



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA ODPADŮ PO ZPRACOVÁNÍ KÁVY

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WASTES ASSOCIATED WITH COFFEE PRODUCTION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

MARKÉTA KOVÁŘOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. STANISLAV OBRUČA, Ph.D.

BRNO 2015



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0934/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Markéta Kovářová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce **Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Enzymatická hydrolýza odpadů po zpracování kávy

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše – charakterizace odpadů kávového průmyslu, jejich chemická a enzymatická hydrolýza
2. Experimentální studium enzymatické hydrolýzy kávové sedliny

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Markéta Kovářová
Student(ka)

Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30. 1. 2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem možností produkce extracelulárních hydrolytických enzymů mikroorganismy, a to bakteriemi a plísněmi, které byly kultivovány na kávové sedlině. Teoretická část je zaměřena na charakterizaci kávy jako rostliny a využitím vedlejších produktů, které vznikají při jejím zpracování. V teoretické části jsou také popsány vybrané mikroorganismy a enzymy, jejichž produkce byla sledována.

V experimentální části byla jako substrát pro produkci extracelulárních enzymů použita kávová sedlina. Následně byla sledována produkce proteáz, celuláz, mannáz a lipáz. Z vybraných mikroorganismů byl nejvhodnějším producentem zvolen dosud neidentifikovatelný isolát plísně, pro nějž byly následně optimalizovány podmínky kultivace. Výtěžky enzymů a také složení extracelulárního hydrolytického koktejlu jsou především závislé na obsahu vody a módu kultivace – statická vs. s třepáním. Obecně platí, že statická kultivace podporuje spíše produkci extracelulárních enzymů hydrolyzujících substráty na bázi sacharidů, třepání pak navýší výtěžek lipáz a proteáz. Součástí práce byla částečná purifikace a prekoncentrace enzymatického preparátu pomocí ultrafiltrace, ultradialýzy a charakterizace s využitím PAGE-SDS.

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on study of potential production of extracellular hydrolytic enzymes by microorganisms – bacterium and moulds, which have been cultivated on spent coffee grounds. The theoretical part deals with characterization of coffee and utilization of coffee by-products. There are also subscribed microorganisms and enzymes which have been noticed.

In experimental part coffee ground was used as the sole substrate for production of extracellular hydrolytic enzymes. Productions of protease, cellulase, mannase and lipase enzymes were observed. None-identified isolate of mould spontaneously contaminating spent coffee grounds was identified as the best producer of these enzymes. Subsequently the conditions of cultivation such as water content and shaking vs. static cultivation of this moulds were optimized. Further, we performed partial purification and pre-concentration of the enzyme cocktail by ultrafiltration, ultradialysis and PAGE-SDS characterization of extracellular enzymes was performed as well.

KLÍČOVÁ SLOVA: extracelulární enzymy, kávová sedlina, plísně, *Aureobasidium pulluans*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, isolát plísně, bakterie, *Burkholderia cepacia*

KEYWORDS: extracellular enzymes, coffee ground, moulds, *Aureobasidium pulluans*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, isolate of mould, bacterium, *Burkholderia cepacia*

KOVÁŘOVÁ, M. *Enzymatická hydrolýza odpadů po zpracování kávy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 62 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Stanislav Obruča, Ph.D..

Prohlášení:

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce, Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, ochotu a všestrannou pomoc při řešení problémů při zpracování této práce.

Obsah

1.	ÚVOD.....	7
2.	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1.	Káva	8
2.1.1.	Kávovník – taxonomie a růst.....	8
2.1.2.	Plod.....	9
2.1.3.	Zpracování kávy	9
2.1.4.	Vedlejší produkty při zpracování kávy.....	12
2.1.5.	Vliv na životní prostředí	14
2.2.	Využití vedlejších produktů kávy.....	14
2.2.1.	Produkce hub	15
2.2.2.	Kompostování a vermikompostování	15
2.2.3.	Enzymy a sekundární metabolity	15
2.2.4.	Citronová a gibberelová kyselina	16
2.2.5.	Ethanol.....	16
2.2.6.	Paliva	16
2.2.7.	Kompost.....	17
2.2.8.	Barviva.....	17
2.2.9.	Bioaktivní látky	17
2.2.10.	Vláknina.....	17
2.2.11.	Antokyany	17
2.2.12.	Potravinářské výrobky, nápoje a aromatické sloučeniny	18
2.2.13.	Výroba dřevotřískových desek	18
2.2.14.	Krmivo pro zvířata.....	18
2.2.15.	Aktivní uhlí a biosorbenty	18
2.3.	Hydrolýza kávové sedliny	18
2.3.1.	Chemická hydrolýza	19
2.3.2.	Enzymatická hydrolýza	19
2.4.	Hydrolytické enzymy	19
2.4.1.	Celulázy	20
2.4.2.	Mannázy	21
2.4.3.	Proteázy	22
2.4.4.	Lipasy	22
2.5.	Vybrané mikroorganismy.....	23
2.5.1.	Plísně	23
2.5.2.	Bakterie.....	25
2.5.3.	Purifikace enzymů	26
3.	CÍL PRÁCE.....	29
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1.	Mikrobiální kmeny, chemikálie a přístrojové vybavení.....	30
4.1.1.	Použité mikroorganismy	30
4.1.2.	Použité chemikálie.....	30
4.1.3.	Přístroje a pomůcky	31

