je javený záujem aj o blízku infračervenú oblasť v rozmedzí 14 200 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  a vzdialenú IČ oblasť v rozmedzí 700 – 200  $\text{cm}^{-1}$ . Výhodné je však využitie Ramanovej spektroskopie vo vzdialenej IČ oblasti od 10 do 200  $\text{cm}^{-1}$ , aj keď Ramanovo spektrum je možné využívať v celej oblasti infračerveného spektra, ktoré je má pomerne široké rozpätie, od 10 do 4000  $\text{cm}^{-1}$  [1].

### 1.1.1 Vibrácie a rotácia molekúl

Absorpciou kvanta infračerveného žiarenia prechádza molekula zo základného stavu do niektorého zo vzbuđených vibračných stavov. Takýto prechod je spravidla sprevádzaný excitáciou do niektorého zo stavov rotačných, a navyše v oblasti nízkoenergetického žiarenia niektoré molekuly vykazujú prechody do čisto rotačných stavov, v takomto prípade hovoríme teda o vibračno-rotačnej spektroskopii. Vzhľadom k veľkosti kvanta energie, ktoré je potrebné k excitácii do niektorého zo vzbuđených vibračných stavov, sa nachádza za normálnej teploty väčšina molekúl, ktoré sú v základných vibračných stavoch. K prechodu do stavu vzbuđeného je preto potrebné, aby molekula nadobudla prostredníctvom interakcie zo svetelným žiarením energiu, ktorá zodpovedá rozdielu oboch stavov. Môže sa tak stať buď priamo pri absorpcii IČ žiarenia vzorkou, prostredníctvom infračervenej spektroskopie, alebo prostredníctvom Ramanovho rozptylu, teda Ramanovej spektroskopie [2].

Absorpciou elektromagnetického kvanta môže molekula zvýšiť svoju elektrónovú energiu, kedy je elektrón prevedený z nižšej hladiny na vyššiu; vibračnú energiu, kedy sa zvýši amplitúda vibračného pohybu atómov vo vnútri molekuly; alebo rotačnú energiu, kedy sa zvýši uhlová rýchlosť rotácie molekuly ako celku okolo jej osy. Hladiny energie elektrónov sú od seba veľmi vzdialené, takže k prevedeniu elektrónu na vyššiu hladinu sú potrebné

žiarivé kvantá, s pomerne vysokou energiou, a teda s vysokým kmitočtom. Jedná sa o oblasť vlnových dĺžok v rozmedzí 200 – 1000 nm, a teda jedná sa o oblasť ultrafialového a viditeľného žiarenia. V oblasti infračerveného žiarenia postačuje energia tohto žiarenia k prevedeniu molekuly z nižšieho do vyššieho vibračného stavu. Preto sa infračervená a Ramanova spektroskopia označuje ako spektroskopia vibračná. Rotačné hladiny ležia ešte viac bližšie pri sebe, takže kvantum žiarenia z infračervenej oblasti nemôže vyvolať čisto rotačný prechod [3].

## 1.2 Ramanova spektroskopia

### 1.2.1 História

Indický fyzik Chandrasekhara V. Raman (**Obr. 1**) v roku 1928 objavil a popísal kombinovaný rozptyl žiarenia na hmotných predmetoch, za čo mu bola udelená v roku 1930 Nobelova cena. Tento jav, ktorý sa dodnes označuje ako Ramanov, bol ešte koncom dvadsiatych rokov 20. storočia po prvý krát rakúskymi vedcami v meste Graz použitý k systematickému štúdiu rôznych organických zlúčenín [4].



*Obr. 1 Chandrasekhara V. Raman – indický fyzik [5]*

V roku 1928, kedy C. V. Raman objavil tento jav, bola dostupná len veľmi hrubá inštrumentácia. C. V. Raman použil svetelné žiarenie ako zdroj, ďalekohľad ako zberač lúčov a svoje oči ako detektor. Postupne však dochádzalo k vylepšeniu jednotlivých komponentov Ramanových spektrometrov. Najskôr sa výskum zamerl na vylepšenie excitačného zdroja, boli vyrobené rôzne lampy, ktoré ale boli nepoužiteľné kvôli nízkej intenzite. V roku 1962 sa už začali ako zdroje v Ramanovej spektroskopii využívať lasery. K detekcii Ramanovho javu

sa používali fotocitlivé materiály, až po 2. svetovej vojne sa začali používať prístroje, ktoré fungovali na fotoelektrickom jave. Vývoj optiky pre túto metódu začal až po roku 1960 a zistilo sa, že dvojitý monochromátor odstraňuje rozptýlené svetlo lepšie ako jeden monochromátor. Neskôr bol objavený ešte účinnejší trojitý monochromátor. V roku 1968 boli objavené holografické mriežky. V dnešnej dobe je možné získať Ramanove spektrá tiež pomocou Fourierovej transformácie [6].

### 1.2.2 Princíp metódy

Princípom metódy je meranie rozptýleného žiarenia, ktoré vzniká interakciou monochromatického žiarenia vo viditeľnej až blízkej IČ oblasti s molekulami vzorky za súčasnej zmeny ich vibračných a rotačných stavov [7].

Žiarenie, ktoré dopadá na vzorku, touto vzorkou čiastočne prechádza, z časti je absorbované a z časti rozptyľované. Asi  $10^{-5}$  intenzity žiarenia dopadajúceho na vzorku je rozptyľované, a zhruba 1 % z tohto rozptýleného žiarenia má inú frekvenciu, než žiarenie zo zdroja. Rozptýlené žiarenie o frekvencii, ktorá je zhodná s frekvenciou zdroja sa nazýva Rayleighov rozptyl a rozptýlené žiarenie o frekvencii rozdielnej sa nazýva Ramanov rozptyl, alebo tiež kombinovaný rozptyl. Pre spektroskopiu bolo dôležitým zistením, že frekvencia tohto Ramanovho žiarenia je daná súčtom a rozdielom frekvencie budiaceho žiarenia zo zdroja a frekvencie vibrácií v molekulách vzorky a že podmienkou vzniku Ramanovho žiarenia je to, aby sa pri vibrácii väzby v študovanej molekule menila jej polarizovateľnosť [4].

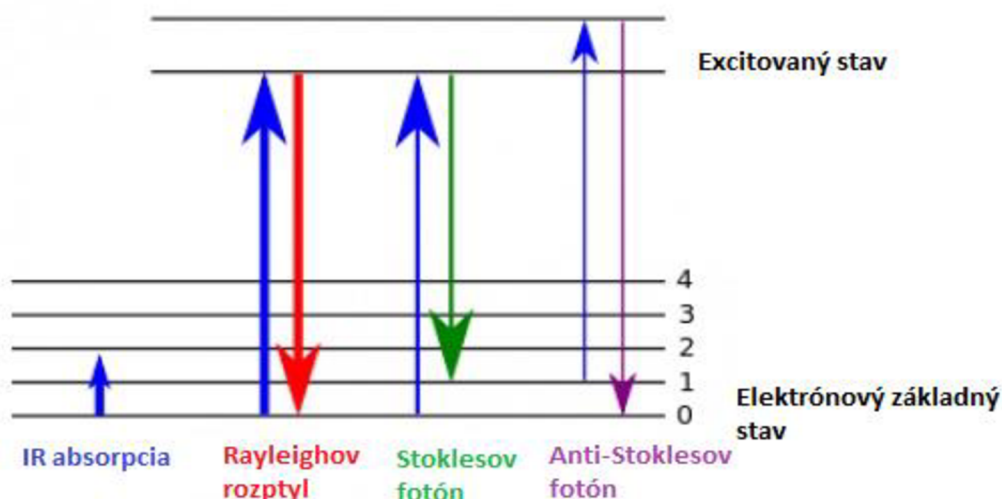
Polarizovateľnosť molekuly je v podstate mierou schopnosti posúvať v molekule náboj pôsobením elektrického poľa a vytvárať indukovaný dipól. Polarizovateľnosť molekuly má úzky vzťah k charakteru molekulových orbitálov. Zmena polarizovateľnosti je spôsobená ich deformáciou [7].

Ramanova spektroskopia je založená na neelastickom rozptyle žiarenia, kedy sa využíva intenzívne viditeľné svetlo, ktorého energia nezodpovedá žiadnemu z excitovaných stavov, spravidla je vyššia než energie vibračných prechodov a nižšia než energia prechodov elektrónových. Pri interakcii tohto žiarenia s molekulou dôjde k absorpcii primárneho fotónu a takmer okamžite žiarivé reemisné sekundárneho fotónu, teda rozptýleného žiarenia. Z krátkodobo excitujúceho virtuálneho prechodového stavu sa molekula vracia buď späť do vibračného základného stavu (Rayleighov rozptyl), alebo do iného vibračného stavu, ktorý je

energeticky blízky pôvodnému základnému stavu. Molekula teda v priebehu Ramanovho rozptylu môže prechádzať iba medzi svojimi vibračnými stavmi. V spektre emitovaného žiarenia potom sledujeme dve série línií na energetickej stupnici symetricky rozložené okolo intenzívnej čiary Rayleighovho rozptylu. Tieto línie nazývame Stokesove a tie, čo sú slabšie nazývame anti-Stokesove línie, ako môžeme vidieť aj na **Obr. 2**. V praxi sa využívajú takmer vždy výhradne Stokesové línie [2].

Anti-Stokesove línie sa využívajú v prípadoch, kedy sa vzorka, ktorá vykazuje žiarenie vyvoláva taktiež fluorescenciu vzorky, ktorá Stokesovu oblasť prekryje [8].

Aj keď Stokesove línie a ich opak, anti-Stokesove línie sú rovnako vzdialené od Rayleighovej línie, ale nemajú rovnakú intenzitu. Aj keď Stokesove a anti-Stokesove línie nesú rovnakú informáciu o frekvencii, obvykle sa zaznamenáva iba silnejšia časť spektra, teda Stokesove línie [9].



**Obr. 2** Ramanov rozptyl [2]

Z teórie Ramanovej spektroskopie vyplýva, že podmienkou aktivity v Ramanovom spektre je zmena polarizovateľnosti molekuly, teda schopnosti elektrických nábojov v molekule posúvať sa vplyvom elektrického poľa, v priebehu vibrácie. Túto schopnosť majú predovšetkým nepolárne časti molekúl, zatiaľ čo polárne sú málo polarizovateľné. Preto sa v Ramanovom spektre prejavujú aj intenzívnymi pásmi predovšetkým vibrácie nepolárnych väzieb, ktorých polarizovateľnosť sa pri vibrácii výrazne mení [10].

Ramanova spektroskopia býva z hľadiska štruktúrnej chemickej analýzy doplnkom infračervenej absorpčnej spektroskopie. Je to kvôli tomu, že Ramanova spektroskopia detekuje vibrácie, pri ktorých nedochádza ku zmene dipólového momentu väzby, a taktiež preto, že dovoľuje zisťovať frekvencie vibrácií molekúl pomocou žiarenia v oblasti viditeľnej alebo ultrafialovej popřípade blízkej infračervenej, čo umožňuje používať jednak prístrojovú optiku z materiálu ako sú sklo alebo kremeň, a taktiež rozpúšťadlá, ktoré by mohli v infračervenej oblasti žiarenia interferovať [4].

Keď je vzorka ožiarená laserovým lúčom a energia fotónov použitého žiarenia nepostačuje na vyvolanie elektrónového prechodu v molekule – nedochádza k jeho absorpcii elektrónovými prechodmi, tak vzhľadom na rozmery molekuly a vlnové dĺžky použitého laserového žiarenia, väčšina fotónov dopadajúceho žiarenia prechádza vzorkou, buď plynnou alebo kvapalnou, alebo je odrážaná pri použití tuhej nepriehľadnej vzorky. Časť fotónov dopadajúceho žiarenia môže byť rozptyľovaná makroskopickými časticami vzorky, tento jav sa nazýva Tyndalov rozptyl. Stretávame sa s ním v tom prípade, ak je energia rozptýleného žiarenia rovnaká ako energia dopadajúceho žiarenia. Alebo v prípade ak podlieha interakcii s molekulami vzorky, pri ktorej narazí na molekulu, interaguje s elektrónovými oblakmi väzieb v molekule a deformuje, teda polarizuje ich. Keď energia dopadajúceho žiarenia nepostačuje na vyvolanie elektrónového prechodu, tak pri anihilácii dopadajúceho fotónu táto interakcia prevedie molekulu iba do veľmi nestabilného krátkodobého virtuálneho stavu a energia dopadajúceho fotónu sa následne molekulou veľmi rýchlo opätovne vyžiarí do okolia vo forme vytvoreného rozptýleného fotónu [11].

### **1.2.3 Inštrumentácia**

Meranie spektier Ramanovho rozptylu využíva pomerne jednoduché zariadenie. Budiace monochromatické žiarenie laserového zdroja je zaostrené na vzorku a vo vhodnom uhle je opticky zbierané žiarenie, ktoré vzorku rozptyľuje. Najbežnejšie usporiadanie zbiera žiarenie v kolkom smere na smej budiaceho žiarenia. S ohľadom na nízku energetickú účinnosť Ramanovho rozptylu je treba žiarenie zbierať pomocou svetelnej optiky v pomerne širokom rozmedzí. V zbieranom zväzku rozptýleného žiarenia je najskôr potlačená Rayleighova línia pomocou vhodného interferenčného filtra a následne je zaostrené na vstupnú štrbinu obvykle dvojitého monochromátora s vysokou disperziou a dobrým potlačením rozptýleného svetla. Na jeho výstupe je pripojený mnohokanálový detektor s chladenou kamerou CCD, ktorá je nasledovaná počítačom [3].

## Zdroje budiaceho žiarenia

K excitácii Ramanovho rozptylu sa dnes využívajú výhradne lasery. Vo viditeľnej oblasti sa používajú hlavne He-Ne laser (červená línia 633 nm), argónový iónový laser (viacero línií – modrá 457 nm, modrozelená 488 nm, zelená 514,5 nm) a tiež kryptónový iónový laser (červená línia 647 nm, žltá 568 nm). Po excitácii v blízkej infračervenej oblasti (NIR) je obvyklý Nd-YAG laser (neodýmom dotovaný yttriohlinitý granát  $Y_3Al_5O_{12}$ ) s líniou 1064 nm [11,12].

Laser môže byť buď priamo zabudovaný v spektrometri, alebo sa môže využiť aj svetelný lúč z externého zdroja. Vyššia vlnová dĺžka zdroja zlepšuje disperziu na mriežke, tým aj rozlíšenie, ale výrazne znižuje intenzitu signálu. Výber vlnovej dĺžky laseru závisí na tom, či je pre nás dôležitejšia znížená doba snímania alebo vyššie optické rozlíšenie [13].

## Monochromátory

Z rozptýleného žiarenia je treba najskôr odfiltrovať Rayleighov rozptyl, tým pre bežné prístroje dochádza ku strate informácie v oblasti Ramanových posunov  $\pm 100 \text{ cm}^{-1}$  okolo polohy excitačnej línie. Pre túto filtráciu sa bežne používajú holografické filtre alebo jednoduché premonochromátory. V prípade FT Ramanovho (Ramanov spektrometer s Fourierovou transformáciou) spektrometra potom žiarenie vstupuje do interferometra [12].

Keď je Ramanov rozptyl slabý, hlavným problémom Ramanovej spektroskopie je jeho separácia od podstatne intenzívnejšieho Rayleighovho rozptylu. Hlavným problémom nie je samotný Rayleighov rozptyl, ale skutočnosť, že intenzita rozptýleného žiarenia z Rayleighovho rozptylu môže značne prevýšiť intenzitu Ramanovho signálu. V mnohých prípadoch sa problém rieši jednoducho odstránením spektrálneho rozsahu v blízkosti vlnovej dĺžky žiarenia laseru, kde má rozptýlené žiarenie najvýraznejší efekt. Toto môžeme uskutočniť použitím komerčných interferenčných filtrov, ktoré obsahujú spektrálny rozsah  $\pm 80 - 100 \text{ cm}^{-1}$  od frekvencie laseru. Tento spôsob je síce efektívny v eliminovaní rozptýleného Rayleighovho žiarenia, ale nedovoľuje tak detekciu Ramanovho rozptylu v oblasti pod  $100 \text{ cm}^{-1}$ . Avšak nové filtre skonštruované na bázy holografickej optiky, či zlepšené dielektrické filtre môžu efektívne odstrániť intenzívne Rayleighovo žiarenie. Druhým spôsobom, ako eliminovať čo najviac nežiaduceho Rayleighovho žiarenia je použitie

monochromátorov s dvojitou či trojitou monochromáciou, v tomto prípade žiarenie prechádza cez dve, respektíve tri mriežky [11].

## Detektory

K detekcii zariadenia sa pôvodne využívala fotografická doska, na ktorej sa vyhodnocovali polohy a intenzity jednotlivých čiar. V súčasnej dobe sa používajú fotonásobiče. Prúd, ktorý vzniká sa zosilňuje a automaticky registruje. V simultánných spektrometroch sa používa holografická mriežka a súbor fotodiód, nazývaných diode-array, k súčasnej registrácii celého spektra alebo jeho vybranej časti. Moderné prístroje využívajú k vytvoreniu Ramanovho spektra interferometer a Fourierove transformácie (FT-Ramanova spektrometria). Excitácia sa uskutočňuje žiarením v blízkej infračervenej oblasti. Hlavnou prednosťou FT spektrometrov je rýchlosť merania spektier, ktorá umožňuje ich akumuláciu a tým zvýšenie signálu, ktorý za normálnych podmienok nie je príliš silný [10].

Pre spracovanie a detekciu rozptýleného žiarenia sa v súčasnej dobe obvykle využívajú dva typy konštrukcie Ramanovho spektrometra. Pri excitácii Ramanovho efektu vo viditeľnej oblasti je využívaný disperzný prístroj s mriežkovým spektrografom a plošným (viacprvkovým – mnohokanálovým) CCD detektorom. Pri registrácii Ramanovho rozptylu v blízkej IČ oblasti (NIR) je využívaný interferometer a vysoko citlivý jednokanálový detektor. Pre získanie vlastného spektra sa zaznamenaný interferogram prevádza Fourierovou transformáciou, takže sa prístroj označuje ako FT Ramanov spektrometer [12].

Pri meraní prvých Ramanových spektier sa ako detektory používali fotografické plátna, ktoré boli schopné pomerne citlivo zaznamenávať pri jednej expozícii Ramanove spektrum z určitého intervalu frekvencií. Na druhej strane však až do vyvolania nebolo isté, či vôbec optika a meranie spektra bolo správane nastavené. Ďalším krokom v používaní detektorov v Ramanovej spektroskopii boli takzvané jednobodové detektory v podobe fotonásobičov. Tieto zariadenia menili fotóny s určitou diskretnou energiou na elektróny. Získaný elektrický signál z fotonásobiča umožňoval pracovníkom optimalizovať optické podmienky nastavenia merania spektra. Avšak táto výhoda bola limitovaná skutočnosťou, že nebolo možné získať celé Ramanove spektrum v priebehu jediného integračného cyklu meraní. Ramanove prístroje s takýmto detektorom museli celé spektrum postupne snímať po malých krokoch a pri každom z nich museli merať aj intenzitu rozptýlených fotónov. To však ale znamenalo, že meranie celého Ramanovho spektra vyžadovalo určitý čas. Riešením bolo zaznamenávanie

intenzity žiarenia použitím nových elektronických prvkov. Najskôr to boli fotodiódové polia a kamery, dnes sa využívajú CCD detektory, ktoré pozostávajú z dvojrozmernej matrice polovodičových elementov [11].

## **Kyvety**

Ako kyvety sa pri tejto metóde využívajú nádoby najrôznejších tvarov. Ak pracujeme vo viditeľnej oblasti spektra, je materiálom pre kyvety ľubovoľný druh skla. Ak sa využívajú k excitácii čiary z ultrafialovej oblasti spektra, je potrebné aby žiarenie prechádzalo kremíkovým materiálom. Po práci pri nízkych teplotách sú nutné špeciálne kyvety s vákuovým plášťom, ktorý bráni zrážaniu vlhkosti na stenách kyvety, zvlášť na výstupnom okienku. Pri najmodernejších prístrojoch sú špeciálne zariadenia, ktoré dovoľujú pracovať pri nízkych aj vysokých teplotách. Objem kvapalných vzoriek činí niekoľko mililitrov až jeden mikroliter. Je možné zhotovovať aj spektrá monokryštálov a práškov [1].

Dôležitým aspektom umiestnenia vzorky v kyvetovom priestore je možnosť jeho presného polohovania voči excitujúcemu lúču a zbernej optike rozptýleného žiarenia. Prístroje sú obvykle vybavené x-y-z polohovacím zariadením, s ktorým je možné manipulovať manuálnym ovládaním alebo krokovými motormi s riadením pomocou joysticku, tlačítok alebo pomocou ovládacieho softwaru [12].