4.2.	Použité odpadní substráty.....	31
4.3.	Kultivace.....	31
4.3.1.	Tuhé kultivační médium.....	32
4.3.2.	Tekuté kultivační médium.....	32
4.4.	Postupy při stanovení enzymových aktivit.....	32
4.4.1.	Stanovení proteolytické aktivity.....	32
4.4.2.	Stanovení lipolytické aktivity.....	33
4.4.3.	Stanovení celulózové aktivity – stanovení pomocí karboxymethyl celulózy.....	33
4.4.4.	Stanovení mannázové aktivity.....	34
4.5.	Výběr vhodného mikrobiálního kmene.....	34
4.5.1.	Optimalizace kultivačních podmínek.....	35
4.6.	Izolace a purifikace enzymů.....	36
4.6.1.	Vertikální PAGE SDS elektroforéza.....	36
4.6.2.	Zymografie.....	37
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
5.1.	Výběr mikroorganismů na základě schopnosti růst na médiu s kávovou sedlinou..	39
5.1.1.	Kultivace na tuhém médiu.....	39
5.1.2.	Kultivace na tekutém médiu.....	39
5.2.	Stanovení enzymových aktivit vybraných plísní a bakterií.....	40
5.2.1.	Stanovení proteolytické aktivity.....	40
5.2.2.	Stanovení celulózové aktivity.....	41
5.2.3.	Stanovení lipázové aktivity.....	42
5.2.4.	Stanovení aktivity mannázy.....	42
5.3.	Optimalizace podmínek.....	43
5.3.1.	Optimalizace množství vody a způsobu kultivace.....	43
5.3.2.	Optimalizace podmínek – pH optimum enzymatické reakce.....	47
5.3.3.	Optimalizace podmínek – počet dní kultivace.....	48
5.4.	Purifikace a identifikace enzymů.....	51
5.4.1.	Ultrafiltrace.....	51
5.4.2.	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE – SDS).....	52
5.4.3.	Zymografie.....	54
5.5.	Příprava enzymu.....	55
5.5.1.	Ultrafiltrace.....	55
5.5.2.	Stanovení enzymových aktivit.....	55
6.	ZÁVĚR.....	57
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	62
9.	PŘÍLOHY.....	63

1. ÚVOD

Káva se získává z kávových bobů z rostliny zvané kávovník. Tyto boby jsou zpracovávány pro výrobu nápoje, který je jedním z nejoblíbenějších nápojů na světě. Lze ji získat několika způsoby úpravy, a to buď zpracováním mokrou, nebo suchou metodou. Díky každé z těchto metod, jejichž náročnost se liší, lze získat produkt o odlišné kvalitě a chuti. Následně je káva zpracovávána dalšími postupy, jako je pražení nebo mletí, a tak je získáván produkt o požadované kvalitě. Během pražení a následného vaření dochází k reakcím, díky nimž vznikají stovky sloučenin, které ovlivňují chuť a vůni kávy.

Kromě požadovaného produktu, ale při zpracování kávových bobů vznikají také vedlejší produkty, které nepříznivě ovlivňují životní prostředí. To, kolik vedlejších produktů je získáno, závisí také na tom, jakou metodou jsou kávové boby zpracovávány. Nejdůležitějšími z těchto vedlejších produktů jsou dužina a slupky kávy. Ty tvoří téměř 45% hmotnosti bobu. Takto získané vedlejší produkty mají mnoho aplikací, do kterých patří například extrakce kofeinu a polyfenolů, produkce enzymů, výroba paliv a barviv.

Téměř polovina veškeré světové produkce kávy je zpracována na kávu rozpustnou a přitom z každé tuny zelené kávy vznikne 650 kg kávové sedliny. Kávová sedlina má vysoký obsah bílkovin a také obsahuje velké množství hemicelulózy, a to na bázi manosy a galaktosy.

Lepším využíváním vedlejších produktů, které vznikají při výrobě kávy, dojde ke snížení znečištění životního prostředí. Pokud jsou ze slupek kávy a kávové sedliny odstraněny toxické látky, lze je využít jako substráty pro biologické procesy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Káva

Káva je jedním z nejoblíbenějších nápojů a druhým nejobchodovatelnějším produktem na světě. Slovo káva pochází z arabštiny z původního slova Quahweh. V průběhu 13. století přinesli Arabové semena kávy *Coffea arabica* z Etiopie do Jemenu, kde založili první plantáž. Jako původní místo výskytu kávy Arabica je považována provincie Kaffa v Etiopii. Odrůda Robusta je původním druhem ve střední Africe. Káva se pěstuje na celém světě, ale v současné době je jejím největším producentem a vývozcem Brazílie. [1]

2.1.1. Kávovník – taxonomie a růst

Káva patří do čeledi mořenovitých a rodu kávovník. Mořenovité čítají téměř 400 rodů a až 5000 druhů. Je to vytrvalá rostlina, má výrazné větveno s mělkým kořenovým systémem. Kořeny kávy *Arabica* pronikají poměrně hluboko do půdy, naopak kořeny kávy robusta mají kořeny koncentrované velmi blízko u povrchu půdy. Její listy jsou tmavě zelené, lesklé, vlnité s výraznými žilkami. Opylení probíhá během 6 hodin po odkvetení. Káva *Arabica* je autogamní, na rozdíl od kávy robusta, která je allogamní. Proces oplození je dokončen během 24 - 48 hodin od opylení. Semena jsou eliptická nebo tvaru vejce. [1]



Obrázek 1: Kávovník [1]

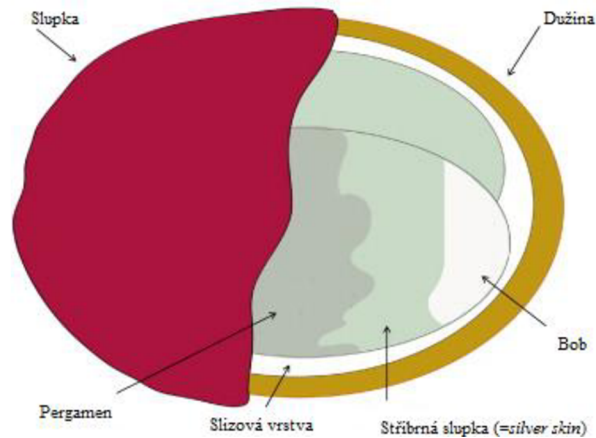
Důležitým taxonomickým znakem v rozeznávání mezi druhy kávy je velikost, tloušťka a počet boxů ve stěnách sklereidů. Klíčení trvá asi 45 dní. [1]

Jsou to převážně tropické a subtropické rostliny. Kávovníky rostou mezi obratníkem Raka a Kozoroha, v oblastech, ve kterých je průměrná celoroční teplota kolem 21°C s velkým množstvím srážek. Rostou v nadmořských výškách od 200 m.n.m. Je to krátkodenní rostlina - potřebuje asi 8 - 11 hodin světla. Podrod kávovník obsahuje asi 80 druhů, které jsou rozšířené v Africe a na Madagaskaru. [1]

Trvá asi pět let než má kávovník první úrodu a je úrodný až 15 let. Zralé, nezralé a přezralé ovoce se suší odděleně, protože každé má jiný vliv na konečnou kvalitu kávy a její chuť. [1]

2.1.2. Plod

Kávový bob se skládá z hladké, ale tvrdé vnější slupky nebo oplodí, které má zelenou barvu, dokud je plod nezralý, ale když dozraje, změní se na červeno-fialový nebo červený (viz Obrázek 2). Slupka pokrývá jemně nažloutlou, vláknitou a sladkou dužinu. Poté následují průsvitné, bezbarvé, viskózní a vysoce hydratované vrstvy slizu (pektinová vrstva). Následuje tenká vrstva, která má nažloutlou barvu - také nazývaná pergamen. [1]



Obrázek 2: Složení plodu kávy [5]

2.1.3. Zpracování kávy

Kávové boby jsou zpracovávány za účelem získání všem známého nápoje. Existují dva způsoby jejich úpravy, ty se liší v náročnosti a také v kvalitě získané kávy. Je to mokrá a suchá metoda. [3]

2.1.3.1. Mokrý metoda

Zpracování kávy mokrou cestou se nazývá praní kávy. U mokré metody se pokrytí semen odstraní rozvlákňovačem ještě předtím, než se začne se sušením. Mokrý metoda vyžaduje dobré rozvlákňovací zařízení a přísun čisté vody, proto se používá v místech s dostatkem sladké vody. Účelem fermentace je rozložit slizovou vrstvu na jednoduché nelepivé látky, tak se získá vysoce kvalitní káva. Optimální teplota pro kvašení je 30 - 35 °C a kávová hmota je během něj 2 - 3krát promíchávána hráběmi. To, jestli byla káva dobře promyta, se zjistí pocitově, a to tak, že se „pergamene“ nelepí na ruce. Po mytí se „pergamene“ po dobu 12 hodin namáčí do čisté vody. Namáčení zlepšuje vzhled fazole a odstraní se jím nechtěné látky, např. diterpeny a polyfenolické látky. Následně se káva suší tak, že se rovnoměrně rozprostře do vrstvy vysoké asi 5 cm. Aby bylo zajištěno důkladné a rovnoměrné vysušení, je směs promíchávána. Suší se tak dlouho, dokud se vlhkost nesníží na cca 10 %. Pokud se suší špatně, může dojít ke zmenšování bobů anebo také k tomu, že jsou boby strakaté. [1, 3]

2.1.3.2. Suchá metoda

V této metodě se čerstvě sklizené plody rovnoměrně rozprostřou na asi 8 cm vysokou vrstvu na tzv. sušicí dvůr. Promíchávají jsou jednou za hodinu a jsou považovány za suché, pokud při zatřepání vydávají chrastivý zvuk. Toto vysušování trvá 12 - 15 dnů, záleží také na povětrnostních podmínkách. Suché boby ale nesmějí být vystavovány vlhku, nebo by mohlo dojít k jejich plesnivění. Sušení má velký vliv na kvalitu kávy - její barvu, tvar a vůni.

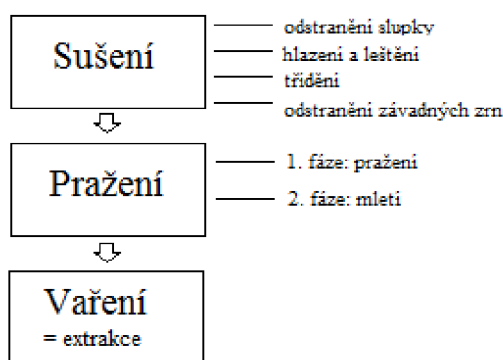
Pomocí této metody, ale nezískáváme tak kvalitní kávu, jako mokrou metodou, která je ale náročnější. [1, 3]

2.1.3.3. Zelená káva

Hlavní složky zelené kávy jsou sacharidy, proteiny, lipidy, minerály, kofein, kyselina chlorogenová, voda atd. Konzumovatelná forma zelené kávy se získá až po pražení. Hodnocení kvality zelené kávy je založeno na testu vůně a chuti, ale také na velikosti, tvaru a barvě bobů. [1]

2.1.3.4. Technologie zpracování kávy

Po suché nebo mokré metodě zpracování ještě následují další kroky, díky nimž se získává konečný produkt požadované kvality (viz Obrázek 3). Charakteristická chuť a vůně kávy jsou kombinací několika stovek sloučenin, které byly získány reakcemi, k nimž dochází během pražení a vaření. [1]