## **Požiadavky na vzorky**

Meranie vzoriek je možné robiť v plynnom stave, kedy sa používajú kyvety s násobným priechodom, aj v pevnom stave (po rozdrvení na prášok umiestnený v kapiláre alebo vo forme monokryštálov). Pre meranie v kvapalnom stave majú kyvety objem od 0,1  $\mu$ l. Oproti minulosti, kedy sa pri tejto metóde používali k ožiareniu vzoriek výbojky a rozptýlené žiarenie malo malú intenzitu, takže bolo nutné pracovať s vysokou koncentráciou vzoriek, je v súčasnej dobe možné robiť meranie dokonca látky v množstve niekoľkých mg. Použité rozpúšťadlá musia poskytovať slabé Ramanove pásy, ktoré neprekrývajú spektrum vzorky. Tieto rozpúšťadlá však nemusia byť bezvodé. Je možné tiež pracovať priamo vo vodných roztokoch, čo umožňuje použitie Ramanovej spektroskopie na meranie rôznych biologických materiálov [10].



#### 1.2.4 Interpretácia a vyhodnotenie spektier

Interpretácia Ramanovho spektra je veľmi podobná ako interpretácia IČ spektra, avšak intenzity pásov v jednotlivých spektrách sa môžu vzájomne líšiť vzhľadom k rozdielnemu fyzikálnemu princípu oboch spektroskopii [1].

Nasýtené väzby ( $-C\equiv C-$ ,  $-C=C-$ ,  $C\equiv N$ , atď.) poskytujú intenzívne Ramanove pásy a slabé IČ pásy medzi  $1600 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ . Valenčné vibrácie polárnych  $-N-H$ ,  $-O-H$  väzieb poskytujú veľmi silnú absorpciu v IČ oblasti spektra, ale slabý Ramanov rozptyl. Frekvencie karbonylových a karboxylových skupín sú intenzívne ako v Ramanových, tak aj v infračervených spektrách. Pri skupinách, ako sú  $O=C=O$ ,  $C-O-C$ ,  $N=C-N$ , atď., býva jedna symetrická a jedna antisymetrická vibrácia. Symetrická vibrácia je silná v Ramanovom spektre a slabá v infračervenej oblasti. Antisymetrická vibrácia je silnejšia v IČ spektre a slabšia v Ramanovom. Aromatické zlúčeniny poskytujú intenzívnu absorpciu v Ramanových aj v infračervených spektrách [1].

Všetky teoretické pravidlá o polohe pásov v spektrách a tiež ostatné vzťahy sú len všeobecnou pomôckou pre interpretáciu spektier. Skutočnú schopnosť interpretovať spektrá sme schopní nadobudnúť jedine dôkladným a dostatočným štúdiom literatúry a dlhodobými skúsenosťami. Pracovník, ktorý zhotovuje vibračné spektrum, by mal mať už hotovú elementárnu analýzu a aspoň hrubú predstavu o tom, čo by jeho skúmaná vzorka mala a čo by nemala obsahovať. Ak je napríklad známe, že vzorka neobsahuje dusík, potom pásy, ktoré môžu zodpovedať alkoholu alebo amínu, musia v tomto prípade prislúchať alkoholu [1].

Ramanove spektrum je na identifikáciu výborným nástrojom, najmä ak je pri porovnávaní zmeraných a databázových dát dodržaná podmienka, že Ramanove spektrá boli získané pre rovnaký fyzikálny stav látky. K jednoznačnej identifikácii látok sú však nutné buď tlačené alebo elektronické knižnice jednotlivých spektier [12].

#### 1.3 Aplikácia metódy

Ramanova spektroskopia je metóda, ktorá slúži väčšinou v kombinácii s infračervenou spektroskopiou ku štruktúrnej analýze látok.

Analýza vzorky pomocou vibračnej mikrospektroskopie môže byť využitá k mapovaniu („mapping“) a zobrazovaniu („imaging“). Mapovanie predstavuje postupne meranie spektra

príľahlých oblastí vzorky. Toho je možné dosiahnuť pomocou posunovania každej časti vzorky do lúča, fokusovaného do mikroskopu a celý proces sa opakuje dovtedy, pokiaľ nie sú všetky oblasti vzorky zamerané. Samotné zobrazovanie, na druhej strane vyžaduje, aby bola vzorka fokusovaná na detektor, kde je meraná intenzita žiarenia prechádzajúca každou časťou vzorky. Pokiaľ je vzorka posunovaná iba v jednom smere, nazývame toto meranie mapovaním. Keď však ale vzorkou hýbeme v dvoch smeroch – nemôžeme však tomu síce hovoriť zobrazovanie, pretože spektrum nie je merané pomocou detektora, ale mikroskopu, kedy môžeme so spektrom zaobchádzať, ako by bolo získané pomocou detektora pri zobrazovaní. Tieto metódy sú používané napríklad pri sledovaní nádorov hrubého čreva alebo mozgu, alebo pri skenovaní rôznych buniek v ľudskom tele, alebo dokonca v poľnohospodárstve či vo farmaceutickom priemysle [13,14].

### **1.3.1 Ramanova spektroskopia biologických vzoriek**

Ramanova spektroskopia je výkonná analytická metóda, ktorou sa môžeme merať chemické zloženie komplexných biologických vzoriek, ako napr. biologické tekutiny, bunky a tkanivá. Ramanove spektrum nám poukazuje na špecificitu vzorky danej molekuly a poskytuje kvantitatívne informácie týkajúce sa jej chemického zloženia. V prípade ak sú biochemické zmeny v bunkách a tkanivách, ktoré môžu byť spôsobené alebo sú príčinou ochorenia, môže to viesť k významným zmenám v Ramanovom spektre. Potenciál Ramanovej spektroskopie vyplýva z jeho schopnosti odhaliť takéto biochemické zmeny na molekulárnej úrovni, a preto môže byť použitá pre diagnostiku, prognostiku alebo ako nástroj pre hodnotenie nových liečebných postupov [15].

### **1.3.2 Využitie Ramanovej spektroskopie ako nástroja pre monitoring biotechnologických procesov**

Ramanova mikroskopia je metóda, ktorá priamo detekuje vibrácie biochemických väzieb prostredníctvom neelastického rozptylu pomocou laserových lúčov [16]. Daná metóda poskytuje riešenie pre rýchle stanovenie tzv. „metabolických odtlačkov prstov“, teda určitú špecificitu biologických vzoriek v reálnom čase [17]. Ramanova mikroskopia jednotlivých buniek v kombinácii s optickou celou, tzv. „Raman tweezers“ umožňuje zachytenie a následnú akvizíciu jednotlivých buniek Ramanovho spektra živých buniek [18], ktoré potom slúžia ako biochemické „odtlačky prstov“ bunky [19,20]. Toto in situ meranie ponúka veľké výhody pri bežne používaných metódach založených na fluorescencii na ilustráciu napr., bunkových lipidov [21]. Súvisiace aplikácie zahŕňajú potvrdenie existencie TAG u dvoch

druhov rias, a to *Chlorella sorokiniana* a *Neochloris oleoabundans* [22]. Tiež udáva charakterizáciu štruktúry a umiestnenie uhl'ovodíkov v bunkách *Botryococcus braunii* [23], Avšak tieto predchádzajúce štúdie sa sústredili len na všeobecné charakteristiky bunkových lipidov, v ktorých nebolo schopné určiť obsah buniek konkrétnej lipidovej triedy, ktorá je predmetom záujmu, buď u jednotlivých buniek [21,22,23] alebo na celých kolóniách [24].

Okrem toho tieto štúdie vyžadovali určitý čas pre získanie Ramanovho signálu v každom meraní SCRS [22-25], čo zabránilo mnohým aplikáciám, kde je dôležitá výkonnosť merania (napr. časové sledovanie bioprocesu). Kvantitatívne hodnotenie špecifickej triedy lipidov (ako sú TAG) bolo zistené pri rozlíšení jednotlivých buniek s dostatočnou priepustnosťou pri monitorovaní dynamiky bioprosesov. Na výskum boli použité mikroorganizmy *Nannochloropsis* spp., ktoré sú skupinou jednobunkových olejnatých mikroorganizmov s určitým priemyselným záujmom [26]. V danej práci bola preukázaná kvantitatívna predpoveď obsahu TAG v jednotlivých bunkách prostredníctvom SCRS. Tiež sa podarilo pomocou danej metódy objasniť dynamiku fenotypovej heterogenity a významnú negatívnu koreláciu medzi obsahom TAG a stupňom lipidového nenasýtenia medzi jednotlivými bunkami [27].

Ďalšie štúdie poukazujú na to, že doteraz sa aplikácie Ramanovej spektroskopie v mikrobiológii zamerali predovšetkým na detekcia medicínsky významných organizmov [28,29,30]. V roku 2007 Raman Research Group na Gentskej univerzite publikovala databázu Ramanových spektrálnych znakov biologicky relevantných molekúl, ktoré uľahčujú priradenie najvýznamnejších Ramanových pásov pozorovaných v živých bunkách [31]. Nedávne recenzie zhrňujú použitie Ramanovej spektroskopie na detekciu a identifikáciu dôležitých molekúl v biologických vzorkách [32,33,34].

Ramanova spektroskopia fotosyntetických organizmov je komplikovaná silnou autofluorescenciou pigmentov, ktorá zakrýva charakteristické Ramanove spektrálne črty. Toto zistenie teda v mnohých smeroch obmedzilo aplikáciu danej metódy iba na malý počet druhov rias [35,36,37]. Daná štúdia prezentuje Ramanove spektrá zásobných lipidických buniek merané Ramanovou mikroskopiou v jednotlivých bunkách troch druhov rias: *Botryococcus sudeticus*, *Chlamydomonas* Sp. a *Trachydiscus minutus*. Hlavnou hybnou silou výberu troch druhov rias bolo určiť použiteľnosť spektroskopických meraní na charakterizáciu lipidov u druhov s výrazne odlišným relatívnym obsahom nenasýtených mastných kyselín. Toho príkladom je mikroorganizmus *Trachydiscus minutus*, ktorý obsahuje vysoké množstvo

vysoko nenasýtených mastných kyselín [38], ktoré môžu byť využívané ako hodnotný doplnok ľudskej stravy.

Ramanova spektroskopia má mimoriadne konkurenčnú pozíciu, ak je in situ, bezkontaktná, neinvazívna a je potrebná rýchla analýza, napríklad on-line analýza v biotechnologických procesoch. Vzorka nemusí byť pripravená na analýzu s použitím rozpúšťadiel, preto sa v danej technike ako rozpúšťadlo využíva voda, kvôli minimálnej interferencii pri meraní [39,40,41,42,43]. Na analýzu baktérií produkujúcich PHB sa nedávno uskutočnili experimenty, v ktorých sa uskutočnila analýza baktérií, ktoré sú schopné produkovať PHB a namerané spektrá PHB boli rozpoznané [43,44]. V posledných rokoch boli popísané štúdie, ktoré využívali IR-Ramanovu techniku na zmeranie intenzity rôznych polymérov [45,46].

Daná štúdia predstavuje ukazovatele intenzity Ramanových spektier, ktoré jednoducho využívajú spektrálne intenzity, na základe ktorých boli tieto spektrá použité na zostrojenie kalibračnej krivky. Tento proces sa často uvádza ako vnútorná normalizácia a eliminuje rôzne experimentálne faktory, ako je napríklad výkon lasera a inštrumentálne efekty. Táto štúdia predstavuje úplné kalibračné krivky založené na interných štandardoch pokrývajúcich veľký rozsah koncentrácií PHB až do 90% (hmotn./hmotn.) a doposiaľ nebola publikovaná iná štúdia, ktorá by prezentovala podobné výsledky [47].

Taktiež nie je vydaná publikácia, ktorá by interpretovala výsledky týkajúce sa kvantitatívnej produkcie extracelulárnych polysacharidov kvasinky *A. pullulans* ako extracelulárneho produktu pomocou Ramanovej mikroskopie.

#### **1.4 Kvasinka *Aureobasidium pullulans***

*Aureobasidium pullulans* je ubikvitná polymorfná a oligotrofná kvasinková pleseň, nachádzajúca sa v rôznych podnebných pásmach. Vyskytuje sa od tropických a subtropických pásiem až po arktický pás, kde je ale jej výskyt skôr vzácny [48].

Obvykle sa vyskytuje na nadzemných častiach rastlín a je dominantnou hubou, vyskytujúcou sa na listoch. Rastie taktiež v povrchových vrstvách mnohých pôd, kde sa rast tohto organizmu zvyšuje v závislosti na hnojení dusíkom. Tento rod bol izolovaný ako zo sladkej vody, aj zo slanej vody. Je prítomný v rhizosfére tráv, semien, v hniezdach a perí vtákov, na bavlnených tkanivách, plastoch a pod. Pre väčšinu kmeňov je optimálny rasti pri

teplote 25°C a sú tiež citlivé na zahrievanie. Sú však aj kmene, ktoré sú schopné sa adaptovať a rásť pri teplote vyššej alebo nižšej ako je ich optimum [48,49].

#### **Taxonomické zaradenie *Aureobasidium pullulans*, klasifikácia [48]:**

<b>Ríša</b>	Huby
<b>Oddelenie</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Trieda</b>	<i>Dothideomycetes</i>
<b>Rád</b>	<i>Dothideomycetidae</i>
<b>Čeľaď</b>	<i>Dothioraceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Aureobasidium</i>
<b>Druh</b>	<i>A. pullulans</i>

#### **1.4.1 Morfológické znaky**

Mladé kolónie, ktoré sa skladajú prevažne z pučiach kvasinkových buniek, sú ploché, hladké a lesklé. Ich zafarbenie sa pohybuje od bieleho po ružové alebo žlté. Starutím kolónie získavajú zamatovú textúru, ktorá býva tmavohnedej až čiernej farby, s okrajmi sfarbenými do šeda. V tejto fáze je už pozorovateľný výskyt mycélia a slizkej hmoty z konídií. Mycélium je septované a má priemer väčší ako 20 µm. Spočiatku je toto mycélium priehľadné, postupne sa však vyvíja tmavohnedá pigmentácia, ktorej intenzita je závislá na tom ako je mycélium staré [48].

*Aureobasidium pullulans* nemá žiadne výrazné konidiofóry. Apikálne alebo interkalárne blastokonídie sú produkované nerozlíšenými hýfami. Tieto konídie môžu pokračovať v ďalšom množení pučením za vzniku sekundárnych konídií, ktoré bývajú spravidla menšie [50,51,52].

Morfológická forma *A. pullulans* je ovplyvňovaná radou faktorov, ako sú teplota, pH a koncentrácia kyslíku. Taktiež nutričné faktory ovplyvňujú morfológiu, najmä typ a koncentrácia zdroja uhlíku, zdroj dusíka a jeho koncentrácia, obsah minerálov a iné. Všetky tieto faktory ovplyvňujú najmä kvasinkovú formu mikroorganizmu, ktorá je zodpovedná za produkciu pullulánu. *Aureobasidium* sa delí na dve varianty, a to *A. pullulans* var. *pullulans*, ktoré tvorí ružové, svetlo hnedé alebo žlté kolónie, ktoré po dlhšom čase kultivácie tmavnú na *A. pullulans* var. *melanogenum*, ktorý tvorí veľmi skoro čierne alebo zeleno-čierne kolónie [50,51,52]. Toto rôzne sfarbenie kolónií počas rôznych dní kultivácie je znázornené na **Obr.**

**3.**



**Obr. 3** Jednotlivé kultúry *A. pullulans* počas rôznych dní kultivácie: zľava 3. deň, 8. deň a 14. deň

### 1.4.2 Biotechnologický význam

*Aureobasidium pullulans* je priemyslovo veľmi významný organizmus vzhľadom na jeho produkciu mnohých metabolitov, kde patria enzýmy, bielkoviny (SCP), extracelulárne polysacharidy, a iné [48].

Tento organizmus je jedným zo široko rozšírených a vysoko adaptívnych saprofytných mikroorganizmov, ktorý má vysokú toleranciu k žiareniu a je považovaný dokonca za kontrolného činiteľa proti pozberovým ochoreniam. Niektoré kmene sú schopné zamedziť napríklad rozvoju *Penicillium digitatum* na greloch, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* a *Aspergillus niger* na hrozne a rajčinách, a tiež *Penicillium expansum* na jablkách, a tým ich chrániť pred napadnutím a pokazením [48].

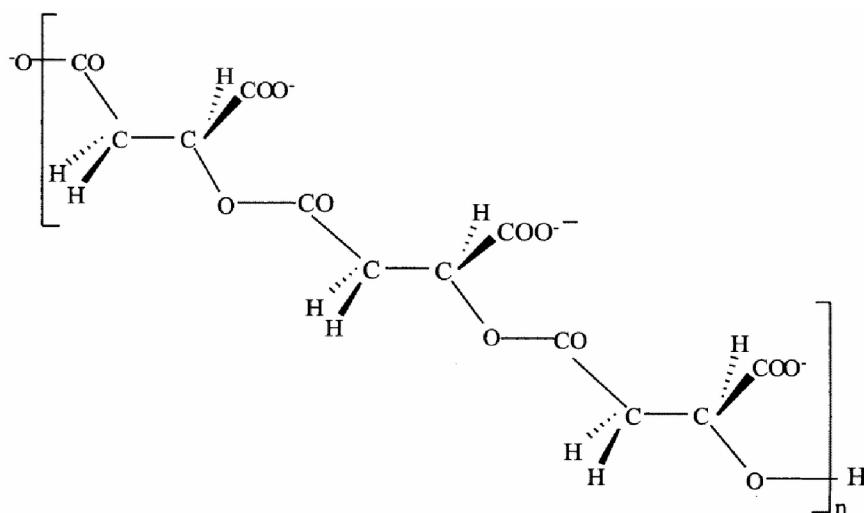
### 1.4.3 Produkcia extracelulárnych polymérov (ECP)

*Aureobasidium pullulans* je významným producentom extracelulárnych polysacharidov, pričom najvýznamnejším z nich je pullulán, ktorý nachádza uplatnenie v mnohých oblastiach, ako je potravinársky priemysel, farmaceutický priemysel a ďalšie. Ďalším priemyslovo významným extracelulárnym polymérom je kyselina poly- $\beta$ -L-jablčná. Je zaujímavé, že doposiaľ nebola plne objasnená funkcia pullulánu vo vzťahu k bunkám *A. pullulans*. Je možné, že slúžia ako ochrana pred nepriaznivými podmienkami, napríklad pôsobenie teploty. Ďalšie informácie o využití, štruktúre a vlastnostiach pullulánu a kys. poly- $\beta$ -L-jablčnej sú uvedené v kapitolách nižšie.

#### 1.4.3.1 Polyester poly-L-jablčnej kyseliny (PMLA)

Poly- $\beta$ -L-jablčná kyselina je nevetvený štvoruhlíkatý polyester zložený z monomérnych jednotiek L-malátu, ako môžeme vidieť na **Obr. 4**. Jednotlivé monoméne jednotky sú

prepojené cez karboxylovú skupinu do polohy  $\alpha$  a tiež do polohy  $\beta$  tvoriacej ester. Ako  $\alpha$ - a  $\beta$ -štruktúry, tak aj racemická alebo opticky čistá forma poly-L-malátu môžu byť získané chemickou cestou, zatiaľ čo mikroorganizmy produkujú výhradne poly- $\beta$ -L-jablčnú kyselinu s vysokou optickou čistotou. Pred objavením novej produkcie biologickou cestou s využitím myxomycét a niektorých vláknitých húb bol polyester kyseliny jablčnej syntetizovaný z odpovedajúcich laktónov. V roku 1969 bola ohlásená prvá izolácia, aj keď v tej dobe plne necharakterizovaného poly-L-malátu z *Penicillium cyclopium* [53]. Neskôr bol tento polymér, tzv. znovuobjavený ako inhibítor DNA-polymerázy u *Physarum polycephalum* a bol aj podrobne charakterizovaný [54,55].



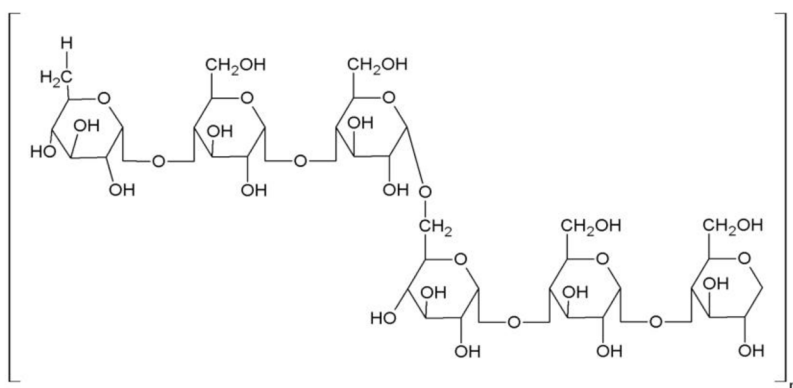
Obr. 4 Štruktúra kyseliny poly-L-jablčnej [56]

PMLA bola následne uznaná ako nový typ biopolyméru, kedy bolo v roku 1993 izolované veľké množstvo tohto biopolyméru z mikroorganizmu *Aureobasidium pullulans* [57]. Dnes je PMLA zaradovaná medzi poly- $\beta$ -hydroxyalkanoláty. Tieto polyméry, najmä poly- $\beta$ -hydroxybutyrát (PHB), sú syntetizované a uchovávané v zásobných granulách mnohých baktérií a sú biotechnologicky produkované pre priemyslovú výrobu biodegradabilných plastov. PMLA doposiaľ nebola objavená u baktérií. Metabolická dráha syntézy a degradácie PMLA pravdepodobne nesúvisí s metabolickou dráhou syntézy polyhydroxyalkanolátov. Zatiaľ čo tieto lipofilné polyestery majú funkciu zásobárne uhlíku a energie, PMLA interaguje s ďalšími biopolymérmi z dôvodu vysokého náboja a rozpustnosti [56,58].