Obrázek 3: Technologie zpracování kávy

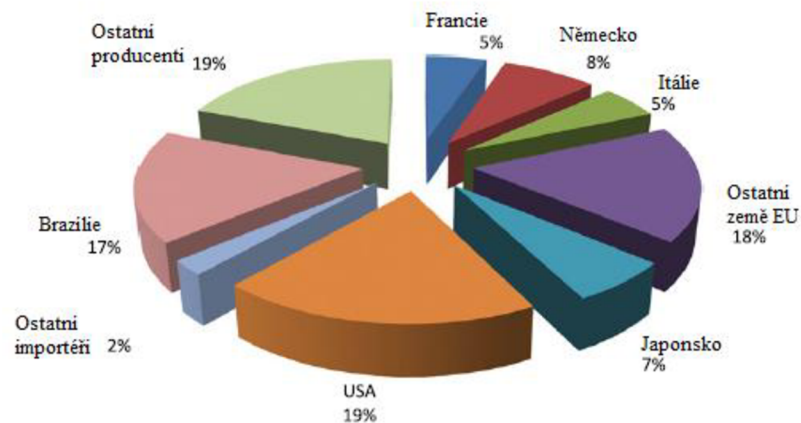
Tento proces je možné rozdělit do tří po sobě následujících fází: 1. sušení, 2. pražení neboli pyrolýza, 3. vaření. První fáze se vyznačuje pomalým uvolňováním vody a těkavých látek, ke kterému dochází v první polovině roku zpracování. Dochází zde ke změně barvy slupky, a to ze zelené na žlutou. Při sušení se snižuje vlhkost kávových zrn z 50 % na zhruba 11 %. Pokud ale zrna kávy obsahují méně vody, dochází ke ztrátě kvality kávy. Při sušení se musí zrna pravidelně promíchávat a obracet, aby bylo sušení rovnoměrné. Po sušení se ještě ze zrn odstraňuje slupka. K tomu už se v dnešní době využívají speciální stroje. Dalším krokem úpravy kávových zrn je jejich hlazení a leštění tak, aby byla odstraněna stříbrná blanka a jejich povrch byl hladký. V neposlední řadě je třeba zrna roztřídit podle jejich velikosti nebo podle hmotnosti, na což jsou využívány speciální gravimetrické separátory. Dalším krokem je odstranění závadných zrn, které většinou probíhá ručně. [1, 2]

V průběhu druhé fáze probíhají pyrolýzní reakce, což má za následek změnu jak fyzikálních, tak i chemických vlastností bobů. Teprve díky pražení získává káva aroma a chuť. Pomocí vysokých teplot dochází ke vzniku kyselin, uvolňují se cukry, oleje a také dochází k rozvolnění buněčné stěny. Také dochází k transformaci přirozeně se vyskytujících polyfenolických složek do směsi Maillardových produktů reakce. Po pražení, které má několik stupňů (světlé, střední, silné, dvojitě, italské) se kávová zrna melou. Mletím se ovlivňuje výsledná chuť kávy a dle stupně mletí se využívá k přípravě různých typů kávových nápojů. [1, 2]

Poslední fází je vaření kávy, což je heterofázní proces vedoucí k získání požadované emulze kávy (norské vaření kávy, turecký styl vaření kávy, překapávaná káva, espresso). Zpracování kávy má několik etap, z nichž každá má svůj účel. K výrobě vysoce kvalitní kávy je nezbytné, aby všechny fáze byly dodržovány v souladu s doporučenými postupy. [1, 2]

2.1.3.5. *Produkce a export*

Káva je důležitým zbožím a také oblíbeným nápojem na celém světě. Více než 90 % produkce je v rozvojových zemích, zatímco největší spotřeba je v průmyslově vyspělých ekonomikách. [1, 3]



Obrázek 4: Produkce kávy [13]

Globálně je 25 milionů malých výrobců závislých na produkci kávy. Největší podíl na světové produkci mají Brazílie, Vietnam a Kolumbie. Průměrná produkce kávy je ročně 7,0 milionů tun a mezinárodní organizace pro kávu (ICO) odhaduje, že v letech 2011-2012 se vyprodukovalo 130 milionů pytlů kávy. Denně se na celém světě vypije více než 2,25 miliard šálků kávy. [1, 3]

2.1.3.6. *Instantní káva*

Zelená kávová zrna jsou nejprve podrobena procesu pražení. Poté se pražená zrna namáčejí ve vodě při teplotách 100 a 180 °C. Vodný roztok, který obsahuje rozpuštěné látky, se odpaří a následně se suší pro získání rozpustné kávy. Jen polovina celkové hmotnosti pražených kávových bobů je použita jako instantní káva. Zbytek, nerozpustný materiál, se odstraní jako odpad. Tento zbytek je znám pod názvem kávová sedlina. Odvoz tohoto odpadu zvyšuje náklady na výrobu instantní kávy. Také to lze považovat za plýtvání surovinou, která by se dala dále využít. [22]

2.1.4. Vedlejší produkty při zpracování kávy



Obrázek 5: Vedlejší produkty při zpracování kávy [1]

Při zpracování kávy vzniká velké množství vedlejších produktů (viz Obrázek 5). Průmyslové zpracování kávových bobů je dokončeno oddělením kávového prášku, slupky a slizové části bobu. Získávání vedlejších produktů je závislé na tom, jak je káva zpracovávána, tzn. suchou nebo mokrou metodou. Kávové slupky, kůry a dužina tvoří téměř 45 % bobů, což znamená, že jsou hlavními vedlejšími produkty kávového průmyslu. Ty se používají pro různé účely, včetně extrakce kofeinu a polyfenolů. [1, 3, 4]

2.1.4.1. Dužina

Dužina kávy je vedlejší produkt získaný při zpracování a představuje 29 % hmotnosti suchého kávového bobu. Získává se při mokrému zpracování. Z každých dvou tun kávy se získá jedna tuna dužiny. Je bohatá na karbohydráty, proteiny a minerální látky (zejména draslík) a také obsahuje značné množství tříslovin, polyfenolů a kofein. Organické složky v dužině kávy jsou třísloviny 1,80 – 8,56 %, pektinové látky 6,5 %, redukující cukry 12,4 %, neredukující cukry 2 %, kofein 1,3 %, kyselina chlorogenová 2,6 % a kyselina kávová 1,6 %. [1, 5]

2.1.4.2. Slupka

Pokud je káva zpracovávána mokrou cestou, získávají se kávové slupky. Ty obvykle obsahují kávová zrna a představují asi 12 % hmotnosti bobu. Z 1 tuny plodů kávy se získá asi 0,18 tuny slupek. Slupky se skládají z 15 % vody, 5,4 % popele, 7 % bílkovin, 0,3 % tuků a ze 72,3 % ze sacharidů. Obsahuje 24,5 % celulózy, 29,7 % hemicelulózy a také 23,7 % ligninu. [1, 5]

2.1.4.3. Stříbrná blanka

Stříbrná blanka kávy je povlak kávových bobů, který se získá jako vedlejší produkt při pražení. Má vysokou koncentraci rozpustné dietní vlákniny (86 % z celkové hmotnosti vlákniny). Pravděpodobně v důsledku koncentrace fenolických sloučenin, mají tyto slupky velkou antioxidační schopnost (také v důsledku přítomnosti jiných sloučenin, např. melanoidiny, které se tvoří během procesu pražení). [1, 4]

2.1.4.4. Kávová sedlina

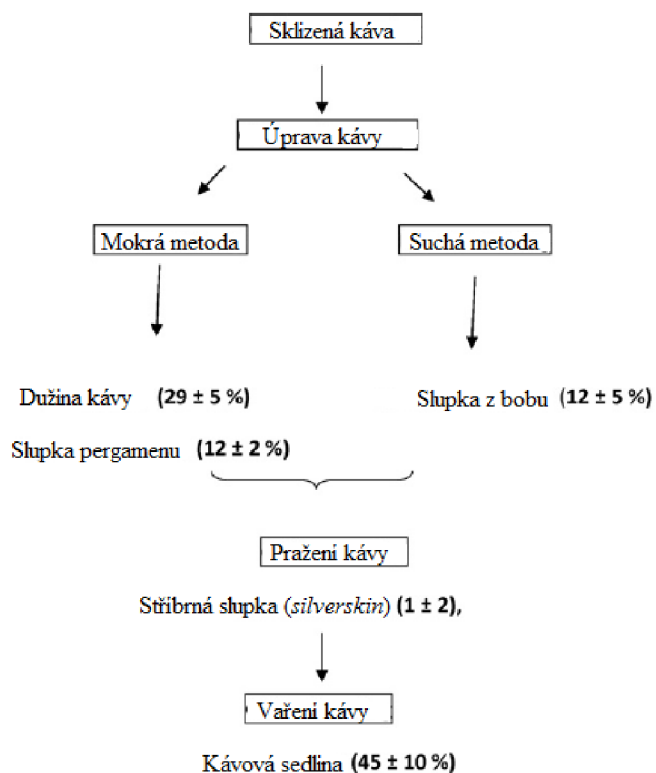
Celosvětově je téměř 50 % kávy zpracováváno na kávu rozpustnou. V průměru se z jedné tuny zelené kávy vytvoří 650 kg kávové sedliny. Ta je bohatá na hemicelulózy, především na bázi manosy, galaktosy a také má vysoký obsah bílkovin. Chemické složení se liší od rostliny k rostlině (viz Tabulka 1, Tabulka 2). To je také závislé na tom, z jaké zeměpisné oblasti káva je, nebo na stáří rostliny, klimatu a půdních podmínkách. [1, 6]

Tabulka 1: Chemické složení kávové sedliny [21]

složení	%	sloučeniny	%
celkové výtěžky	51,43	dichlormethan	19,67
		ethanol	5,36
		voda	1,20
		1% NaOH	25,10
lignin	26,51	klason lignin	22,71
		rozpuštěný lignin	3,80
polysacharidy	22,00	glukóza	59,20
		manóza	40,80

Tabulka 2: Prvky obsažené v kávové sedlině [21]

prvky	složení [g/kg]
Ca	0,771
Mg	0,178
K	0,253
Na	0,329
Fe	0,326
Cu	0,046
Zn	0,012
Mn	0,033



Obrázek 6: Zisk vedlejších produktů při výrobě kávy [1]

2.1.5. Vliv na životní prostředí

V zemích, ve kterých se produkuje káva, představují vedlejší produkty a odpady kávy zdroj velkého znečištění a vážný problém pro životní prostředí. Vedlejší produkty (např. dužina a slupka) se mohou dostat do odpadních vod, což vede k znečištění vody a půdy v okolí zpracovatelských jednotek. Kávová dužina je hlavní vedlejší produkt, který obsahuje hodně vlhkosti, což přináší problémy s likvidací, a to hlavně kvůli hnilobě. Kávová dužina je zemědělský odpadní produkt, který má negativní vliv na životní prostředí. [1, 5]

Využití těchto vedlejších produktů zůstává výzvou vzhledem k jejich obsahu kofeinu, volných fenolů a taninů (polyfenoly), o nichž je známo, že jsou velmi toxické. Předchozí studie potvrdily, že toxické látky mohou být částečně eliminovány pomocí úpravy teplou vodou, mikrobiální biodegradací a aerobním kvašením. [1, 5]

Taniny jsou obecně považovány za antinutriční látky a omezují použití kávy na více než 10 % v krmivech pro zvířata. Informace o dužině kávy jsou rozporuplné a je složité je interpretovat. Obsah taninu se liší v závislosti na typu kultivace. [1, 5]

Dužina a slupka kávy našly uplatnění jako hnojivo, krmivo pro dobytek a kompost pouze v malé míře. Techniky zpracování, ale nejsou velmi efektivní. Vzhledem k vysokému množství odpadů je stále snaha najít pro tyto dva odpadní produkty alternativní využití. [1, 5]

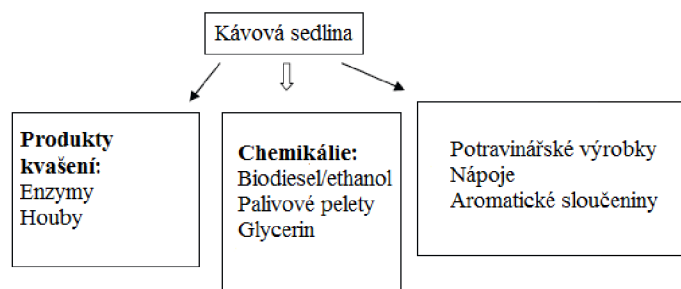
2.2. Využití vedlejších produktů kávy

Využívání vedlejších produktů kávy je třeba maximalizovat a naopak je potřeba snížit znečištění životního prostředí. Proto se vymýšlejí nové metody pro nakládání s odpady kávy. Nově vyvinuté metody pro biochemickou analýzu pomohou identifikovat osvědčené a potencionálně prospěšné látky. Tím se zvýší hodnota několika vedlejších produktů kávy, protože v dnešní době mají jen malé využití. [1]