PMLA je úplne biodegradabilná a biokompatibilná a má výnimočne dobré vlastnosti pri jej používaní ako transportného systému pre liečivá, ktoré môžu špecificky nájsť určité tkanivo a kovalentne sa naň naviazať [56].

### 1.4.3.2 Pullulán

Pullulán je lineárny homopolysacharid, ktorý pozostáva predovšetkým z opakujúcich sa maltotriózových jednotiek. Tieto sú zložené z troch molekúl glukózy spojených  $\alpha$ -1,4-glykozidickou väzbou, ktoré sú navzájom priečne prepojené  $\alpha$ -1,6 glykozidickou väzbou. Štruktúra pullulánu je zobrazená na **Obr. 5**. Maltotetraóзовé jednotky zložené zo štyroch molekúl glukózy spojené  $\alpha$ -1,4 väzbou, sa pravdepodobne vyskytujú náhodne a zriedka [60]. Zistený bol tiež výskyt vetviaceho miesta, kde sú poly-maltotriózové bočné reťazce pripojené k hlavnému reťazcu 1,3-glykozidickou väzbou, ktorý je pomerne vzácny [49,61].



*Obr. 5 Štruktúra pullulánu [48]*

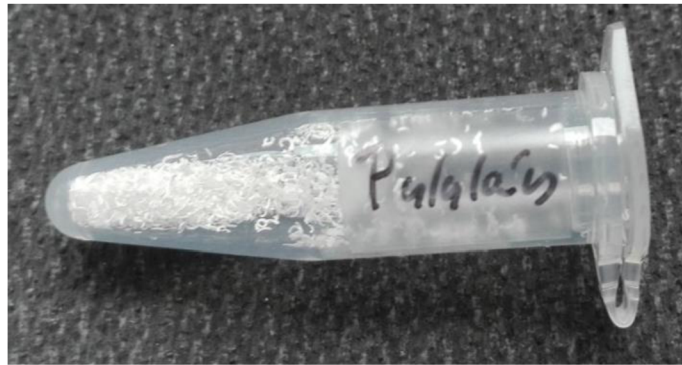
#### Fyzikálno-chemické vlastnosti

Pullulán je biely až mierne nažltlý prášok bez chuti a zápachu. Je jedlý, netoxický, nekarcinogénny, nemutagénny a biodegradabilný, **Obr. 6**. Ľahko sa rozpúšťa v teplej aj studenej vode, ale je nerozpustný v organických rozpúšťadlách, **Obr. 7**. Vodné roztoky pullulánu sú veľmi viskózne už aj pri nízkej koncentrácii, no gély netvoria. Viskozita vodného roztoku závisí na molekulovej hmotnosti a zahrievaním sa nemení, ani zmenou pH, a ani pôsobením väčšiny iónov kovov vrátane NaCl. Roztoky pullulánu sú v porovnaní s inými rozpustnými polysacharidmi (napríklad arabská alebo guaranová guma) menej viskózne. Pullulán je tiež ľahko chemicky modifikovateľný a umožňuje vytvárať makromolekulárne systémy schopné tvoriť hydrogély [62,63].

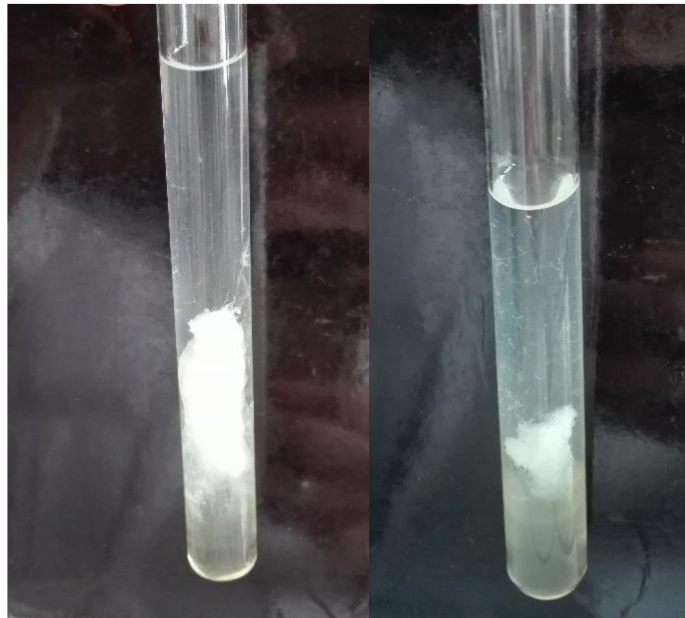
Pullulán je látka, ktorá je schopná tvoriť vlákna a tenké filmy, ktoré sú transparentné, bezfarebné, bez chuti a zápachu a taktiež sú odolné voči pôsobeniu tukov a sú nepriepustné pre kyslík. Môžu byť tiež využívané ako potaňový alebo obalový materiál pre potraviny, tiež sa využíva aj ako adhezívny a enkapsulačný prostriedok. Napriek tomu, že sa jedná z hľadiska



štruktúry o  $\alpha$ -D-glukán, je pullulán odolný voči pôsobeniu  $\alpha$ -D-amyľazy, preto môže byť použitý okrem iného aj napríklad v nízkokalorických potravinách [59,62].



*Obr. 6 Čistý pullulán*



*Obr. 7 Supernatant získaný z biomasy po prídavku etanolu s vyzrážanou zrazeninou pullulánu, z ľava minerálne médium s prídavkom kvasničného autolyzátu a čisté minerálne médium*

### **Príprava pullulánu**

Príprava pullulánu sa líši v závislosti na jeho rôznom použití, napríklad pri priemyselných aplikáciach – adhezíva, disperzačné a koagulačné činidlá, sa fermentačné médium iba zakoncentruje, vysuší a pulverizuje. Ak sa pullulán využíva v potravinárskom priemysle, kultúra sa odfarbí použitím aktívneho uhlia, zakoncentruje, vysuší a pulverizuje. Pre farmaceutické účely a aplikácie je nutné purifikovať alkoholovou frakcionizáciou alebo membránovou filtráciou, odfarbiť, odsoliť, zakoncentrovať, vysušiť a pulverizovať [63].

## 2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 2.1 Použité kmene mikroorganizmov, chemikálie a prístroje

#### 2.1.1 Kmeň *Aureobasidium pullulans*

Pre experimentálnu časť práce boli použité kmene *Aureobasidium pullulans* CCM 8182 a kmeň CCM F148, ktoré boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov Přírodovedeckej fakulty Masarykovskej univerzity MU v Brne, a kmeň *Aureobasidium pullulans* DSMZ 3497 z Nemeckej zbierky mikroorganizmov.

#### 2.1.2 Chemikálie

Štandardy:

Pullulán, Sigma-Aldrich, SRN  
Glukóza monohydrát, p.a., Lach-ner, ČR  
Kyselina L-jablčná, Sigma-Aldrich, SRN  
Acetonitril – (mobilná fáza pre HPLC) Super Gradient, Fulka, SRN  
Kyselina sírová, 96%, Lach-Ner, ČR  
Kyselina 3,5-dinitrosalicylová kyselina, Lach-Ner, ČR  
Vínan sodno-draselný, Lach-Ner, ČR

Ostatné chemikálie boli v rámci čistoty p.a. a boli získané od bežných dodávateľov.

#### 2.1.3 Prístroje

Očkovací box Aura mini – Bioair Instruments (UK)  
Spektrofotometer UV-VIS, Helios  $\alpha$ -Unicam (UK)  
HPLC Agilent Infinity 1260 s využitím ELSD detektora  
Renishaw Invia system (Renishaw inVia Raman Spectrometer, Renishaw plc., Wotton under Edge, UK)

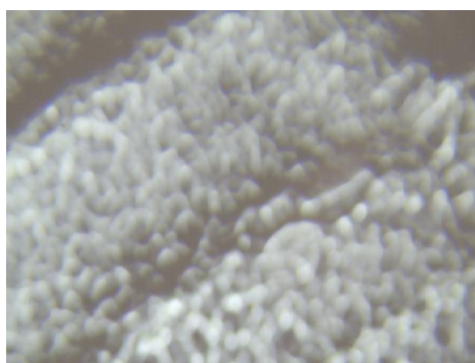
Podrobná technická špecifikácia parametrov disperzného konfokálneho Ramanovho spektrometra:

- Monochromátor spektrometra s vysokou optickou priepustnosťou  $\geq 30\%$  s ohniskovou vzdialenosťou 200 mm
- Spektrálny rozsah prístroja od UV až po IR od 200 nm do 1700 nm
- Spektrálne rozlíšenie prístroja  $\leq 1\text{cm}^{-1}$  FWHM
- Spojité skenovanie Ramanovho spektra v širokom spektrálnom rozsahu od  $100\text{cm}^{-1}$  do  $1000\text{cm}^{-1}$  bez nutnosti spojovania viacerých spektier z rôznych spektrálnych rozsahov
- Prístroj je osadený CCD detektorom s čipom o veľkosti 1024x256 pixelov, termoelektricky chladeným na teplotu minimálne  $-70^\circ\text{C}$  s rozsahom od 200 nm do 1050 nm, QE  $\geq 50\%$  v rozsahu 500 nm až 800 nm
- Prístroj je vybavený excitačnými lasermi o vlnových dĺžkach 532 nm, 785 nm a 1064 nm

- Diódový DPSS laser 532 nm o výkone 50 mW, ktorý je chladený vzduchom so zabudovaným plazma filtrom
- Diódový NIR laser 785 nm o výkone 300 mW, chladený vzduchom
- Diódový DPSS laser 1064 nm o výkone 500 mW, chladený vzduchom, tiež využívaný pre aplikácie vytvorenia optickej cely tzv. „Raman tweezers“
- Každý z vyššie uvedených laserov má v prístroji svoju samostatnú optickú dráhu optimalizovanú pre VIS, NIR alebo IR excitáciu pre dosiahnutie čo najlepšieho pomeru signál/šum v Ramanových spektrách
- Prístroj má automatické prepínanie medzi jednotlivými lasermi pomocou ovládacieho softwaru
- Pre excitačné lasery sú Rayleighove hranové filtre s hranou minimálne  $100\text{ cm}^{-1}$  od excitačných línií laserov
- Prístroj má automatickú kalibráciu s využitím zabudovaných kalibračných vzoriek Si, Ne, lampu a zdroj bieleho svetla
- Prístroj je osadený ND filtermi pre tlenie intenzity excitačných laserov s minimálne 15 rôznymi stupňami tlenia v rozsahu 0 až 100% intenzity laserov
- Prístroj obsahuje vzpriamený mikroskop s binokulárom a zabudovanou farebnou videokamerou. Obsahuje objektívy so zväčšením x5, x20, x50 a x100
- Mikroskop umožňuje automatické prepínanie medzi osvetlením vzorky bielym svetlom alebo laserom, alebo medzi oboma zdrojmi súčasne
- Prístroj obsahuje motorizovaný stolček k mikroskopu XYZ s krokom  $0,1\ \mu\text{m}$  vo všetkých osiach s možnosťou ovládania pomocou softwaru, a to joystickom alebo ručne.



**Obr. 8** Z ľava na obrázku je zachytený Ramanov spektrometer Renishaw využívaný v experimentálnej časti práce, následne detail na meracej doske pri samotnom meraní vzoriek a stopa plochy laseru pri meraní



**Obr. 9** Mikroskopický obraz *A. pullulans* kmeňa 8182 zachytený pri meraní na Ramanovom spektrometri

## 2.2 Kultivácia *Aureobasidium pullulans*

### 2.2.1 Tuhé médium

Pre merania a uschovanie mikroorganizmov boli použité viaceré kultivačné médiá, a to minerálne médium, minerálne médium s prídavkom kvasničného autolyzátu a obohatené médium. Zloženie médií je uvedené v tabuľke 1. Tieto médiá boli použité aj v experimentálnej časti pri meraní jednotlivých kmeňov na Ramanovom spektrometri. Po sterilizácii v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 50 minút bolo médium rozliate do sterilných Petriho misiek a po vychladnutí a stuhnutí zaočkované krížovým rozterom očkovacou kľučkou. Kultúry boli uchovávané pri teplote 4°C a pravidelne preočkované.

*Tabuľka 1* Zloženie jednotlivých tuhých kultivačných médií použitých na kultiváciu *A. pullulans*

Minerálne médium (MM)		Minerálne médium (MM_yeast)	
látka	koncentrácia (g/L)	látka	koncentrácia (g/L)
glukóza	60,0	glukóza	60,00
NaNO <sub>3</sub>	2,0	yeast extrakt	7,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50
KCl	0,5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,50
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,34
agar	17,0	agar	17,00
Obohatené médium			
látka	koncentrácia (g/L)		
glukóza	20,0		
peptón	20,0		
yeast extrakt	10,0		
agar	17,0		

### 2.2.2 Tekuté médium

Na základe štúdia literatúry a experimentálneho overenia boli pre kultiváciu *A. pullulans* zvolené 2 produkčné médiá a obohatené médium, ktoré slúžilo ako porovnávacie. Zloženie jednotlivých médií je uvedené v tabuľke 2. Sterilizácia médií prebiehala v tlakovom hrnci s otvoreným ventilom po dobu 50 minút. Produkčné médiá boli zaočkované inokulom o objeme 10 %. Inokulum bolo pripravené do 100 mL Erlenmayerových baniek, ktoré obsahovali 50 mL média, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 3. Po sterilizácii bolo médium zaočkované očkovacou kľučkou z pevného média kultúrami *A. pullulans* z Petriho misky. Potom boli banky umiestnené na temperovanú trepačku pri 30°C a rýchlosti 160 rpm.

Po 3 dňoch kultivácie boli takto pripraveným inokulom zaočkované produkčné média do 250 mL baniek s objemom média 100 mL.

*Tabuľka 2 Zloženie jednotlivých kvapalných kultivačných médií použitých ako produkčné média na kultiváciu *A. pullulans**

Minerálne médium (MM)		Minerálne médium (MM_yeast)	
látka	koncentrácia (g/L)	látka	koncentrácia (g/L)
glukóza	80,0	glukóza	80,00
NaNO <sub>3</sub>	2,0	yeast extrakt	7,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,50
KCl	0,5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,50
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,34
Obohatené médium			
látka	koncentrácia (g/L)		
glukóza	20,0		
peptón	20,0		
yeast extrakt	10,0		

### 2.2.3 Stanovenie rastovej krivky

V priebehu kultivácie v Erlenmayerových bankách o objeme 250 mL v produkčných médiách o objeme 100 mL (kap. 2.2.2) bolo v pravidelných intervaloch odoberaných 5 mL vzorky, ktorý bol následne použitý k stanoveniu obsahu biomasy a množstva produkovaných ECP podľa postupu, ktorý je uvedený v kapitole 2.3.1. Rastová krivka bola zaznamenaná do grafu a výsledky sú hodnoty z 3 kultivácií v 3 rôznych médiách.

## 2.3 Analýza biomasy a produkovaných metabolitov

Ku charakterizácii výsledkov kultivácie boli použité rôzne analytické metódy, ktorých postupy práce sú uvedené v nasledujúcich kapitolách.

### 2.3.1 Gravimetrické stanovenie obsahu sušiny

Ku stanoveniu obsahu sušiny bol použitý objem 5 mL z produkčných médií, ktorý bol po odbere zcentrifugovaný pri laboratórnej teplote 5 minút pri 10 000 rpm. Získaný supernatant bol neskôr použitý pre stanovenie celkových sacharidov, ako je popísané v kapitole 2.3.2, a tiež na stanovenie obsahu ECP. Sediment bol premytý destilovanou vodou a následne sušený pri teplote 75°C do konštantnej hmotnosti. Získaná sušina bola následne odvážená na analytických váhach a obsah bol prepočítaný na g/L.

### **2.3.2 Stanovenie celkových sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny**

Na stanovenie celkových sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny bolo do skúmaviek napipetované 0,5 mL vzorky a 0,5 mL činidla 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny, ktorá bola pripravená navážením 0,2 g 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny, 60 g vínanu sodno-draselného a 40 mL 2M hydroxidu sodného a následne boli takto navážené zložky doplnené do objemu 200 mL do odmernej banky. Potom boli vzorky zahrievané na vodnom kúpeli pri teplote 70°C po dobu 10 minút. Následne boli skúmavky so vzorkami umiestnené do tmy po dobu chladnutia a potom boli doplnené destilovanou vodou na objem 10 mL a dôkladne premiešané. Vzorky boli analyzované pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 540 nm.

Pri postupe prípravy kalibračnej priamky sme postupovali podobne. Pripravená bola vzorka glukózy o koncentrácii 5 g/L. Do pripravených skúmaviek bolo potom odpipetované 3,0; 2,7; 2,4; 2,1; 1,8; 1,5; 1,2; 0,9; 0,6; 0,3 a 0,1 mL tejto vzorky. Skúmavky boli doplnené na objem 3 mL destilovanou vodou. Následne bolo do skúmavky odpipetované množstvo 0,5 mL, z takto pripravených roztokov a k nim pridané množstvo 0,5 mL činidla 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny. Takto pripravené skúmavky boli umiestnené na 10 minút do vodného kúpeľa pri 70°C a potom boli umiestnené do tmy po dobu chladnutia. Nakoniec sme roztoky doplnili na objem 10 mL destilovanou vodou a zmerali sme spektrofotometricky absorbanciu pri 540 nm.

## **2.4 Stanovenie obsahu extracelulárnych polymérov**

### **2.4.1 Precipitácia a gravimetrické stanovenie obsahu extracelulárnych polymérov**

Pri gravimetrickom stanovení obsahu extracelulárnych polymérov bolo k 3 mL supernatantu získaného podľa postupu 2.3.1 do skúmavky pripipetovaných 6 mL studeného etanolu. Obsah bol premiešaný a ponechaný následne v chlade. Asi po 20 minútach bola vzniknutá zrazenina centrifugovaná pri 20 000 rpm, získaný sediment bol vysušený pri teplote 75°C v sušiarňi do konštantnej hmotnosti. Získaná sušina bola následne odvážená na analytických váhach a obsah bol prepočítaný na g/L.

### **2.4.2 Úprava vzorky**

Produktom kultivácií *A. pullulans* sú okrem iného aj 2 extracelulárne polyméry, a to pullulán a poly-L-jablčná kyselina. Naša analýza pomocou HPLC sa zamerala predovšetkým na produkciu pullulánu, ktorý bol predmetom skúmania práce.

Kyslá hydrolyza – bola uskutočnená pomocou 2M kyseliny sírovej. K 1 mL vzorky supernatantu bol pridaný 1 mL kyseliny sírovej. Samotná hydrolyza prebiehala pri teplote 90°C po dobu 24 hodín. Optimalizácia metódy bola uskutočnená už v mnohých v predchádzajúcich prácach. Vzorky supernatantov získaných po centrifugácii biomasy (kapitola 2.3.1) pre jednotlivé kultivácie boli premerané pred a po použití kyselí hydrolyzy metódou HPLC.

### **2.4.3 Stanovenie obsahu glukózy a ECP metódou HPLC**

Vzorkám, ktoré boli pripravené na meranie glukózy bolo upravené pH na hodnotu v rozmedzí 5-7. Následne boli jednotlivé vzorky vhodne nariadené a zbavené nečistôt filtráciou cez striekačkový filter (0,45 µm). Analýza prebiehala na HPLC Agilent Infinity 1260 s využitím ELSD detektora. Ako mobilná fáza bola použitá zmes acetonitrilu a vody (75:25), prietok mobilnej fázy bol nastavený na 1 ml/min. Kolóna použitá na separáciu mala nasledujúce parametre: Prevail Carbohydrates ES 5µ; (250 x 4,6 mm; 5 µm). Detektor bol nastavený na teplotu evaporácie 65°C, nebulizačná teplota bola 90°C a prietok plynu 9,9 Mv.

Obsah pullulánu bol vyjadrený rozdielom obsahu glukózy pred a po aplikácii kyselí hydrolyzy (kapitola 2.4.2). Množstvo bolo vyjadrené v g/L.

### **2.5 Experimentálne podmienky Ramanovho spektrometra pri výskume *A. pullulans***

Pri experimentálnom meraní nakultivovaných a pripravených vzoriek *A. pullulans* bol použitý laser o vlnovej dĺžke 785 nm, objektív x50 a expozícia 5-20 s podľa kvality jednotlivých vzoriek. Vzorky nakultivované na tuhých médiách boli merané priamo na Petriho miskách bez predošlej úpravy. V prípade keď boli merané vzorky z tekutých kultivačných médií bola suspenzia rozotretá na špeciálne CaF podložné sklíčko (Raman grade, Crystran, UK) z dôvodu zníženia fluorescencie substrátu a vysušené v termostate pre lepšie podmienky merania danej vzorky. Spektrá boli nasnímané v rozsahu 700 – 1800 cm<sup>-1</sup>. Laser bol fokusovaný na plochu približne o rozmeroch 2 µm x 10 µm.