Dužina a slupka kávy nejsou, vzhledem k přítomnosti některých anti-fyziologických a anti-nutričních faktorů, vhodnými substráty pro biokonverzi. V důsledku toho zůstává většina dužiny a slupky, které vznikly při zpracování kávy, nevyužita nebo nedostatečně využita. Pokud se odstraní toxické složky, pak se otevírají nové možnosti pro jejich využití jako substráty pro biologické procesy. Na detoxikaci kávy pracovalo hodně vědců pomocí různých prostředků. [1] Pro detoxikaci slupky kávy byly provedeny studie za použití tří různých kmenů plísní, a to *Rhizopus*, *Phanerochaete*, a *Aspergillus*. Výsledky pak ukázaly, že tyto plísňové kmeny lze využívat, zejména kmen *Aspergillus*. Valorizaci kávových slupek a dužiny je možno provést pomocí procesu SSF (Simultaneous saccharification and fermentation = současně zcukernatění a fermentace) pomocí plísně *Aspergillus niger*. Raimbault a kol. se ve své práci věnovali optimalizaci různých bioprocených parametrů jako je například pH, vlhkost a provzdušňování slupek kávy. [1]

Změny u dužiny kávy pomocí bakterií rodu *Streptomyces* prostřednictvím aplikace analytické pyrolýzy ukázaly, že ji bakterie mohou měnit na užitečnou úroveň a zbytek znečišťujících látek lze použít ke krmným účelům. [1]

Využití slupky a dužiny kávy není velké. Patří sem například výroba krmiva pro dobytek a výroba hnojiv. Tyto aplikace, ale nejsou technicky velmi efektivní, takže se vědci zaměřili na to, aby je bylo možno použít jako substrát pro biotechnologické procesy a vermikompostování (viz Obrázek 7). Tyto odpadní produkty obsahují značné množství zkvasitelných cukrů, takže představují vhodný substrát pro pěstování plísní a kvasinek. [1]



Obrázek 7: Získané produkty z kávové sedliny [1]

2.2.1. Produkce hub

Houby mají dobré nutriční a organoleptické vlastnosti. Jako substráty pro pěstování jedlých hub lze využít slupku kávy i kávovou sedlinu (Obrázek 8). Vědeckými pokusy bylo ověřeno, že se produkce hub zvyšuje, a to právě při jejich pěstování na odpadních produktech kávového průmyslu. [7]

2.2.2. Kompostování a vermikompostování

Jsou to dvě účinné technologie, které mohou být použity pro recyklaci průmyslových odpadů na průmyslové úrovni. Takto recyklované produkty zvyšují množství půdních živin a tím se zlepšuje růst rostlin (Obrázek 8). Pro kompostování a vermikompostování je vhodná slupka kávy. [8]



Obrázek 8: Pěstování hub na zbytcích kávového průmyslu (vlevo) a produktu vermikompostování (vpravo) [1]

2.2.3. Enzymy a sekundární metabolity

Nedávné studie ukázaly, že odpadní produkty kávového průmyslu lze použít pro výrobu enzymů, aromatických sloučenin, hub, atd. První možností k použití dužiny a slupky bylo pro produkci enzymů jako je pektináza, tannáza a caffeináza. Produkce enzymů pomocí SSF nejen snižuje náklady na výrobu (jak z kvašení, tak i následného zpracování), ale také poskytuje alternativní cestu pro efektivní využití těchto na živiny bohatých zbytků. V nedávné studii se ukázalo, že stříbrná blanka kávy je výborný materiál pro zdroj živin při produkci fruktofuranosidázy pomocí plísně *Aspergillus japonicus* (při SSF podmínkách). [9]

2.2.4. Citronová a gibberelová kyselina

Slupka kávy byla použita jako substrát pro levnou výrobu kyseliny citronové. K této výrobě byla použita houba *Fusarium moniliforme* a produkce gibberelové kyseliny dosáhla 1100 mg/kg. [10]

2.2.5. Ethanol

Využití zbytků kávy má také velký potenciál ve výrobě bio-ethanolu. Kromě toho se odhaduje, že produkce ethanolu ze zemědělských zbytků by mohla být zvýšena 16 krát oproti aktuálnímu množství výroby. Použité zbytky kávy byly podrobeny kyselé hydrolyze a hydrolyzát byl používán jako fermentační médium ze *Saccharomyces cerevisce*. Výtěžek produkce ethanolu pak dosáhl 50,1 %. Káva se také využívá pro výrobu destilovaných nápojů, a to proto, že kávové slupky jsou výbornou surovinou pro výrobu ethanolu. Nejlepší výsledky byly získány, když se používaly celé kávové slupky s kvasinkovým substrátem (3 g/l) při teplotě 30 °C. Za těchto podmínek bylo dosaženo produkce ethanolu $8,49 \pm 0,29$ g/100 g (vztaženo na sušinu), ($13,6 \pm 0,5$ g ethanol/l), což je hodnota, která je srovnatelná s údaji v literatuře i pro jiné zbytky jako jsou kukuřičné stonky, ječmen, sláma a hydrolyzované pšeničné výpalky. [11]

2.2.6. Paliva

Výroba energie z obnovitelných zdrojů a odpadních materiálů je atraktivní alternativou běžných zemědělských produktů. Zbytky kávy se používají jako palivo v průmyslových kotlích, a to díky jejich vysoké výhřevnosti - cca 5000 kcal/kg, což je srovnatelné s jinými zemědělsko - průmyslovými zbytky. [1]

Bioplyn - Slupku kávy je možno podrobit biomethanaci. Voda, která vytéká z extraktu kávového plodu, je zdrojem pro výrobu bioplynu. Ten může být nejlépe využit například k výrobě elektřiny. [12, 13]