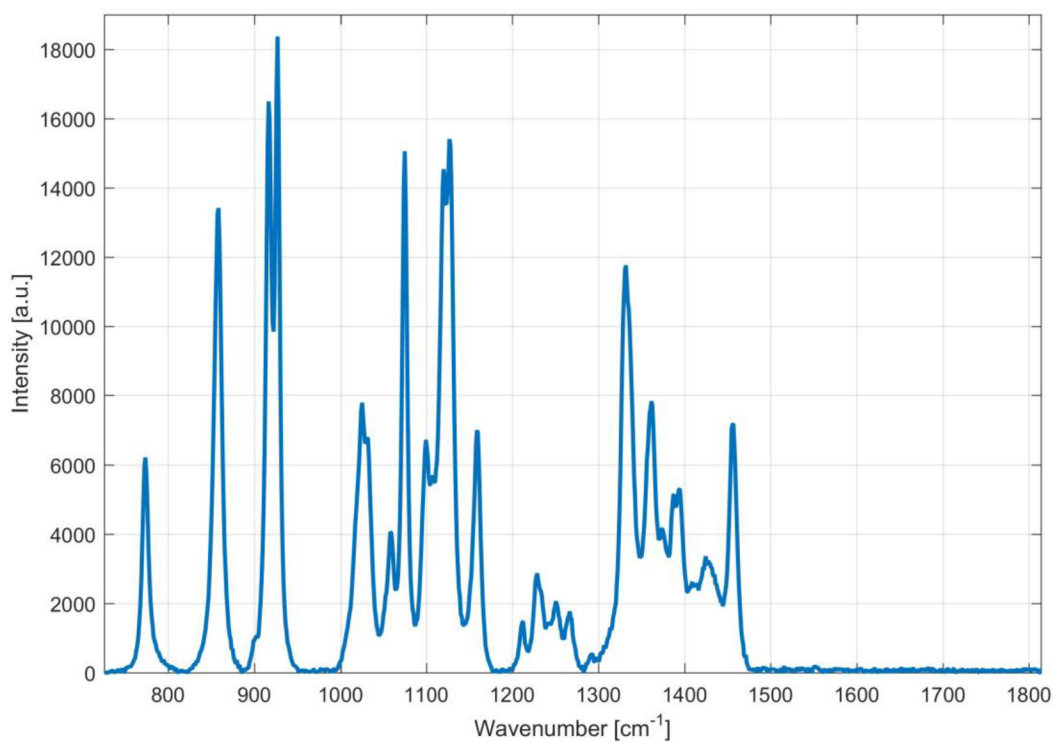
### **2.6 PCA analýza**

PCA analýza (principal component analysis) je matematická štatistická metóda, ktorá využíva ortogonálnu transformáciu na to, aby previedla prvky množiny pozorovaní, u ktorých je možné, že sú korelované, na prvky takej množiny hodnôt, ktoré sú lineárne nekorelované. Tieto sa potom označujú ako hlavné komponenty [64].

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSIA

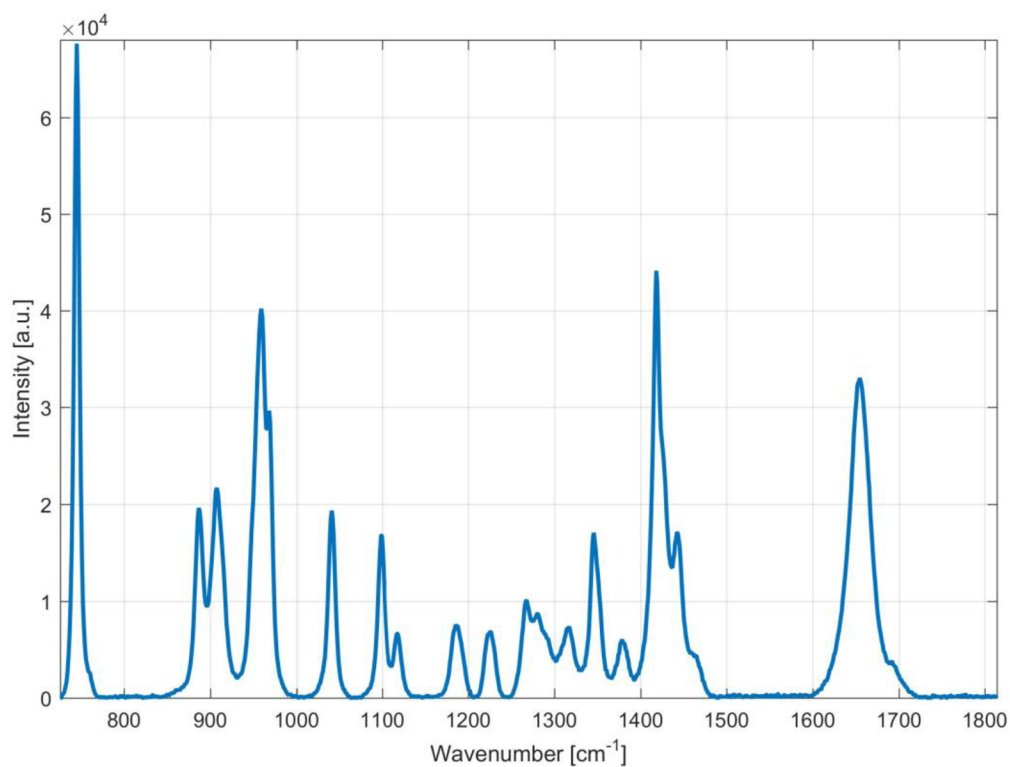
#### 3.1 Spektrá štandardov

Pred meraním jednotlivých kmeňov *A. pullulans* a akýchkoľvek iných vzoriek na Ramanovom spektrometri, boli premerané spektrá čistých látok, a to spektrum glukózy uvedené na **Obr. 10**, spektrum kyseliny L-jablčnej uvedené na **Obr. 11** a spektrum pullulánu uvedené na **Obr. 12**, na základe ktorých, bolo následne možné popísať a zhodnotiť aj spektrá jednotlivých kmeňov. Na **Obr. 13** sú popísané jednotlivé spektrá modelového organizmu a štandardu pullulánu, podľa ktorých boli zhodnotené ďalšie spektrá v tejto práci.

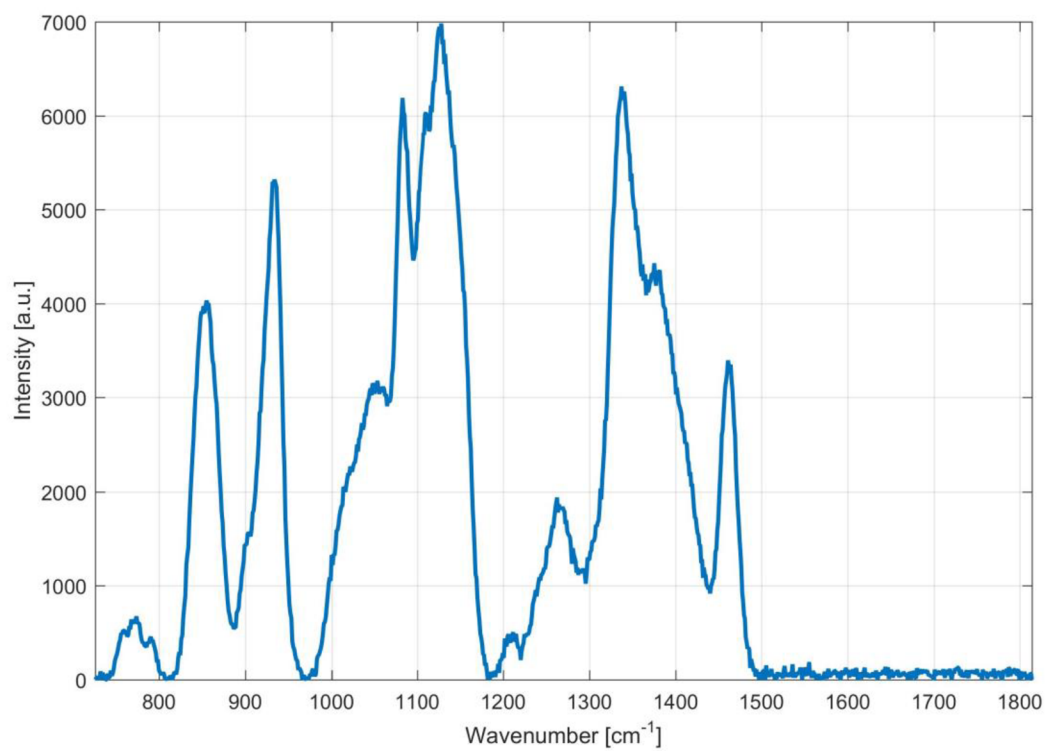


*Obr. 10* Ramanovo spektrum štandardu glukózy



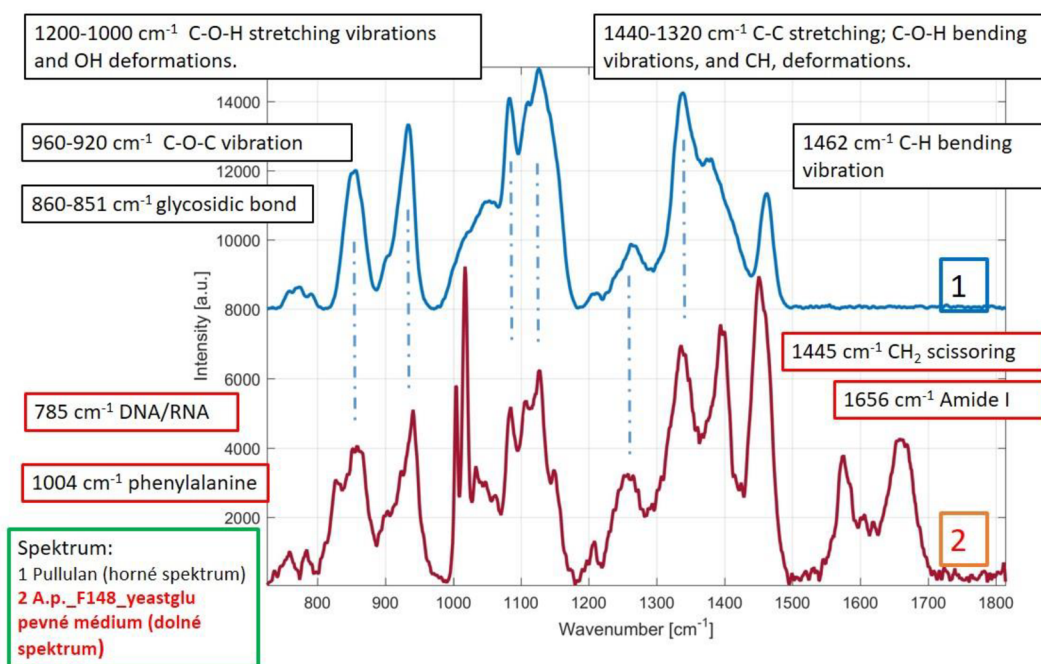


*Obr. 11 Ramanovo spektrum štandardu kyseliny L-jablčnej*



*Obr. 12 Ramanovo spektrum štandardu pullulánu*

Pri popisovaní spektier bol vybraný jeden modelový kmeň *A. pullulans*, a to kmeň F148 kultivovaný na minerálnom kultivačnom médiu s prídavkom kvasničného autolyzátu, ktoré bolo pre rast daného kmeňa najlepšie a taktiež bolo ďalšími experimentami zistené, že bolo aj najvhodnejšie ako produkčné médium pre produkciu pullulánu. Popísané boli píky, ktoré zobrazujú základné bunkové štruktúry alebo biochemické väzby na Ramanovom spektre 2 **Obr. 13**. A to najmä pík zobrazujúci DNA/RNA pri  $785\text{ cm}^{-1}$ , fenylalanín pri  $1004\text{ cm}^{-1}$ , pri  $1445\text{ cm}^{-1}$  zvyšok  $-\text{CH}_2-$  skupiny a pri  $1656\text{ cm}^{-1}$  amid I vyskytujúci sa vo všetkých bunkách. Ostatné píky boli popísané ako v spektre 2, tak aj v spektre 1, ktoré znázorňuje štandard pullulánu a dané píky viac menej korešpondujú v oboch spektrách, teda môžeme tvrdiť, že samotná produkcia pullulánu ako ECP bola pozorovaná pri meraní pomocou Ramanovho spektrometra v bunkách *A. pullulans*. Jednotlivé píky popisujú pri  $860\text{--}851\text{ cm}^{-1}$  glykozidickú väzbu, pri  $960\text{--}920\text{ cm}^{-1}$  C-O-C väzbové vibrácie, pri  $1200\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$  C-O-H napínanie väzby a OH deformáciu, pri  $1440\text{--}1320\text{ cm}^{-1}$  C-C napínanie väzby, C-O-H väzbové vibrácie a CH deformácie.



**Obr. 13** Ramanove spektrum popisujúce jednotlivé píky modelového kmeňa *A. pullulans* – spektrum 2 a Ramanove spektrum popisujúce jednotlivé píky štandardu pullulánu – spektrum 1

### 3.2 Kultivácia *A. pullulans* na tuhých médiách

Kultivácia *A. pullulans* na tuhých kultivačných médiách, ktorých zloženie je uvedené v tabuľke 1 v kapitole 2.2.1, prebiehala vždy za štandardných podmienok a to pri 30°C 3-4 dni v termostate. Dané kultivačné médiá boli využívané predovšetkým na uchovávanie kmeňov a hlavne na preskúmanie, ktoré kultivačné médium je pre aký kmeň vhodné. Na základe toho bol potom vybraný pre ďalšie experimenty len jeden kmeň, ktorý bol najstabilnejší a rástol viac menej bez problémov. V rámci týchto experimentov sme zistili aj to, že kmeň DSMZ, ktorý bol kultivovaný taktiež na všetkých 3 kultivačných médiách vykazoval nadmernú čiernu pigmentáciu už po prvých 3 dňoch štandardnej kultivácie a to na minerálnom médiu, **Obr. 14**. Na ostatných 2 médiách rástol tento kmeň štandardným spôsobom. Na základe tohto bolo zistené, že dané médium nebolo vhodné na kultiváciu tohto kmeňa. Pri tuhých médiách boli porovnávané aj rôzne zdroje uhlíka, a to glukózy a sacharózy, avšak počas kultivácií bolo zistené, že na štandardných médiách s glukózou rástli všetky 3 kmene *A. pullulans* omnoho lepšie ako po prídavku sacharózy, preto nie sú tieto výsledky uvádzané, nakoľko pri kultivácii kmene rástli veľmi zle, nestálo alebo vôbec.

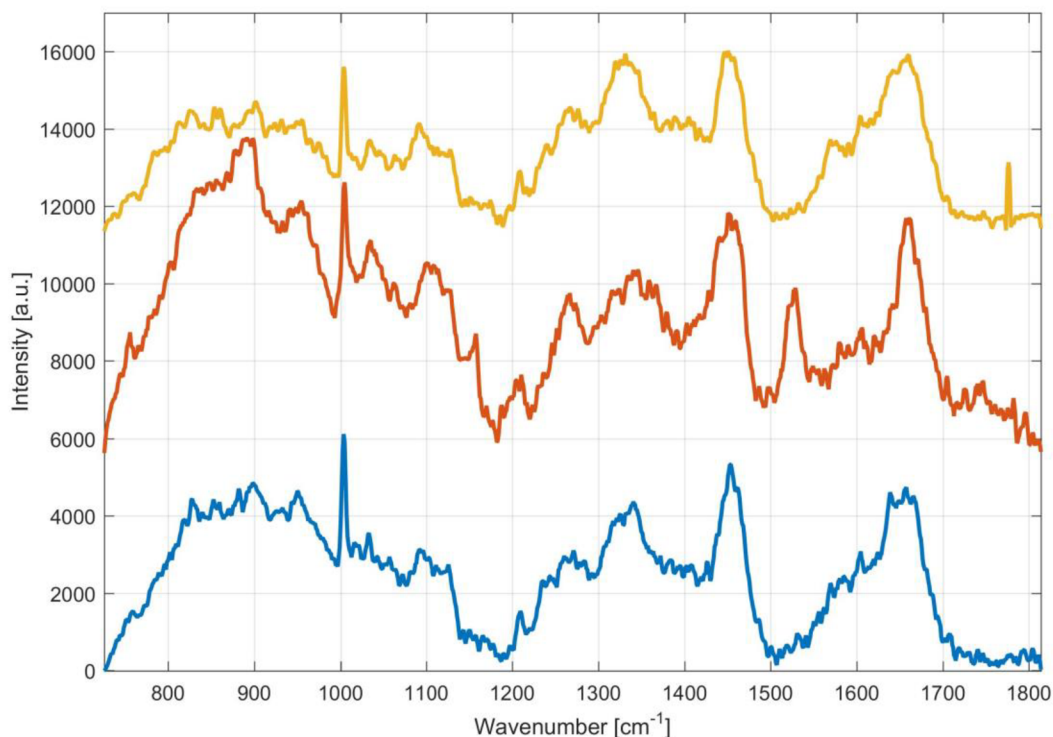


**Obr. 14** Porovnanie kultivačných médií pri kultivácii *A. pullulans* kmeňa DSMZ, z ľava minerálne médium s nadmernou pigmentáciou, vedľa YPD médium so štandardným rastom daného kmeňa

#### 3.2.1 Pevné YPD médium

Pevné YPD médium, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 1 bolo štandardne používané ako porovnávacie médium, nakoľko na ňom všetky kmene rástli dobre, stabilne a bez výrazných komplikácií a kultivácia prebiehala za štandardných podmienok uvedených v kapitole 3.2.

Počas meraní vzoriek jednotlivých kmeňov na YPD médiu na Ramanovom spektrometri bolo zistené, že toto médium je vhodné na rast a tiež bolo využité ako vhodné médium na fylogenetické porovnanie jednotlivých kmeňov na základe získaných spektier. Na **Obr. 15** môžeme vidieť, že spektrá jednotlivých kmeňov sú veľmi podobné. Určité odlišnosti medzi kmeňmi viditeľné na tomto spektre sú za základe toho, ako ktorému kmeňu vyhovovalo pevné YPD médium a najmä ako bol ktorý kmeň schopný aj produkcie ECP na danom médiu. Vo všetkých 3 spektrách sú vidieť základné píky, ktoré prislúchajú základným bunkovým štruktúram alebo biochemickým väzbám a taktiež píky, ktoré prislúchajú nami sledovanému ECP, a to pullulánu, ktoré sú zároveň taktiež popísané na **Obr. 13**. Na základe tohto spektra môžeme tvrdiť, že najvýraznejšie píky vykazovalo červené spektrum znázornené na **Obr. 15**, ktoré prislúcha kmeňu DSMZ.

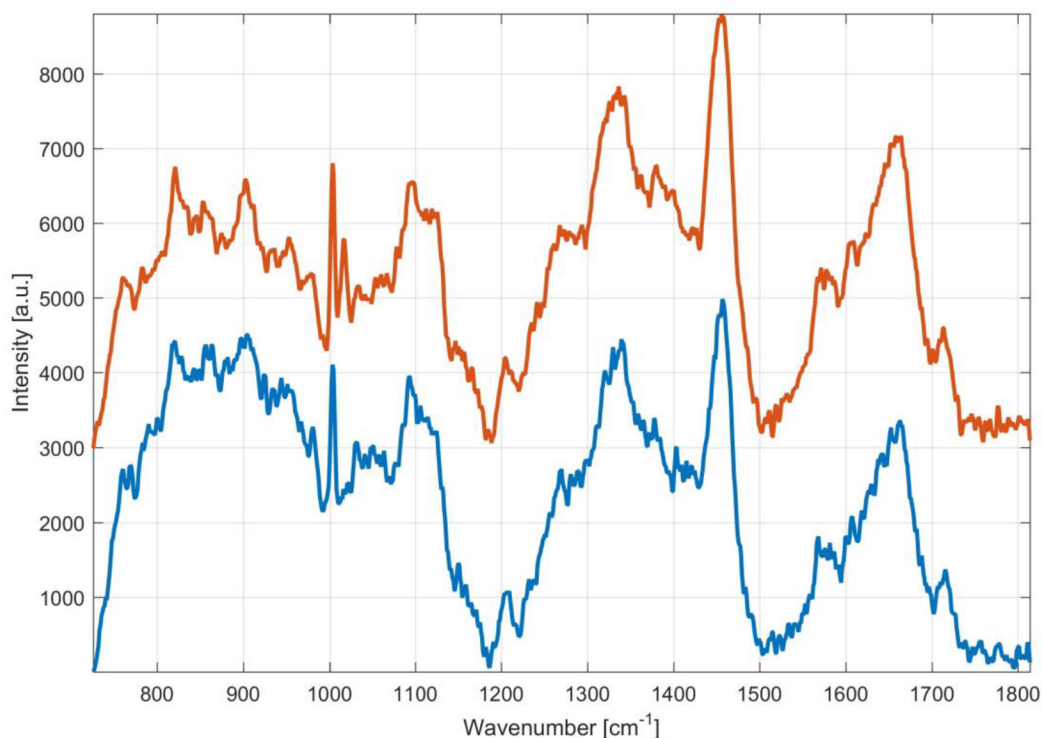


**Obr. 15** Kultivácia *A. pullulans* na YPD médiu; modré spektrum zodpovedá kmeňu 8182, červené spektrum zodpovedá kmeňu DSMZ a žlté spektrum zodpovedá kmeňu F148

### 3.2.2 Pevné minerálne médium s prídavkom kvasničného autolyzátu

Pre pevné minerálne média s prídavkom kvasničného autolyzátu boli použité štandardné kultivačné podmienky, ktoré sú uvedené v kapitole 3.2, zloženie kultivačného média je uvedené v tabuľke 1. Na tomto kultivačnom médiu boli kultivované dva kmene *A. pullulans*, a to kmeň 8182 a kmeň F148. Za základe viacerých kultivácií boli zistené, že dané médium

obom kmeňom vyhovovalo, avšak kmeň F148 rástol lepšie a stabilnejšie na tomto type média ako kmeň 8182. Pri meraní na Ramanovom spektrometri týchto dvoch kmeňov bola zistená a preukázaná vysoká podobnosť spektier na danom kultivačnom médiu a tiež sa toto médium javilo aj ako najvhodnejšie médium na produkciu pullulánu, čo môžeme vidieť na **Obr. 16**.

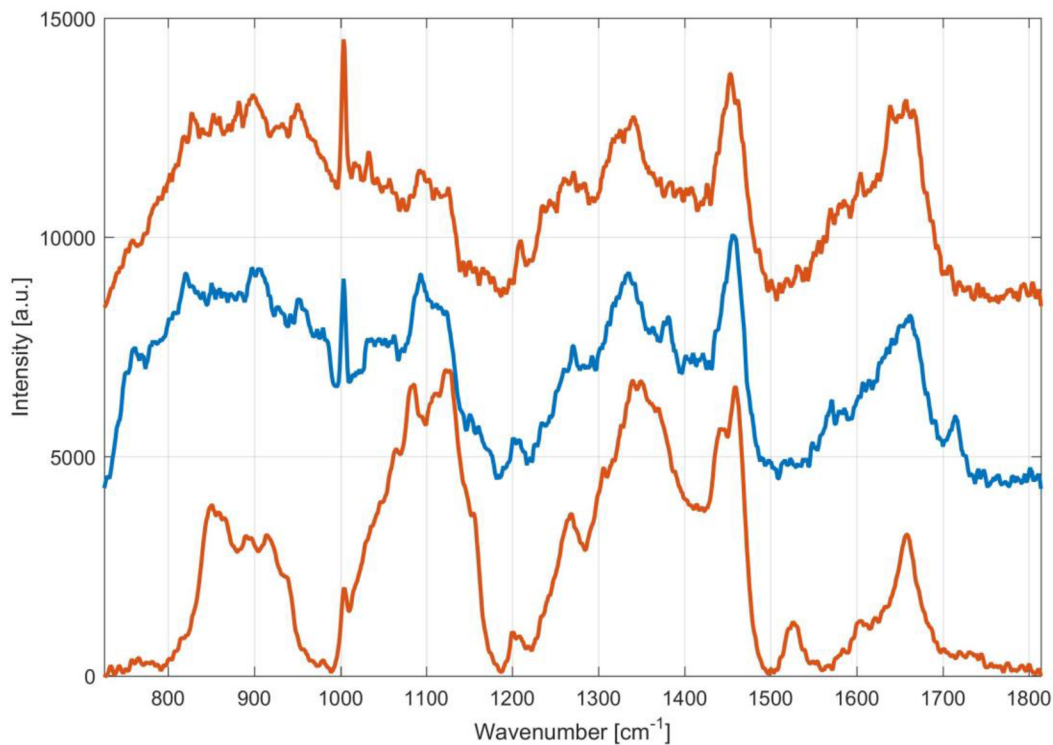


**Obr. 16** Kultivácia *A. pullulans* na minerálnom médiu s prídavkom kvasničného autolyzátu; modré spektrum zodpovedá kmeňu 8182, červené spektrum zodpovedá kmeňu F148

### 3.2.3 Pevné minerálne médium

Pre pevné minerálne médium boli pri kultivácii použité rovnaké podmienky ako u predošlých kultivačných médií, uvedené v kapitole 3.2 a jeho zloženie je uvedené v tabuľke 1. Pri kultivácii *A. pullulans* na tomto type kultivačného média bolo zistené, že toto médium nie je vhodným médiom na kultiváciu všetkých 3 kmeňov, nakoľko na ňom najlepšie rástol kmeň 8182 a ostatné 2 kmene na tomto médiu nerástli alebo rástli nevhodne na to, aby bolo možné s nimi ďalej pokračovať pri meraniach na Ramanovom spektrometri. Na základe tohto zistenia bolo použité spektrum len kmeňa 8182, ako môžeme vidieť aj na **Obr. 17**, kde je porovnanie spektier daného kmeňa na všetkých 3 typoch kultivačných médií. Ako je aj z obrázku zrejmé, tento typ kultivačného média bol pre kmeň 8182 najvhodnejší, piky sú oproti ďalším dvom typom média intenzívnejšie a v porovnaní aj s popísaným spektrom

pullulánu na **Obr. 13**, môžeme tvrdiť že médium u tohto kmeňa by bolo aj najvhodnejším médiom na produkciu pullulánu.



**Obr. 17** Kultivácia *A. pullulans* 8182 na 3 rôznych médiách; spodné červené spektrum zodpovedá minerálnemu médiu, modré spektrum zodpovedá YPD médiu a horné červené spektrum zodpovedá minerálnemu médiu s prídavkom kvasnič. autolyzátu

### 3.3 Kultivácia *A. pullulans* v kvapalných médiách

Pri kultivácii *A. pullulans* v kvapalných kultivačných médiách bol pri ďalších experimentoch použitý už len jeden vybraný kmeň, a to DSMZ, ktorý bol najstabilnejší, vykazoval najlepšiu rast a tiež aj najlepšiu produkciu EPC. Kultivácia prebiehala za štandardných podmienok, ktoré sú uvedené v kapitole 2.2.2.

#### 3.3.1 Stanovenie rastovej krivky pomocou *A. pullulans*

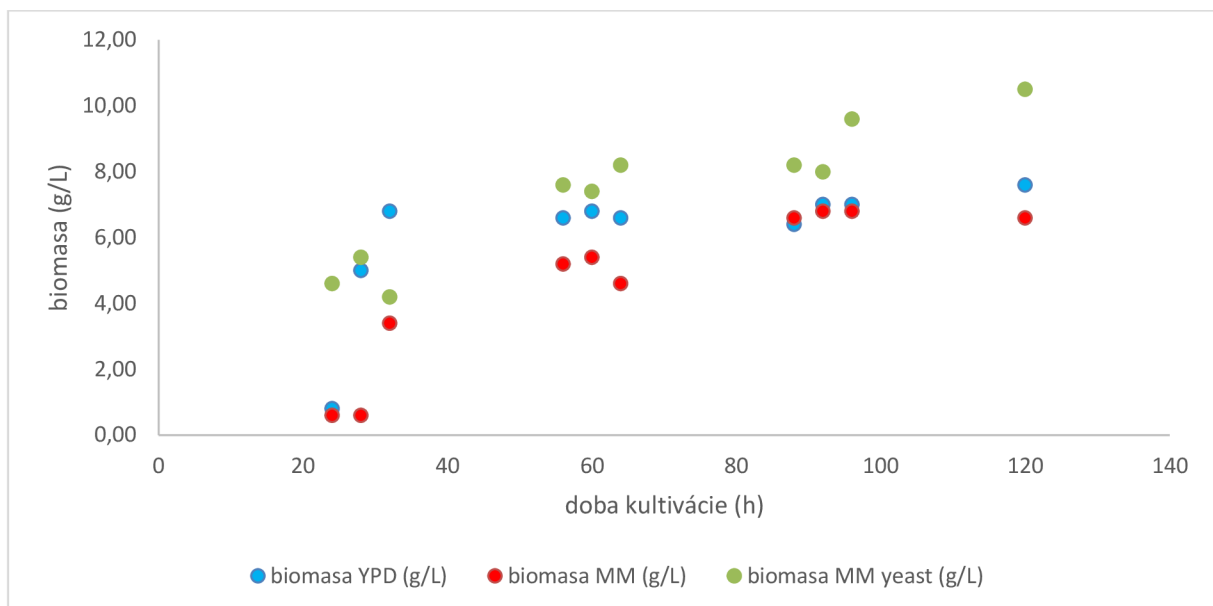
Pri meraní rastovej krivky mikroorganizmu *A. pullulans* kmeňa DSMZ bol sledovaný prírastok biomasy gravimetrickým stanovením sušiny. Rastová krivka bola vyhodnocovaná na 3 kultivačných médiách, a to na YPD médiu, minerálnom médiu a minerálnom médiu s prídavkom kvasničného autolyzátu. Na základe nameraných a vypočítaných hodnôt, ktoré sú uvedené v tabuľke 3, boli následne tieto rastové krivky vynesené do grafu 1. Na základe získaných výsledkov bolo zistené, že najväčší prírastok biomasy bol v rámci minerálneho kultivačného média s prídavkom kvasnič. autolyzátu. V ďalších dvoch kultivačných médiách

bol prírastok biomasy nižší. Stacionárna fáza nastala približne okolo 96 h. Zloženie jednotlivých kultivačných médií je uvedené v tabuľke 2.

*Tabuľka 3* Namerané hodnoty *A. pullulans* kmeňa DSMZ pre zostavenie rastových kriviek na jednotlivých kultivačných médiách

čas (deň)	čas (h)	biomasa YPD (g/L)	biomasa MM (g/L)	biomasa MM yeast (g/L)
ut	24	0,80	0,60	4,60
ut	28	5,00	0,60	5,40
ut	32	6,80	3,40	4,20
str	56	6,60	5,20	7,60
str	60	6,80	5,40	7,40
str	64	6,60	4,60	8,20
štvr	88	6,40	6,60	8,20
štvr	92	7,00	6,80	8,00
štvr	96	7,00	6,80	9,60
pia	120	7,60	6,60	10,50

*Graf 1* Rastová krivka *A. pullulans* kmeňa DSMZ na jednotlivých kultivačných médiách



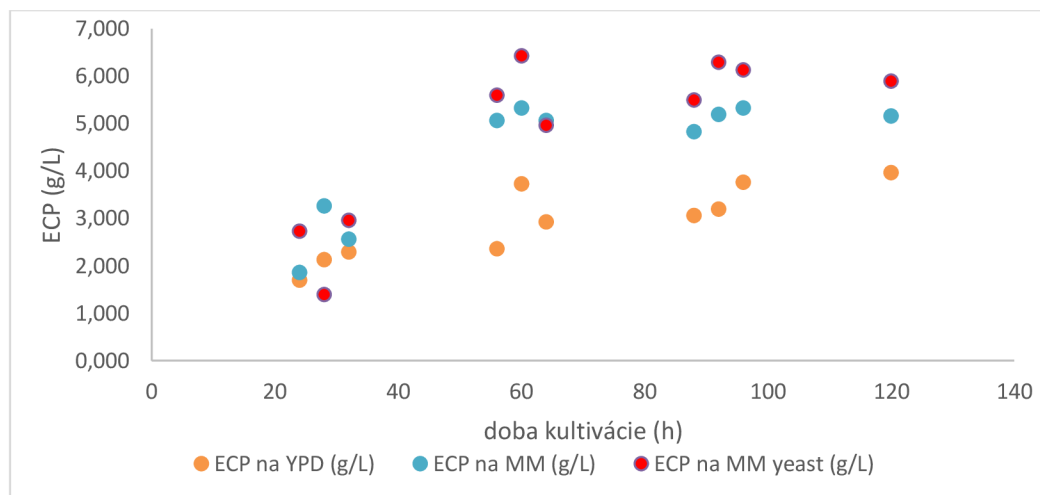
### 3.3.2 Stanovenie rastovej krivky produkcie pullulánu pomocou *A. pullulans*

Pri meraní rastovej krivky produkcie pullulánu mikroorganizmu *A. pullulans* kmeňa DSMZ bol sledovaný prírastok pullulánu ako extracelulárneho produktu gravimetrickým stanovením sušiny. Rastová krivka bola taktiež vyhodnocovaná na 3 kultivačných médiách ako v predošlej kapitole, a to na YPD médiu, minerálnom médiu a minerálnom médiu s prídavkom kvasničného autolyzátu. Na základe nameraných a vypočítaných hodnôt, ktoré sú uvedené v tabuľke 4, boli následne tieto rastové krivky vynesené do grafu 2. Zo získaných a zaznamenaných výsledkov bolo zistené, že najväčší prírastok pullulánu bol opäť v rámci minerálneho kultivačného média s prídavkom kvasnič. autolyzátu. V ďalších dvoch kultivačných médiách bol prírastok pullulánu nižší. Zloženie jednotlivých kultivačných médií je uvedené v tabuľke 2.

**Tabuľka 4** Namerané hodnoty *A. pullulans* kmeňa DSMZ pre zostavenie závislosti produkcie ECP na dobe kultivácie na jednotlivých kultivačných médiách

čas (deň)	čas (h)	ECP na YPD (g/L)	ECP na MM (g/L)	ECP na MM yeast (g/L)
ut	24	1,700	1,867	2,733
ut	28	2,133	3,267	1,400
ut	32	2,300	2,567	2,967
str	56	2,367	5,067	5,600
str	60	3,733	5,333	6,433
str	64	2,933	5,067	4,967
štv	88	3,067	4,833	5,500
štv	92	3,200	5,200	6,300
štv	96	3,767	5,333	6,133
pia	120	3,967	5,167	5,900

**Graf 2** Závislosť koncentrácie ECP na dobe kultivácie na jednotlivých kultivačných médiách





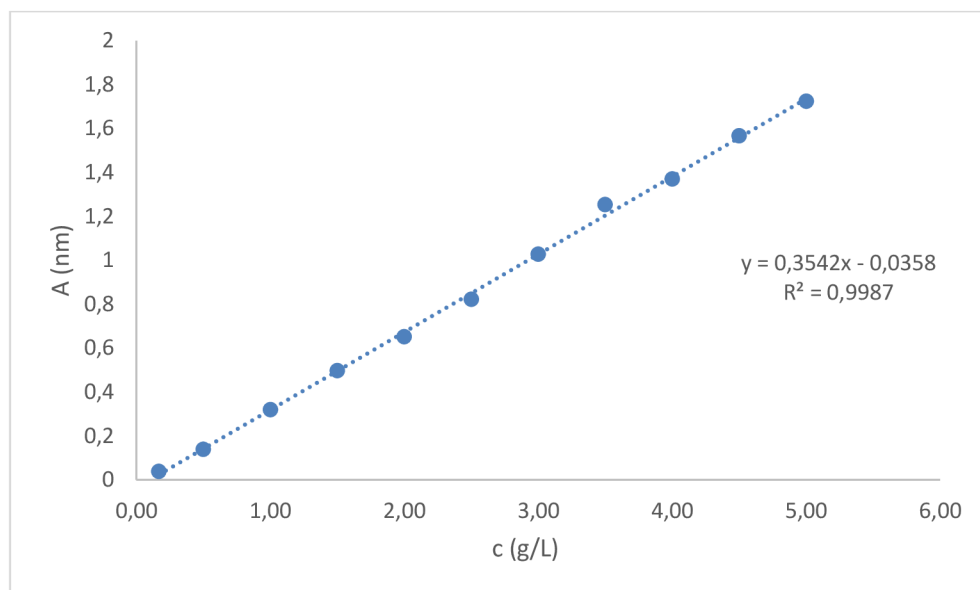
### 3.4 Stanovenie celkových sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny

Stanovenie redukujúcich sacharidov pomocou 3,5-dinitrosalicylovej kyseliny bolo uskutočnené na základe postupu uvedeného v kapitole 2.3.2. Namerané a vypočítané hodnoty sú uvedené v tabuľke 5 a boli vynesené do grafu 3. Obsah redukujúcich sacharidov bol následne vypočítaný dosadením do rovnice kalibračnej priamky, ktorá je uvedená v grafe 3. Táto metóda bola zvolená len ako orientačná na základe toho, že pri tejto metóde dochádza k reakcii všetkých prítomných redukujúcich sacharidov, teda nie len glukózy, ktorá bola predmetom záujmu a ktorá slúži ku kvantifikácii pullulánu.

Tabuľka 5 Tabuľka hodnôt pre stanovenie kalibračnej krivky a vypočítanej koncentrácie glukózy

Médium/A	A1	A2	A3	A (priemer)	c (g/L)
YPD	0,009	0,003	/	0,006	0,1180
MM	0,562	0,562	0,564	0,563	1,6896
MM-yeast	0,341	0,346	0,34	0,342	1,0676

Graf 3 Kalibračná priamka kyseliny DNS



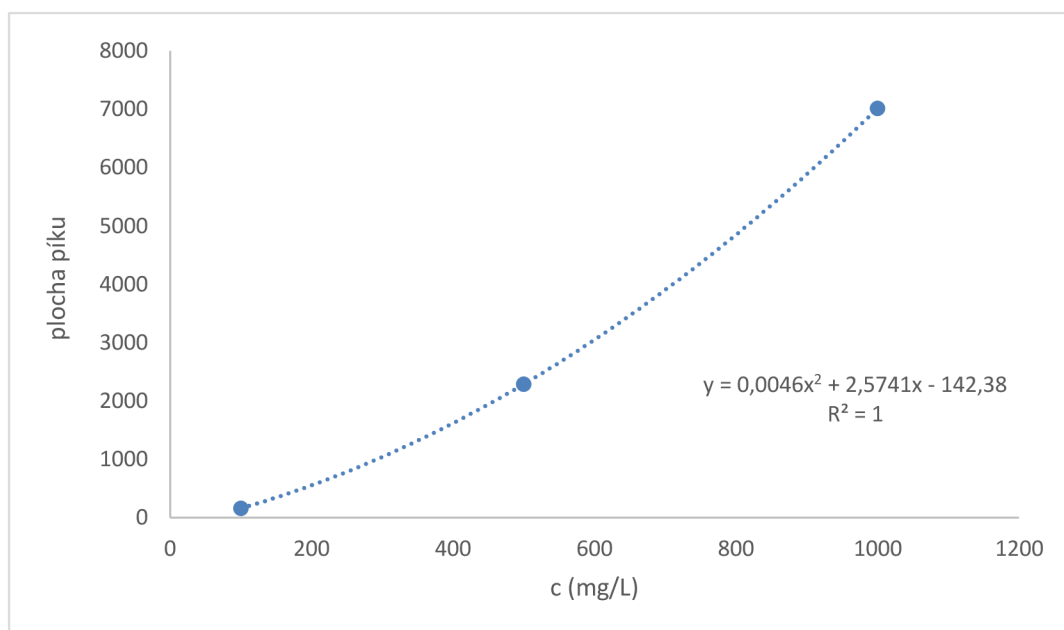
### 3.5 Stanovenie obsahu glukózy a ECP pomocou HPLC

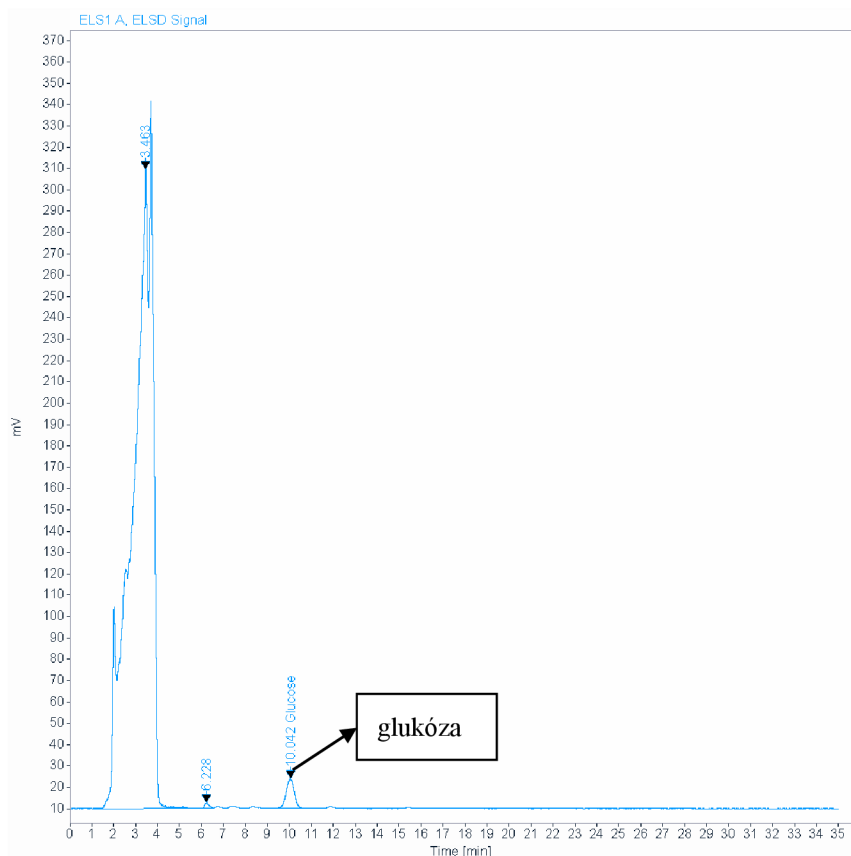
Pri stanovovaní obsahu glukózy a pullulánu pomocou metódy HPLC bol použitý jeden kmeň *A. pullulans*, a to kmeň DSMZ, ktorý bol kultivovaný na 3 rôznych kultivačných médiách, ktorých zloženie je uvedené v tabuľke 2. Postup a parametre metódy HPLC sú uvedené v kapitole 2.4.3 a postup na úpravu vzoriek v kapitole 2.4.2.