Biodiesel - V poslední době se zvýšil zájem o bionaftu jako o ekologicky šetrné palivo. Bionafta je netoxická, biologicky odbouratelná. Skládá se především z methylesterů mastných kyselin, které jsou odvozené od rostlinných olejů nebo živočišných tuků. Ve srovnání s obyčejnou naftou má několik výhod - má vyšší cetanové číslo než klasická nafta a neobsahuje téměř žádné aromatické látky a síru. Také produkuje méně CO, CO₂ a uhlovodíků. Na druhou stranu ale může zvýšit emise oxidů dusíku. Nicméně cena bionafty je velmi vysoká. Dá snížit tak, že se minimalizují náklady na výrobu, a to použitím levnějších surovin. Pro výrobu bionafty se tedy dají použít například odpady z jedlých olejů, živočišné tuky a jiné zbytky biomasy. Tím je například kávová sedlina, která obsahuje vysoké procento oleje. Olej, který je extrahovaný ze sedliny kávy, je totiž vysoce kvalitní a nákladově efektivní surovinou pro výrobu bionafty ve srovnání s jinými druhy odpadů. Je levnější, má vyšší stabilitu a také příjemnější vůni. Za předpokladu, že je kávová sedlina obsahuje 14 hm. %, by se produkce bionafty zvýšila přibližně na 1123 milionů tun ročně.[13]

Kávová sedlina se nejdříve vysuší při teplotě 102 °C. K extrakci se využívají rozpouštědla jako např. isopropanol, ethanol, aceton, toluen, chloroform a hexan. Olej se z kávy extrahuje v Soxhletově extraktoru a množství oleje se určují z původní hmotnosti vzorku a zvážením extrahovaného oleje. [13]

2.2.7. Kompost

Slupky kávy jsou dobrým zdrojem humusu a organického uhlíku. Kompost z ní vznikne asi za tři týdny. Vedlejší produkty z výroby instantní kávy jsou pevné odpady s vysokým obsahem organických látek. Studie o použitelnosti kompostovacího procesu provzdušňování směsi odpadu kávy a zemědělských odpadů byly uspokojivé a experimenty vedly k výrobě vysoce kvalitního kompostu, který měl poměr uhlíku k dusíku řádově 13 : 1 až 15 : 1. Konverze 350 tisíc tun slupky kávy by tedy přinesla přibližně 87 tisíc tun organického hnoje. [14]

2.2.8. Barviva

Odpady po zpracování kávy jsou také levným a snadno dostupným absorbentem pro odstranění kationových barviv. Slupka může být také využita jako prekurzor pro výrobu aktivního uhlí a přispívá ke snížení průmyslových zbytků v kávovém průmyslu. Uhlíkaté materiály byly vyrobeny z kávové sedliny pomocí mikrovláknového záření a jsou užitečné pro šetření energie při karbonizaci organických odpadů. [15]

2.2.9. Bioaktivní látky

Bioaktivní látky jsou výživové prvky, které se obvykle vyskytují v malém množství v potravinách a jsou intenzivně studovány pro vyhodnocení jejich vlivu na zdraví. Zemědělsko - průmyslové vedlejší produkty jsou dobrým zdrojem fenolických sloučenin a byly zkoumány jako zdroj přírodních antioxidantů. Také byla prozkoumána extrakce polyfenolů z dužiny kávy. Pro použití vedlejších produktů kávy, jako je například stříbrná blanka se využívá sedm různých kmenů hub z rodu *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* a *Neurospora*. Dochází k uvolnění fenolické skupiny a cílem je biologická detoxikace tohoto zbytku. Z vedlejších produktů při zpracování kávy ve zpracovatelského průmyslu byly získány produkty s 65 – 70 % antioxidační aktivitou. [16]

2.2.10. Vlákna

Zemědělské odpady jsou také velkými zdroji vláknin, jako je celulóza, hemicelulóza, lignin, pektin a polysacharidy. O rozpustných a nerozpustných frakcích vlákniny je známo, že mají celou řadu příznivých účinků na zdraví, včetně snížení rizika onemocnění zažívacího ústrojí, kardiovaskulárních onemocnění a obezity. Například stříbrná blanka obsahuje až 80 % vlákniny. Tato vláknina má antioxidační účinky. Vezmeme-li v úvahu, že vedlejší produkty byly v zemích produkujících kávu získány v milionech tun, tak funkční látky extrahované z těchto vedlejších produktů, jako je dužina, slupka, stříbrná slupka a kávová sedlina, lze použít jako přírodní zdroj antioxidantů a konzervačních látek v potravinářských přípravcích. [17]

2.2.11. Antokyany

Antokyany jsou flavonidové sloučeniny odpovědné za červené nebo modré zbarvení mnoha druhů ovoce. Při mokřím zpracování kávy se barva kávy působením enzymů rychle degraduje a dostává se na povrch vnější slupky a dužiny. Tak velké množství barviv je pro tento proces zbytečné. Proto byla jak čerstvá káva, tak i její odpady zkoumány jako potenciální zdroje antokyanů, které by se využívaly jako přírodní potravinářská barviva. O antokyanech kávy pak bylo zjištěno, že mají velké množství biologických účinků a je možno je využít jako barvivo a taky jako bioaktivní složku pro vyvíjení potravin. [18]

2.2.12. Potravinářské výrobky, nápoje a aromatické sloučeniny

Zemědělsko-průmyslové zbytky lze použít jako substráty v biotechnologických procesech. Čerstvá dužina kávy se snadno zpracuje do různých potravinářských komodit, jako jsou marmelády, šťávy, koncentráty, želé a také látky určené k aromatizaci. Kávová sedlina se po odmaštění extrahuje a poté se z ní získá prášek, který má vysokou antioxidační kapacitu a může být použit jako přísada v potravinářském průmyslu pro zachování funkčních vlastností a ovocné chuti. Výsledky sledování potvrdily, že během kvašení vzniká silné ananasové a banánové aroma. [19]