Na získane vypočítaných hodnôt v tabuľke, ktoré prístroj HPLC nedokázal priamo vyhodnotiť, v dôsledku nevhodného rozlíšenia píkov boli chýbajúce hodnoty koncentrácie dopočítané za základe zostrojenia kalibračnej krivky, ktorá je uvedená v grafe 4 a následným dosadením získaných plôch píkov do prislúchajúcej rovnice taktiež uvedenej v grafe 4. Na ilustráciu je na Obr. 18 uvedený chromatogram vyhodnotený prístrojom HPLC s označením píku glukózy, ktorej obsah bol stanovovaný.

V tabuľkách 6 a 7 sú uvedené vypočítané hodnoty koncentrácií obsahu glukózy pred a po kyslej hydrolýze jednotlivých vzoriek zvlášť pre každé kultivačné médium, ktoré boli odoberané v stanovených časových intervaloch. Na základe tabuliek 6 a 7 je zrejmé, že minerálne kultivačné médium a minerálne kultivačné médium s prídavkom kvasničného autolyzátu boli vhodne vybranými médiami, čo potvrdzuje aj tabuľka 8 v ktorej je stanovený obsah ECP pullulánu pomocou HPLC. YPD kultivačné médium, ktoré bolo vybrané najmä ako porovnávacie kultivačné médium nevykazovalo takéto výsledky, dokonca vo väčšine vzoriek nebolo ani detekované touto metódou.

**Graf 4** Kalibračná krivka glukózy pri metóde HPLC





Obr. 18 Ilustračný chromatogram metódy HPLC

Tabuľka 6 Stanovenie glukózy pomocou metódy HPLC pred hydrolyzou

čas (deň)	čas (h)	$c_{\text{sachYPD}}$ (g/L) pred hydr.	$c_{\text{sachMM}}$ (g/L) pred hydr.	$c_{\text{sachMM\_yeast}}$ (g/L) po hydr.
ut	24	10,7854	48,3856	51,6256
ut	32	ND	45,8897	48,8044
str	56	ND	ND	27,3173
str	64	ND	31,7523	ND
štv	88	ND	22,8242	16,7111
štv	96	ND	19,2676	20,7010
pia	120	ND	19,0408	17,0281

Tabuľka 7 Stanovenie glukózy pomocou metódy HPLC po hydrolyze

čas (deň)	čas (h)	$c_{\text{sachYPD}}$ (g/L) po hydr.	$c_{\text{sachMM}}$ (g/L) po hydr.	$c_{\text{sachMM\_yeast}}$ (g/L) po hydr.
ut	24	3,0466	18,1798	30,5632
ut	32	1,3116	18,5697	25,2029
str	56	1,2987	13,3907	14,8344
str	64	1,2307	14,2225	10,8426
štv	88	0,7113	12,0841	9,4868
štv	96	0,7197	9,4925	9,3460
pia	120	0,8374	6,8915	7,5493

Tabuľka 8 Stanovenie obsahu pullulánu pomocou metódy HPLC

čas (deň)	čas (h)	pullulán <sub>YPD</sub> (g/L)	pullulán <sub>MM</sub> (g/L)	pullulán <sub>MM_ yeast</sub> (g/L)
ut	24	7,7387	30,2058	21,0625
ut	32	ND	27,3200	23,6015
str	56	ND	ND	12,4829
str	64	ND	17,5298	ND
štv	88	ND	10,7401	7,2244
štv	96	ND	9,7751	11,3551
pia	120	ND	12,1493	9,4788

### 3.6 Submerzná kultivácia pre meranie na Ramanovom spektrometri

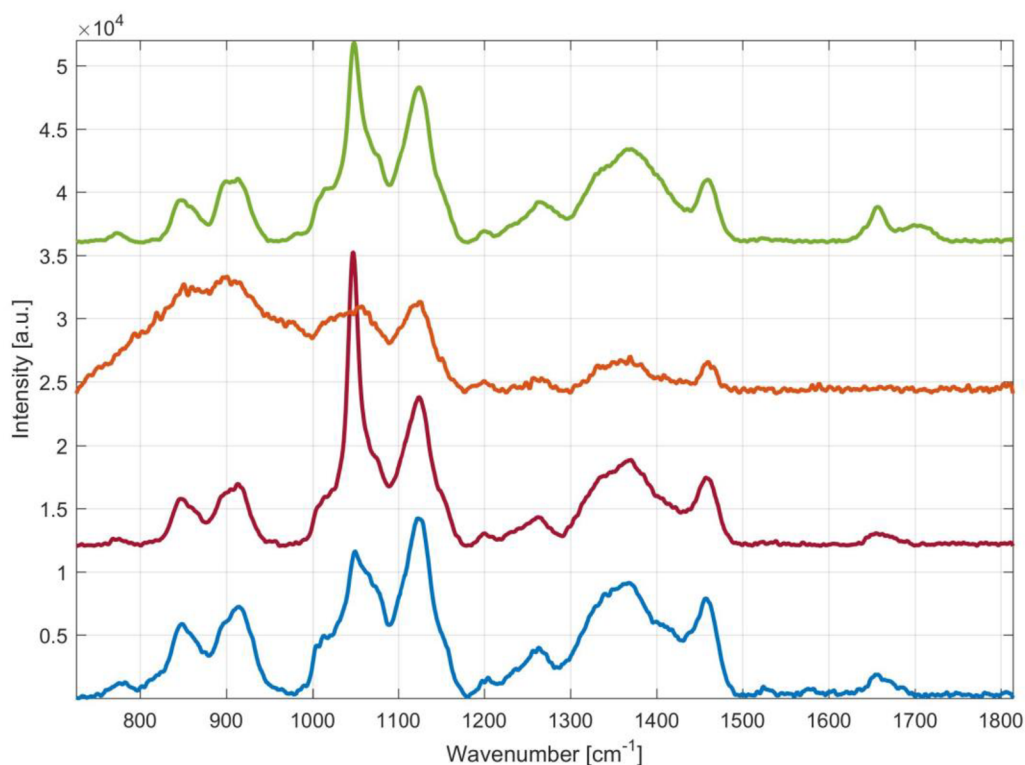
Submerzná kultivácia pre meranie na Ramanovom spektrometri bola vykonávaná pre kultiváciu *A. pullulans* na produkciu ECP, a to aj kyseliny poly-L-jablčnej aj pullulánu. Zistené výsledky sú uvedené v kapitolách nižšie.

#### 3.6.1 Submerzná kultivácia *A. pullulans* pre produkciu kyseliny poly-L-jablčnej

Submerzná kultivácia *A. pullulans* pre produkciu kyseliny poly-L-jablčnej bola vykonávaná na rôznych kultivačných médiách za štandardných kultivačných podmienok, a to pri 30°C v temperovanej trepačke pri 160 rpm. Jednotlivé kultivačné médiá boli štandardné minerálne médiá vždy s prídavkom konkrétnej obohacujúcej zložky, na základe čoho bola sledovaná produkcia kyseliny poly-L-jablčnej. Všetky namerané a zistené údaje sú zaznamenané v tabuľke 6. Pri meraní jednotlivých vzoriek nakultivovaných kultivačných médií s obohacujúcou zložkou na Ramanovom spektrometri môžeme v spektrách jednotlivých vzoriek vidieť určité rozdiely v intenzite pík. Vzorky boli merané na špeciálnych CaF<sub>2</sub> podložných sklíčkach, z dôvodu zníženia fluorescencie substrátu. Na základe nameraných spektier vzoriek, ktoré sú znázornené na Obr. 19, sme zistili, že kultivačné médium s prídavkom uhličitanu vápenatého, ktorý bol aj v predošlých štúdiách do médií pridávaný na zvýšenie produkcie PMLA, vykazovalo najvyšší prírastok tohto polyméru, taktiež aj médium s prídavkom kyseliny fumarovej. Na druhej strane klasické minerálne médium, ktoré nebolo obohatené žiadnou zložkou malo minimálny, alebo žiadny prírastok tohto polyméru.

**Tabuľka 6** Tabuľka znázorňujúca obsah biomasy a ECP – kyseliny poly-L-jablčnej na rôznych kultivačných médiách

	zdroj uhlíka	biomasa (g/l)	ECP (g/l)	zvyšková glukóza (g/l)	MA (g/l)
A	laktóza	1,260 ± 0,822	2,550 ± 0,241		
B	uhličitan vápenatý	12,790 ± 0,322	2,100 ± 0,204	19,105 ± 0,299	1,418
C	kyselina fumarová	8,780 ± 0,415	3,550 ± 0,291	32,134 ± 0,108	0,990
D	dusičnan amónny	12,460 ± 0,258	3,600 ± 0,312	19,442 ± 0,101	1,306
E	MM_yeast	12,460 ± 0,824	5,350 ± 0,412	26,135 ± 0,154	



**Obr. 19** Kultivácia *A. pullulans* DSMZ na produkciu kyseliny poly-L-jablčnej na rôznych kultivačných médiách; od spodu modré spektrum zodpovedá médiu s prídavkom  $\text{CaCO}_3$ , fialové spektrum zodpovedá médiu s  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , červené spektrum zodpovedá klasickému kultivačnému médiu a zelené spektrum zodpovedá médiu s prídavkom kyseliny fumarovej

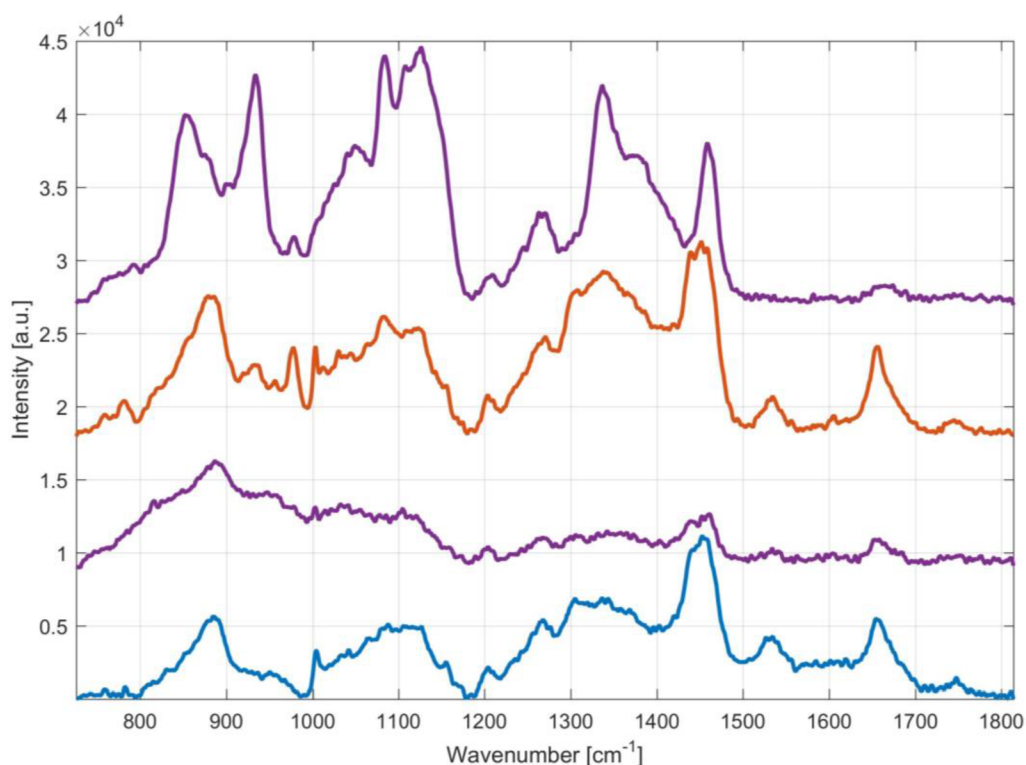
Pri porovnávaní týchto spektier so spektrami už popísanými na **Obr. 13** bolo zistené, že pre vzorky kultivované na médiách s kyslinou poly-L-jablčnou vykazujú príslušné spektrá dva intenzívne píky na hodnote  $1050 \text{ cm}^{-1}$  a  $1130 \text{ cm}^{-1}$ . Môžeme teda predpokladať, že prislúchajú kyseline poly-L-jablčnej, ktorej referenčné spektrum je ťažké získať, pretože nie je žiadna štúdia zaoberajúca sa produkciou tohto polyméru pomocou Ramanovej spektroskopie. A keďže tieto intenzívne píky neprislúchajú žiadnym známym bunkovým

väzbám vyskytujúcich sa u štandardne kultivovaných buniek a tiež ani neprislúchajú píkom zo spektra štandardu pullulánu, môžeme tvrdiť, že tieto píky sú teda skutočne znázorňujúce aspoň časť spektra kyseliny poly-L-jablčnej.

### **3.6.2 Submerzná kultivácia *A. pullulans* pre produkciu pullulánu**

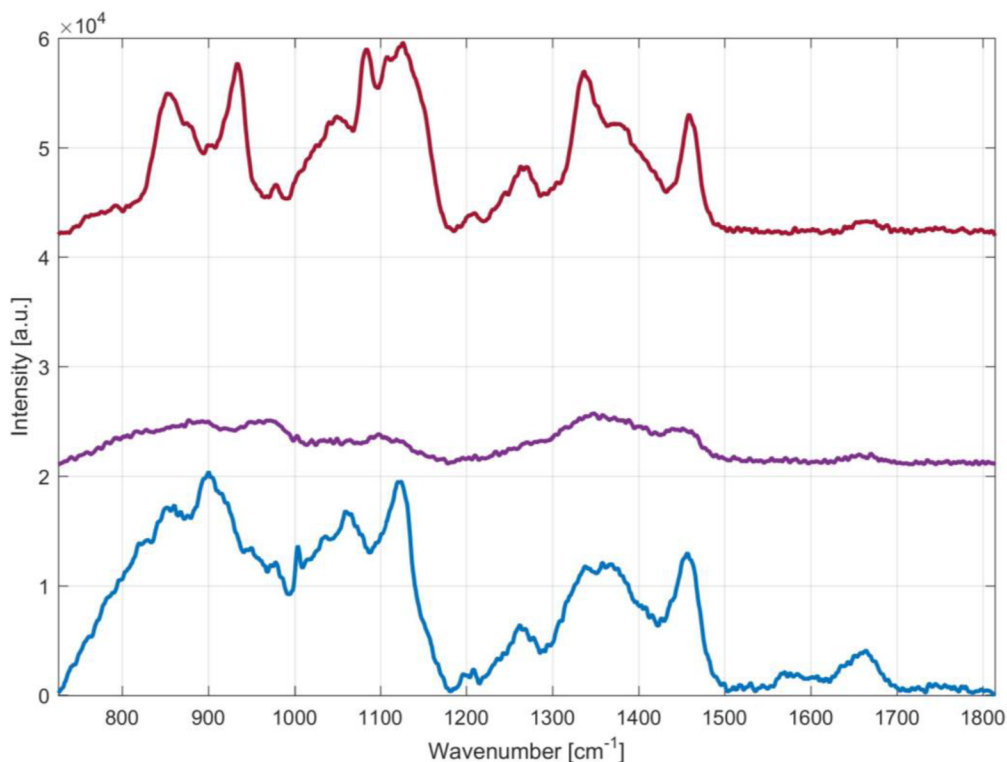
Submerzná kultivácia *A. pullulans* pre produkciu pullulánu bola vykonávaná pri všetkých 3 kmeňoch a na minerálnom kultivačnom médiu s prídavkom kvasnič. autolyzátu, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke 2, za štandardných kultivačných podmienok, a to pri 30°C v temperovanej trepačke pri 160 rpm. Ako vzorky sme v tomto experimente použili pri meraní na Ramanovom spektrometri samotné kultivačné médium; odstredenú bunky, teda biomasu; supernatant; bunky biomasy premyté PBS pufrom a vyzrážaný produkt, teda pullulán. Vzorky boli merané na špeciálnych CaF podložných sklíčkach, z dôvodu zníženia fluorescencie substrátu. Napriek kultivácii všetkých 3 kmeňov, najlepší rast vykazoval kmeň DSMZ a taktiež aj najlepšiu produkciu produktu.

Pri meraní jednotlivých vzoriek, ktoré pred meraním neboli špeciálne upravované sme zistili, že bolo možné premerať všetky vzorky okrem supernatantu, z dôvodu že vzorka neobsahovala žiadnu biomasu len čistý supernatant a prístroj nebol schopný takéto spektrum zaznamenať. Spektrá ďalších vzoriek sú zaznamenané na Obr. 20, kde modré spektrum obsahuje len biomasu avšak nepremytú PBS pufrom, teda v malom množstve sa v tomto spektre premieta kultivačné médium a mierne aj píky samotného pullulánu, na druhej strane vzorka s premytými bunkami už neobsahuje stopy kultivačného média a teda sa v spektre premietajú len píky, ktoré prislúchajú základným bunkovým štruktúram alebo biochemickým väzbám, ale aj to v nízkej intenzite. Spektrum s nakultivovaným kultivačným médiom obsahuje píky, ktoré zobrazujú znázorňujú ako bunkové štruktúry a biochemické väzby, tak aj píky samotného naprodukovaného pullulánu bunkami *A. pullulans*. Spektrum samotného pullulánu, ktoré skoro dokonale korešponduje so spektrom pullulánu štandardu je výsledkom kultivácie buniek *A. pullulans* a produkcia tohto produktu, bola cieľom tejto práce.



*Obr. 20 Ramanove spektrá zobrazujúce jednotlivé vzorky submerznej kultúry A. pullulans kmeňa DSMZ; 1. modré spektrum zobrazujúce odstredené bunky z kultivačného média, 2. fialové spektrum znázorňuje odstredené a premyté bunky pomocou PBS pufru, 3. červené spektrum znázorňuje samotné kultivačné médium aj s nakultivovanou biomasou a 4. fialové spektrum znázorňuje samotný ECP produkt – vyvrážený pullulán*

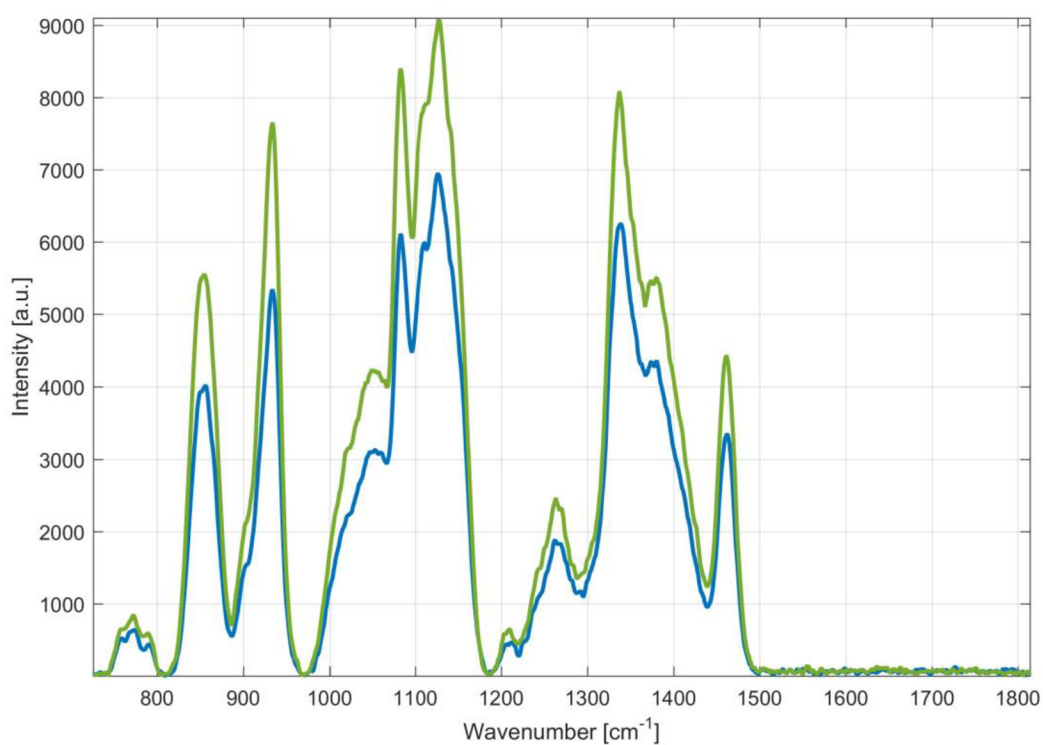
Pri meraní pripravených vzoriek kmeňa 8182 na Ramanovom spektrometri sme zistili, že daný kmeň mal omnoho menšiu produkciu biomasy a tým aj pullulánu v porovnaní s kmeňom DSMZ. Na základe tejto skutočnosti, že kmeň naprodukoval malé množstvo biomasy nebolo možné zmerať vhodné spektrum kultivačného média s biomasou. Teda vzorky, ktorých spektrá bolo možné zmerať boli 3, a to nepremyté bunky, bunky premyté PBS pufrom a samotný produkt, pullulán a tieto môžeme vidieť na **Obr. 21**.



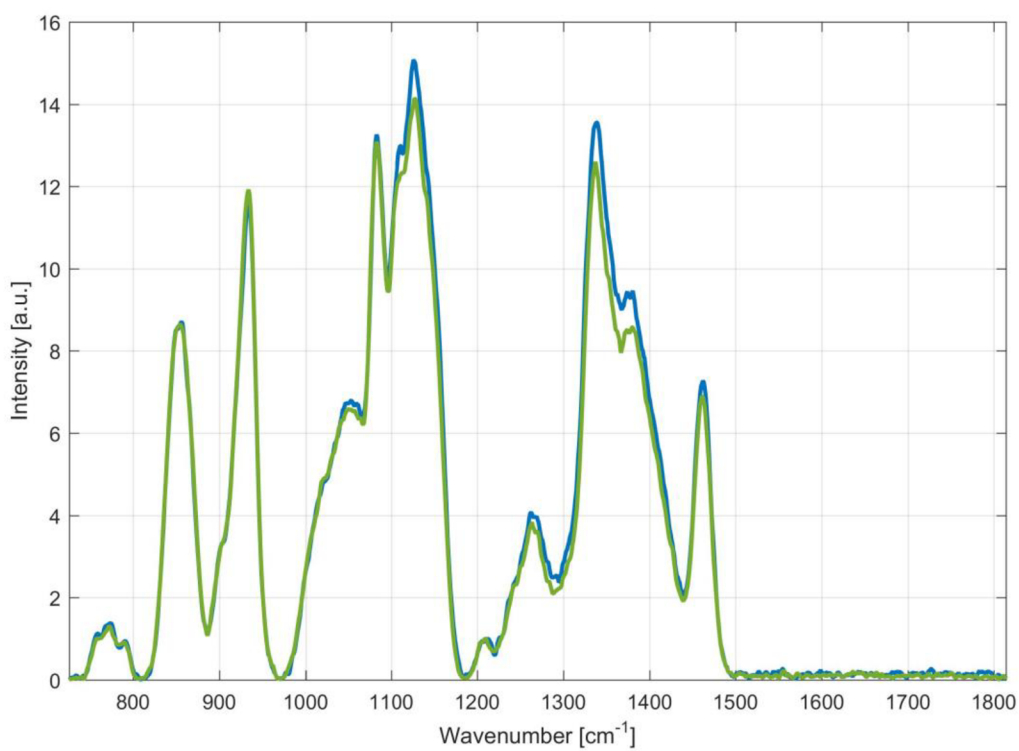
**Obr. 21** Ramanove spektrá zobrazujúce jednotlivé vzorky submerznej kultúry *A. pullulans* kmeňa 8182; 1. modré spektrum znázorňujúce odstredené bunky z kultivačného média, 2. fialové spektrum znázorňuje odstredené a premyté bunky pomocou PBS pufra, 3. červené spektrum znázorňujúce samotný ECP produkt – vyzrážaný pullulán

Na nasledujúcich obrázkoch **Obr. 22** a **Obr. 23** sú znázornené spektrá štandardu pullulánu a bunkami naprodukováného pullulánu pomocou *A. pullulans*. Z obrázkov je zrejmé, že bunkami naprodukovaný produkt je skoro úplne korešpondujúci so štandardom a tiež, že ho bolo možné naprodukovať v dostatočnom množstve. Avšak aj keď sa pri meraniach a experimentoch zistilo, že Ramanova spektroskopcia je vyhovujúca a rýchla metóda, nevieme pomocou nej vytvoriť kalibráciu na zistenie presného kvantitatívneho množstva pullulánu, z dôvodu, že daný produkt je bunkami *A. pullulans* produkovaný extracelulárne. A doposiaľ nebola publikovaná žiadna štúdia, ktorá by sa zaoberala touto problematikou.





**Obr. 22** Ramanove spektrá zobrazujúce štandard pullulánu, ktorý znázorňuje zelené spektrum a náš vyextrahovaný pullulán, ktorý znázorňuje modré spektrum

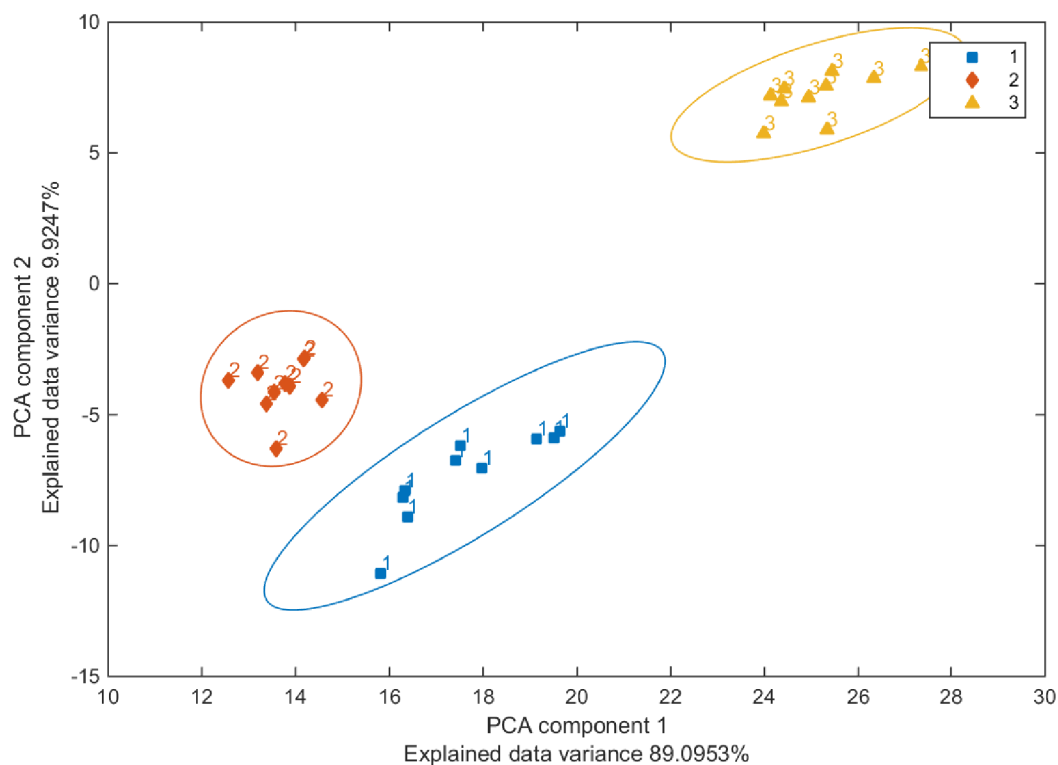


**Obr. 23** Normalizované Ramanove spektrá zobrazujúce štandard pullulánu, ktorý znázorňuje zelené spektrum a náš vyextrahovaný pullulán, ktorý znázorňuje modré spektrum

### 3.7 PCA analýza

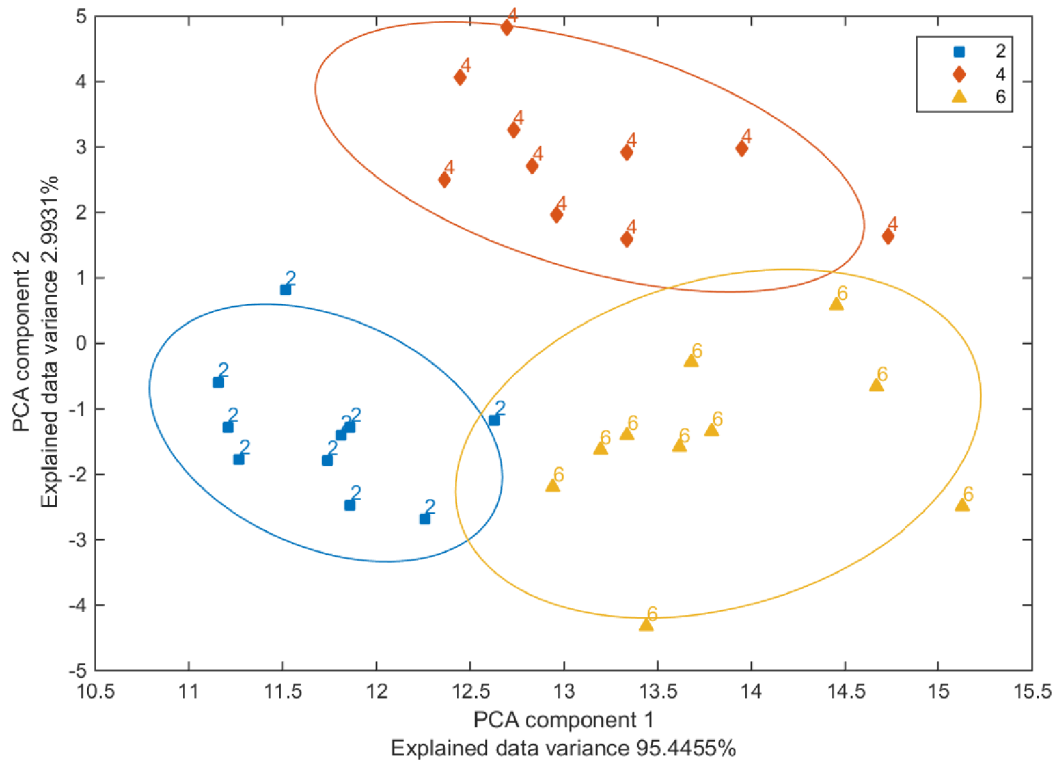
Na vykonanie PCA analýzy boli ako model vybrané 3 kmene mikroorganizmu *A. pullulans*, a to kmeň DSMZ, kmeň F148 a kmeň 8182. Vzorky boli namerané na Petriho miskách na Ramanovom spektrometri za štandardných podmienok uvedených v kapitole 2.5. Kmene boli nakultivované za štandardných podmienok pri 30°C 3-4 dni v termostate, na 3 kultivačných médiách, ktorých zloženie je uvedené v tabuľke 1.

Daná analýza je jednou z metód slúžiaca na rozlíšenie jednotlivých druhov organizmov, dokonca jednotlivých kmeňov. Pri danom experimente boli vybrané na porovnanie PCA rôzne kombinácie či už kmeňov alebo kultivačných médií na ilustráciu. Na **Obr. 24** je zhodnotený jeden vybraný kmeň, a to 8182, kultivovaný na 3 rôznych kultivačných médiách. Z tohto obrázku vyplýva, že kultivačné médiá, na ktorých bol daný kmeň nakultivovaný výrazne ovplyvňujú rozmiestnenie bodov pri analýze, aj napriek tomu, že sa jedná stále o jeden a ten istý kmeň.



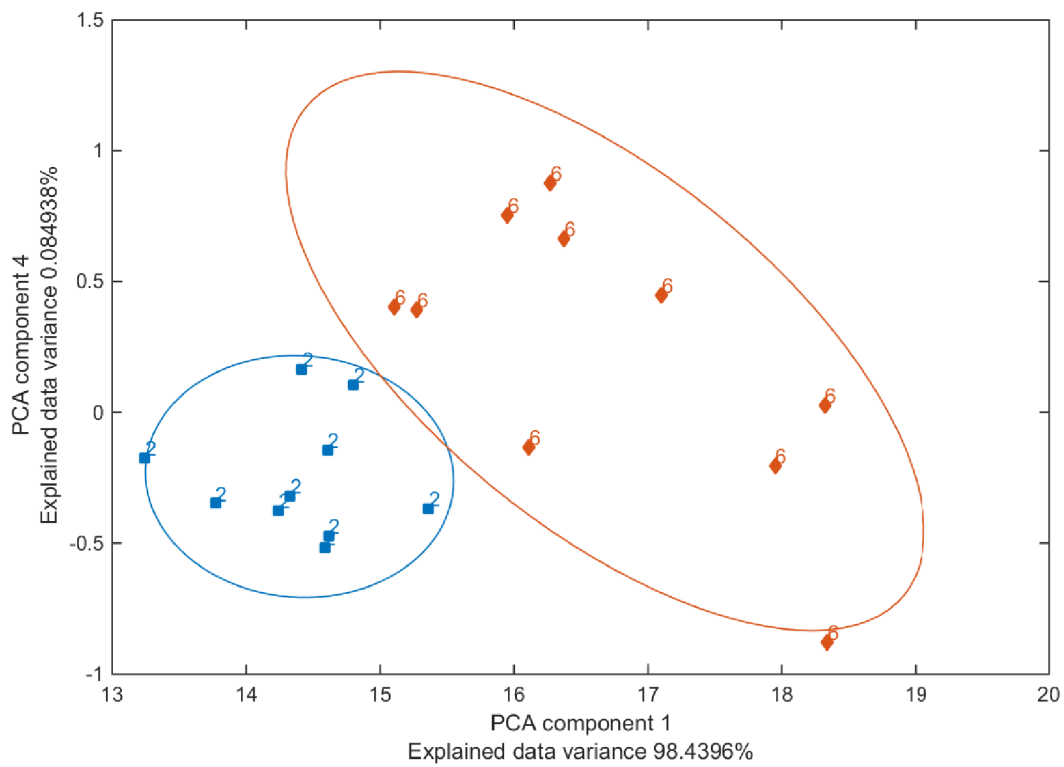
**Obr. 24** Znázorňuje vyhodnotenie PCA analýzy pre *A. pullulans* kmeňa 8182 na 3 rôznych kultivačných médiách, kde 1 je minerálne kultivačné médium s prídavkom kvasnič. autolýzátu, 2 je YPD médium a 3 je minerálne médium

Na druhej strane na **Obr. 25** sú pre ilustráciu vybrané 3 rôzne kmene, ktoré však boli kultivované na rovnakom kultivačnom médiu. Z obrázku je teda zrejmé, že jednotlivé kmene sú v značnej miere príbuzné a dokonca v určitej miere aj rovnaké.



**Obr. 25** Znázorňuje vyhodnotenie PCA analýzy pre 3 kmene *A. pullulans* kultivované na rovnakom kultivačnom médiu YPD, kde 2 je kmeň 8182, 4 je kmeň DSMZ a 6 je kmeň F148

**Obr. 26** znázorňuje príbuznosť 2 vybraných kmeňov, a to kmeňa 8182 a kmeňa F148. Kultivácia bola vykonaná taktiež na rovnakom kultivačnom médiu za štandardných kultivačných podmienok. Na obrázku je vidieť, že kmene sú si v značnej miere podobné taktiež ako v predchádzajúcom prípade.



**Obr. 26** Znávorňuje vyhodnotenie PCA analýzy pre 2 kmene *A. pullulans* kultivované na rovnakom kultivačnom médiu YPD, kde 2 je kmeň 8182 a 6 je kmeň F148

## 4 ZÁVERY

V Rámci teoretickej časti bola vypracovaná literárna rešerš na tému štúdium biotechnologicky významných organizmov pomocou Ramanovej spektroskopie. V prvej časti práce je popísaná Ramanova spektroskopia ako metóda, jej princípy a najmä využitie tejto metódy ako nástroja pre monitoring biotechnologických procesov. V ďalšej časti je popísaný biotechnologicky významný mikroorganizmus *A. pullulans*, kde sú taktiež popísané možnosti jeho biotechnologického využitia. Pozornosť v práci bola venovaná aj produkcii, vlastnostiam a možnostiam využitia extracelulárnych polymérov produkovaných týmto mikroorganizmom, a to kyseliny poly-L-jablčnej a pullulánu.

V experimentálnej časti práce boli následne zisťované optimálne podmienky pre rast *A. pullulans* na rôznych kultivačných médiách jednotlivých vybraných kmeňov, a to kmeňa DSMZ, kmeňa CCM F 148 a kmeňa CCM 8182, pri meraní na Ramanovom spektrometri. Experimentálne sa zistilo, že najvhodnejším kultivačným médiom pre rast biomasy a následnú produkciu ECP bolo kultivačné médium s prídavkom kvasničného autolyzátu. Taktiež bolo zistené že najproduktnejším a najstabilnejším kmeňom bol kmeň DSMZ, na základe čoho bol pre ďalšie experimenty v práci vybraný len tento jeden kmeň. V rámci experimentálnych postupov bolo zistené, že rast a produkciu *A. pullulans* jednotlivých kmeňov ovplyvňuje aj vhodne vybraný zdroj uhlíka o vhodnej koncentrácii. V rámci práce boli skúmané dva zdroje uhlíka, a to sacharóza a glukóza. No vhodnejším bola v práci preukázaná glukóza o koncentrácii 80 g/L pri tekutých kultivačných médiách a 60 g/L pri pevných kultivačných médiách.

Súčasťou experimentálnej práce bolo aj zostavenie rastovej krivky *A. pullulans*, kde aj na základe tejto krivky bolo zistené, že najvhodnejším médiom na produkciu biomasy a ECP bolo minerálne kultivačné médium s prídavkom kvasničného autolyzátu, kde pri gravimetrickom stanovení bol zistený najvyšší prírastok sušiny biomasy a taktiež aj ECP produktu pullulánu, tieto výsledky boli potvrdené aj metódou HPLC, kde bola stanovená glukóza a tiež ECP pullulán, avšak s tým rozdielom, že obe použité minerálne médiá boli vhodne vybrané na produkciu biomasy aj na produkciu ECP.

Cieľom práce bolo pomocou Ramanovej spektroskopie namerať spektrá jednotlivých kmeňov, popísať ich a určiť prípadné rozdiely medzi danými kmeňmi *A. pullulans* a v závere zistiť kvalitatívnu a kvantitatívnu produkciu samotného ECP kyseliny poly-L-jablčnej

a pullulánu ako dvoch biotechnologicky významných extracelulárnych polymérov. Na základe získaných experimentálnych dát bolo preukázané, že Ramanova spektroskopia ako metóda na určenie kmeňových rozdielov buniek *A. pullulans* a kvalitatívne vyhodnotenie spektier je vhodná, pretože je rýchla, nenáročná na prípravu vzoriek a v poslednom čase často využívaná. Avšak bolo zistené, že táto metóda zatiaľ nie je vhodná na kvantitatívne stanovenie extracelulárnych polymérov produkovaných bunkami *A. pullulans*, nakoľko nebolo možné zachytiť a zaznamenať spektrum samotného supernatantu, v ktorom sa ECP nachádza. Taktiež neboli doposiaľ žiadne štúdie zaoberajúce sa touto problematikou, avšak táto metóda je veľmi perspektívna a jej ďalšie štúdie produkcie extracelulárnych polymérov by mohli byť predmetom ďalšieho výskumu.

## 5 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] STUŽKA, Václav. *Instrumentální metody chemické analýzy*. Olomouc: Univerzita Palackého, 1976.
- [2] JMALOŇ, Petr a Jaroslav PODLAHA. *Fyzikálně-chemické metody*. Praha: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, 1999. Organická chemie. ISBN 80-902130-9-x.
- [3] KSANDR, Zbyněk, Petr ADÁMEK a Emanuela JANEČKOVÁ. *Infračervená spektroskopie*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1975.
- [4] BEKÁREK, Vojtěch a Iveta FRYŠOVÁ. *Optické metody v chemické analýze*. 3., přeprac. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. ISBN 978-80-244-1754-7.
- [5] Nobelprize.org, *The Official Web Site of the Nobel Prize* [online]. 2014. [cit. 2017-05-02]. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1930/raman.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1930/raman.html)
- [6] FERRARO, John R., Kazuo NAKAMOTO a Chris W. BROWN. *Introductory Raman spectroscopy*. 2nd ed. Boston: Academic Press, c2003. ISBN 978-0-12-254105-6.
- [7] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [8] SKOOG, Douglas A. a Donald M. WEST. *Principles of instrumental analysis*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders College, 1980. ISBN 0-03-021161-1.
- [9] ED. JOHN C. LINDON .. *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. 2. ed. [S.l.: s.n.], 2010. ISBN 9780123744159
- [10] NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0776-x.
- [11] MILATA, Viktor. *Aplikovaná molekulová spektroskopie*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2008. Edícia vysokoškolských učebníc. ISBN 978-80-227-2960-4.
- [12] MATĚJKA, Pavel, Michaela KOUDELKOVÁ, Zdeněk DEYL, et al. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie III*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-466-1.
- [13] AMER, Maher S. *Raman spectroscopy for soft matter applications*. Hoboken, N.J.: Wiley, c2009. ISBN 978-0-470-45383-4.
- [14] JORIO, A. *Raman spectroscopy in graphene related systems*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, c2011. ISBN 978-3-527-40811-5.
- [15] KONG, Kenny, Catherine KENDALL, Nicholas STONE a Ioan NOTINGHER. *Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection*. DOI: 10.1016/j.addr.2015.03.009. ISBN 10.1016/j.addr.2015.03.009. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000447>

- [16] HUANG, Wei E., Mengqiu LI, Roger M. JARVIS, Royston GOODACRE a Steven A. BANWART. *Shining Light on the Microbial World* [online]. s. 153 [cit. 2017-05-09]. DOI:10.1016/S0065-2164(10)70005-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216410700058>
- [17] PELLETIER, M. J. *Quantitative Analysis Using Raman Spectrometry*. DOI: 10.1366/000370203321165133. ISBN 10.1366/000370203321165133. Dostupné také z: <http://asp.sagepub.com/lookup/doi/10.1366/000370203321165133>
- [18] HUANG, Wei E., Robert I. GRIFFITHS, Ian P. THOMPSON, Mark J. BAILEY a Andrew S. WHITELEY. *Raman Microscopic Analysis of Single Microbial Cells*. DOI: 10.1021/ac049753k. ISBN 10.1021/ac049753k. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac049753k>
- [19] LI, Mengqiu, Jian XU, Maria ROMERO-GONZALEZ, Steve A BANWART a Wei E HUANG. Single cell Raman spectroscopy for cell sorting and imaging. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2012, **23**(1), 56-63 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.11.019. ISSN 09581669. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166911007300>
- [20] Wang Y, Song YZ, Zhu D, Ji YT, Wang TT, McIlvenna D, Yin HB, Xu J, WE H: Probing and sorting single cells—the application of a Raman-activated cell sorter. *Spectrosc Eur* 2013, 25:16–20.
- [21] CHEN, Wei, Chengwu ZHANG, Lirong SONG, Milton SOMMERFELD a Qiang HU. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 2009, **77**(1), 41-47 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.01.001. ISSN 01677012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701209000037>
- [22] HUANG, Y.Y., C.M. BEAL, W.W. CAI, R.S. RUOFF a E.M. TERENTJEV. Micro-Raman spectroscopy of algae: Composition analysis and fluorescence background behavior. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2009, , n/a-n/a [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1002/bit.22617. ISSN 00063592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.22617>
- [23] WEISS, T. L., H. J. CHUN, S. OKADA, S. VITHA, A. HOLZENBURG, J. LAANE a T. P. DEVARENNE. Raman Spectroscopy Analysis of Botryococcene Hydrocarbons from the Green Microalga *Botryococcus braunii*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2010, **285**(42), 32458-32466 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1074/jbc.M110.157230. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.157230>
- [24] WU, H., J. V. VOLPONI, A. E. OLIVER, A. N. PARIKH, B. A. SIMMONS a S. SINGH. In vivo lipidomics using single-cell Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2011, **108**(9), 3809-3814 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1073/pnas.1009043108. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1009043108>
- [25] LEE, Tsung-Hua, Jo-Shu CHANG a Hsiang-Yu WANG. *Rapid and in Vivo Quantification of Cellular Lipids in Chlorella vulgaris Using Near-Infrared Raman*



*Spectrometry*. DOI: 10.1021/ac3028118. ISBN 10.1021/ac3028118. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac3028118>

[26] WANG, Dongmei, Yandu LU, He HUANG a Jian XU. *Establishing Oleaginous Microalgae Research Models for Consolidated Bioprocessing of Solar Energy* [online]. s. 69 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1007/10\_2011\_122. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/10\\_2011\\_122](http://link.springer.com/10.1007/10_2011_122)

[27] WANG, Tingting, Yuetong JI, Yun WANG, et al. Quantitative dynamics of triacylglycerol accumulation in microalgae populations at single-cell resolution revealed by Raman microspectroscopy. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2014, 7(1), 58- [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1186/1754-6834-7-58. ISSN 1754-6834. Dostupné z: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-7-58>

[28] MAQUELIN, K, C KIRSCHNER, L.-P CHOO-SMITH, N VAN DEN BRAAK, H.Ph ENDTZ, D NAUMANN a G.J PUPPELS. *Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors*. DOI: 10.1016/S0167-7012(02)00127-6. ISBN 10.1016/S0167-7012(02)00127-6. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701202001276>

[29] HARZ, M., P. RÖSCH, K.-D. PESCHKE, O. RONNEBERGER, H. BURKHARDT a J. POPP. Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions. *The Analyst* [online]. 2005, 130(11), 1543- [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1039/b507715j. ISSN 0003-2654. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b507715j>

[30] SAMEK, O., J.F.M. AL-MARASHI a H.H. TELLE. *Rapid and in Vivo Quantification of Cellular Lipids in *Chlorella vulgaris* Using Near-Infrared Raman Spectrometry*. DOI: 10.1002/lapl.200910154. ISBN 10.1002/lapl.200910154. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1612-202X/7/378>

[31] DE GELDER, Joke, Kris DE GUSSEM, Peter VANDENABEELE a Luc MOENS. *The potential of Raman spectroscopy for the identification of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis**. DOI: 10.1002/jrs.1734. ISBN 10.1002/lapl.200910154. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1734>

[32] NOTINGHER, Ioan, Kris DE GUSSEM, Peter VANDENABEELE a Luc MOENS. *Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors*. DOI: 10.3390/s7081343. ISBN 10.3390/s7081343. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/7/8/1343/>

[33] DOWNES, Andrew a Alistair ELFICK. Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine. *Sensors* [online]. 2010, 10(3), 1871-1889 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.3390/s100301871. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/10/3/1871/>

[34] MOVASAGHI, Zanyar, Shazza REHMAN, Ihtesham U. REHMAN, N VAN DEN BRAAK, H.Ph ENDTZ, D NAUMANN a G.J PUPPELS. *Raman Spectroscopy of Biological Tissues*. DOI: 10.1080/05704920701551530. ISBN 10.1080/05704920701551530. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704920701551530>

[35] HERAUD, Philip, John BEARDALL, Don MCNAUGHTON a Bayden R. WOOD. In vivo prediction of the nutrient status of individual microalgal cells using Raman microspectroscopy. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2007, **275**(1), 24-30 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00861.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2007.00861.x>

[36] HERAUD, Philip, Bayden R. WOOD, John BEARDALL, Don MCNAUGHTON, H.Ph ENDTZ, D NAUMANN a G.J PUPPELS. *Effects of pre-processing of Raman spectra on in vivo classification of nutrient status of microalgal cells*. DOI: 10.1002/cem.990. ISBN 10.1080/05704920701551530. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704920701551530>

[37] HUANG, Y.Y., C.M. BEAL, W.W. CAI, R.S. RUOFF a E.M. TERENTJEV. Micro-Raman spectroscopy of algae: Composition analysis and fluorescence background behavior. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 2009, , n/a-n/a [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1002/bit.22617. ISSN 00063592. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.22617>

[38] ŘEZANKA, T., M. PETRÁNKOVÁ, V. CEPÁK, P. PŘIBYL, K. SIGLER a T. CAJTHAML. *Trachydiscus minutus*, a new biotechnological source of eicosapentaenoic acid. *Folia Microbiologica* [online]. 2010, **55**(3), 265-269 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1007/s12223-010-0039-0. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-010-0039-0>

[39] BRAUCHLE, Eva a Katja SCHENKE-LAYLAND. Raman spectroscopy in biomedicine - non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues. *Biotechnology Journal* [online]. 2013, **8**(3), 288-297 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1002/biot.201200163. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201200163>

[40] BERNATOVÁ, Silvie, Ota SAMEK, Zdeněk PILÁT, et al. Following the Mechanisms of Bacteriostatic versus Bactericidal Action Using Raman Spectroscopy. *Molecules* [online]. 2013, **18**(11), 13188-13199 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.3390/molecules181113188. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/11/13188/>

[41] SAMEK, Ota, Katarina MLYNARIKOVÁ, Silvie BERNATOVÁ, et al. *Candida parapsilosis* Biofilm Identification by Raman Spectroscopy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(12), 23924-23935 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.3390/ijms151223924. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/12/23924/>

[42] ESPAGNON, Isabelle, Denis OSTROVSKII, Raphaël MATHEY, et al. Direct identification of clinically relevant bacterial and yeast microcolonies and macrocolonies on solid culture media by Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2014, **19**(2), 027004- [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1117/1.JBO.19.2.027004. ISSN 1083-3668. Dostupné z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.19.2.027004>

[43] DE GELDER, Joke, Diana WILLEMSE-ERIX, Maarten J. SCHOLTES, et al. Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, **80**(6), 2155-2160 [cit. 2017-05-

09]. DOI: 10.1021/ac702185d. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac702185d>

[44] CIOBOTĂ, Valerian, Eva-Maria BURKHARDT, Wilm SCHUMACHER, Petra RÖSCH, Kirsten KÜSEL a Jürgen POPP. The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **397**(7), 2929-2937 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1007/s00216-010-3895-1. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-3895-1>

[45] IZUMI, Celly M.S., Marcia L.A. TEMPERINI, John BEARDALL, Don MCNAUGHTON, H.Ph ENDTZ, D NAUMANN a G.J PUPPELS. *FT-Raman investigation of biodegradable polymers: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)*. DOI: 10.1016/j.vibspec.2010.07.011. ISBN 10.1016/j.vibspec.2010.07.011. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924203110001293>

[46] NAUMANN, Dieter, Marcia L.A. TEMPERINI, John BEARDALL, Don MCNAUGHTON, H.Ph ENDTZ, D NAUMANN a G.J PUPPELS. *FT-INFRARED AND FT-RAMAN SPECTROSCOPY IN BIOMEDICAL RESEARCH: Poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)*. DOI: 10.1081/ASR-100106157. ISBN 10.1081/ASR-100106157. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/ASR-100106157>

[47] SAMEK, Ota, Stanislav OBRUČA, Martin ŠILER, et al. Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors* [online]. 2016, **16**(12), 1808- [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.3390/s16111808. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/16/11/1808>

[48] RAJEEVA, Gaur, Singh RANJAN, Gupta MONIKA a Kumar Gaur MANOGYA. *Aureobasidium pullulans, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan*. DOI: 10.5897/AJB10.948. ISBN 10.5897/AJB10.948. Dostupné také z: <http://academicjournals.org/journal/AJB/article-abstract/ED60E0419532>

[49] RAVELLA, Sreenivas Rao, Teresa Suárez QUIÑONES, Andy RETTER, Monika HEIERMANN, Thomas AMON a Phil J. HOBBS. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010, **82**(3), 728-732 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.05.039. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710004376>

[50] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry (Alfa).

[51] *Aureobasidium pullulans. Concordia University Fungal genomic project* [online]. 2005, 06.04.2005 [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://fungalgenomics.concordia.ca/fungi/Apul.php>

[52] ALAR, P., C. GOSTINČAR, G.S. DE HOOG, V. URŠIČ, M. SUDHADHAM a N. GUNDE-CIMERMAN. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology* [online]. 2008, **61**, 21-38 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.3114/sim.2008.61.02. ISSN 01660616. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166061614601925>

- [53] SHIMADA, Kyo, Kin'ichi MATSUSHIMA, Juichiro FUKUMOTO a Takehiko YAMAMOTO. Poly-(L)-malic acid; A new protease inhibitor from *Penicillium cyclospium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1969, **35**(5), 619-624 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/0006-291X(69)90449-5. ISSN 0006291x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X69904495>
- [54] RATHBERGER, Klaus, Hermine REISNER, Bertram WILLIBALD, Hans-Peter MOLITORIS a Eggehard HOLLER. Comparative synthesis and hydrolytic degradation of poly (L-malate) by myxomycetes and fungi. *Mycological Research* [online]. 1999, **103**(5), 513-520 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1017/S0953756298007680. ISSN 09537562. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0953756208603056>
- [55] MANITCHOTPISIT, Pennapa, Christopher D. SKORY, Stephen W. PETERSON, Neil P. J. PRICE, Karl E. VERMILLION a Timothy D. LEATHERS. Poly( $\beta$ -L-malic acid) production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2012, **39**(1), 125-132 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1007/s10295-011-1007-7. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-011-1007-7>
- [56] LJUBIMOVA, Julia Y., Manabu FUJITA, Natalya M. KHAZENZON, Bong-Seop LEE, Sebastian WACHSMANN-HOGIU, Daniel L. FARKAS, Keith L. BLACK a Eggehard HOLLER. Nanoconjugate based on polymeric malic acid for tumor targeting. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2008, **171**(2), 195-203 [cit. 2017-05-10]. DOI: 10.1016/j.cbi.2007.01.015. ISSN 00092797. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279707000300>
- [57] NAGATA, Naoki, Tadaatsu NAKAHARA, Takeshi TABUCHI a Kumar Gaur MANOGYA. *Fermentative Production of Poly(  $\beta$  - L -malic acid), a Polyelectrolytic Biopolyester, by Aureobasidium sp.* DOI: 10.1271/bbb.57.638. ISBN 10.1271/bbb.57.638. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.57.638>
- [58] PATIL, Rameshwar, Jose PORTILLA-ARIAS, Hui DING, et al. Cellular Delivery of Doxorubicin via pH-Controlled Hydrazone Linkage Using Multifunctional Nano Vehicle Based on Poly( $\beta$ -L-Malic Acid). *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, **13**(12), 11681-11693 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.3390/ijms130911681. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/9/11681/>
- [59] DOMINGUEZ, Ana, Clarisse NOBRE, Lígia R. RODRIGUES, António M. PERES, Duarte TORRES, Isabel ROCHA, Nelson LIMA a José TEIXEIRA. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, **89**(4), 1174-1179 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.03.091. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712003190>
- [60] CATLEY, Brian J., Alison RAMSAY a Catherine SERVIS. Observations on the structure of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research* [online]. 1986, **153**(1), 79-86 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)90197-6. ISSN 00086215. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500901976>
- [61] CATLEY, Brian J., Alison RAMSAY a Catherine SERVIS. Observations on the structure of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research*

[online]. 1986, **153**(1), 79-86 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)90197-6. ISSN 00086215. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500901976>

[62] CHI, Zhenming, Shuangzhi ZHAO, Takeshi TABUCHI a Kumar Gaur MANOGYA. *Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain*. DOI: 10.1016/S0141-0229(03)00119-4. ISBN 10.1016/S0141-0229(03)00119-4. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022903001194>

[63] LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2003-10-1, **62**(5-6), 468-473 [cit. 2017-05-09]. DOI: 10.1007/s00253-003-1386-4. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-003-1386-4>

[64] MNASSRI, Baligh, El Mostafa EL ADEL, Mustapha OULADSINE a Kumar Gaur MANOGYA. *Analysis and comparison of an improved unreconstructed variance criterion to other criteria for estimating the dimension of PCA model*. DOI: 10.1016/j.jprocont.2016.06.004. ISBN 10.1016/j.jprocont.2016.06.004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959152416300701>

## 6 ZOZNAM OBRÁZKOV

<b>Obr. 1</b> Chandrasekhara V. Raman – indický fyzik [5].....	10
<b>Obr. 2</b> Ramanov rozptyl [2] .....	12
<b>Obr. 3</b> Jednotlivé kultúry <i>A. pullulans</i> počas rôznych dní kultivácie: zľava 3. deň, 8. deň a 14. deň.....	22
<b>Obr. 4</b> Štruktúra kyseliny poly-L-jablčnej [56].....	23
<b>Obr. 5</b> Štruktúra pullulánu [48] .....	24
<b>Obr. 6</b> Čistý pullulán .....	25
<b>Obr. 7</b> Supernatant získaný z biomasy po prídavku etanolu s vyzrážanou zrazeninou pullulánu, z ľava minerálne médium s prídavkom kvasničného autolyzátu a čisté minerálne médium.....	25
<b>Obr. 8</b> Z ľava na obrázku je zachytený Ramanov spektrometer Renishaw využívaný v experimentálnej časti práce, následne detail na meracej doske pri samotnom meraní vzoriek a stopa plochy laseru pri meraní.....	27
<b>Obr. 9</b> Mikroskopický obraz <i>A. pullulans</i> kmeňa 8182 zachytený pri meraní na Ramanovom spektrometri.....	27
<b>Obr. 10</b> Ramanovo spektrum štandardu glukózy .....	32
<b>Obr. 11</b> Ramanovo spektrum štandardu kyseliny L-jablčnej .....	33
<b>Obr. 12</b> Ramanovo spektrum štandardu pullulánu .....	33
<b>Obr. 13</b> Ramanove spektrum popisujúce jednotlivé píky modelového kmeňa <i>A. pullulans</i> – spektrum 2 a Ramanove spektrum popisujúce jednotlivé píky štandardu pullulánu – spektrum 1 .....	34
<b>Obr. 14</b> Porovnanie kultivačných médií pri kultivácii <i>A. pullulans</i> kmeňa DSMZ, z ľava minerálne médium s nadmernou pigmentáciou, vedľa YPD médium so štandardným rastom daného kmeňa.....	35
<b>Obr. 15</b> Kultivácia <i>A. pullulans</i> na YPD médiu; modré spektrum zodpovedá kmeňu 8182, červené spektrum zodpovedá kmeňu DSMZ a žlté spektrum zodpovedá kmeňu F148 .....	36
<b>Obr. 16</b> Kultivácia <i>A. pullulans</i> na minerálnom médiu s prídavkom kvasničného autolyzátu; modré spektrum zodpovedá kmeňu 8182, červené spektrum zodpovedá kmeňu F148.....	37
<b>Obr. 17</b> Kultivácia <i>A. pullulans</i> 8182 na 3 rôznych médiách; spodné červené spektrum zodpovedá minerálnemu médiu, modré spektrum zodpovedá YPD médiu a horné červené spektrum zodpovedá minerálnemu médiu s prídavkom kvasnič. autolyzátu.....	38
<b>Obr. 18</b> Ilustračný chromatogram metódy HPLC .....	43
<b>Obr. 19</b> Kultivácia <i>A. pullulans</i> DSMZ na produkciu kyseliny poly-L-jablčnej na rôznych kultivačných médiách; od spodu modré spektrum zodpovedá médiu s prídavkom CaCO <sub>3</sub> , fialové spektrum zodpovedá médiu s NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , červené spektrum zodpovedá klasickému kultivačnému médiu a zelené spektrum zodpovedá médiu s prídavkom kyseliny fumarovej .	45
<b>Obr. 20</b> Ramanove spektrá zobrazujúce jednotlivé vzorky submerznej kultúry <i>A. pullulans</i> kmeňa DSMZ; 1. modré spektrum zobrazujúce odstredené bunky z kultivačného média, 2. fialové spektrum znázorňuje odstredené a premyté bunky pomocou PBS pufra, 3. červené spektrum znázorňuje samotné kultivačné médium aj s nakultivovanou biomasou a 4. fialové spektrum znázorňuje samotný ECP produkt – vyzrážaný pullulán.....	47
<b>Obr. 21</b> Ramanove spektrá zobrazujúce jednotlivé vzorky submerznej kultúry <i>A. pullulans</i> kmeňa 8182; 1. modré spektrum znázorňujúce odstredené bunky z kultivačného média, 2. fialové spektrum znázorňuje odstredené a premyté bunky pomocou PBS pufra, 3. červené spektrum znázorňujúce samotný ECP produkt – vyzrážaný pullulán.....	48
<b>Obr. 22</b> Ramanove spektrá zobrazujúce štandard pullulánu, ktorý znázorňuje zelené spektrum a náš vyextrahovaný pullulán, ktorý znázorňuje modré spektrum.....	49

<b>Obr. 23</b> Normalizované Ramanove spektrá zobrazujúce štandard pullulánu, ktorý znázorňuje zelené spektrum a náš vyextrahovaný pullulán, ktorý znázorňuje modré spektrum.....	49
<b>Obr. 24</b> Znázorňuje vyhodnotenie PCA analýzy pre <i>A. pullulans</i> kmeňa 8182 na 3 rôznych kultivačných médiách, kde 1 je minerálne kultivačné médium s prídavkom kvasnič. autolyzátu, 2 je YPD médium a 3 je minerálne médium .....	50
<b>Obr. 25</b> Znázorňuje vyhodnotenie PCA analýzy pre 3 kmene <i>A. pullulans</i> kultivované na rovnakom kultivačnom médiu YPD, kde 2 je kmeň 8182, 4 je kmeň DSMZ a 6 je kmeň F148 .....	51
<b>Obr. 26</b> Znázorňuje vyhodnotenie PCA analýzy pre 2 kmene <i>A. pullulans</i> kultivované na rovnakom kultivačnom médiu YPD, kde 2 je kmeň 8182 a 6 je kmeň F148 .....	52

## 7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

CCD	(charge-coupled device) žiarenie citlivé na elektrický náboj
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECP	extracelulárne polyméry
FT	Fourierova transformácia
HPLC	High performance liquid chromatography, Vysokoučinná kvapalinová chromatografia
IČ	infračervená (oblasť)
NIR	blízka infračervená oblasť
PHB	polyhydroxybutyrát
PMLA	poly-L-jablčná kyselina
rpm	„revolutions per minute“, otáčky za minútu
TAG	triacylglyceroly
VIS	visible, viditeľný