2.2.13. Výroba dřevotřískových desek

Nedávný zájem o výrobu materiálů šetrných k životnímu prostředí vedl k využití vedlejších produktů ze zemědělství jako suroviny k výrobě dřevotřískových desek. Vedlejší produkty zpracování kávy jako např. slupka kávy obsahují velké množství celulózy a hemicelulózy, což je tedy činí srovnatelnými se dřevem. Slupku kávy je možné použít v konstrukčních a nenosných panelových produktech, protože je velmi pevná a má dobrou ohebnost. Proto lze při výrobě dřevotřískových desek nahradit dřevo slupkami kávy (cca do 50 %). [1]

2.2.14. Krmivo pro zvířata

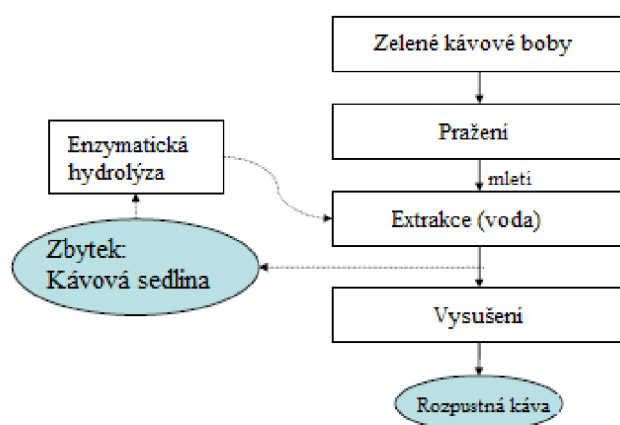
Slupky a dužinu kávy je také možno použít ke krmení hospodářských zvířat. Bylo prokázáno, že je možno použít i kávovou sedlinu. Limitujícím faktorem je vysoký obsah ligninu ($\approx 25\%$). Dužina obsahuje 12 % bílkovin a v krmivu pro skot tvoří asi 20 %, u drůbeže 5 %, u ptactva 3 % a v krmivu pro prasata asi 16 %. [20]

2.2.15. Aktivní uhlí a biosorbenty

Pyrolýza dužiny kávy (impregnovaná s kyselinou fosforečnou) vytváří materiály s dobře vyvinutou strukturou pórů s vysokou adsorpční schopností. Poměr impregnace má silný vliv na strukturu pórů. Právě namáčení dužiny s kyselinou fosforečnou umožňuje vysokou adsorpční kapacitu. Možné je také alternativní využití slupky kávy jako sorbent pro odstraňování iontů těžkých kovů z vodných roztoků. Zbytky kávy z výroby bionafty (vadné zbytky kávy) byly vyhodnoceny jako vhodná surovina pro výrobu sorbentů, kterými lze odstranit methylenovou modř z vodného roztoku. Studie, které byly provedeny, prokázaly, že tyto zbytky jsou vhodné pro odstranění kationových barviv. Aktivní uhlí bylo vyrobeno reakcí odpadů kávy s roztokem $ZnCl_2$. Elektrody připravené z uhlíků kávové sedliny vykazovaly vynikající stabilitu při i vysokých rychlostech nabíjení - vybíjení. Dobré elektrochemické vlastnosti uhlíků kávové sedliny jsou přičítány jejich pórovitosti. [1]

2.3. Hydrolýza kávové sedliny

Kávová zrna se skládají převážně z polysacharidů (43 – 50 %), ale také obsahují bílkoviny, lipidy, anorganický materiál a nerozpustný lignin. Kávová sedlina je hlavním zbytkem, který vzniká při výrobě instantní kávy. Tento odpad se většinou skládá z polysacharidů, jako je například celulóza. Tyto cukry nejsou rozpuštěny při extrakci a tak zůstávají právě v sedlině. Technologie, která by zvýšila množství rozpustných látek z pražených kávových zrn, by výrazně vylepšila efektivitu procesu extrakce. [22, 23]



Obrázek 9: Úprava zelených kávových bobů na instantní kávu - využití enzymatické hydrolyzy [22]

2.3.1. Chemická hydrolyza

Je možno použít chemickou hydrolyzu odpadů kávy. Sem patří například hydrolyza pomocí kyseliny, vysoké teploty a tlaku. Materiál se podrobí hydrolyze pomocí zředěné kyseliny (např. H_2SO_4). Jak už bylo řečeno, kávová sedlina je bohatá na cukry a právě pomocí hydrolyzy s kyselinou se tyto cukry extrahují. Na základě provedených pokusů byla účinnost hydrolyzy díky použití kyseliny (100 mg/g sušiny) za 163 °C vysoká. Hemicelulóza se rozložila na mannózu (100 %), galaktózu (77,4 %) a arabinózu (89,5 %). Účinnost hydrolyzy hemicelulózy tedy dosáhla asi 87,4 %. [24]

2.3.2. Enzymatická hydrolyza

Použitím enzymů, které se podílejí na degradaci stěn rostlinných buněk, se zvýší rozpustnost pevných látek při výrobě instantní kávy (viz Obrázek 9). Hlavním cílem studií bylo identifikovat potencionální enzymy (mannázy, celulózy a xylanázy) pro použití při hydrolyze kávové sedliny. Pro výrobu těchto enzymů se využívají také plísně jako např. *Aspergillus niger*. Jejich použitím se změní aktivita a tepelná stabilita enzymů. Pokud použijeme mannázové enzymy, získáme větší množství rozpuštěných látek než při použití jiných enzymů jako jsou např. celulózy a pektinázy. Největší výtěžek rozpustných látek, kterého bylo díky mannáze dosaženo, byl 17 %. [22, 23]

2.4. Hydrolytické enzymy

Za nejvhodnější zdroj enzymů lze považovat různé mikroorganismy. Z rostlinných materiálů se připravuje několik druhů proteáz. Z živočišných materiálů mají větší význam chymozin, trypsin, pepsin, amylasy a lipasy. Ostatní průmyslově využívané enzymy jsou mikrobiálního původu. [25]

Proteázy jsou prvními enzymy, které byly použity ve větším rozsahu a dodnes si zachovaly prim. Z celosvětového hlediska je asi 25 – 30 % produkce enzymů spotřebováno v potravinářském průmyslu, pak následují enzymy pro analytické účely. Vyráběné enzymové preparáty se liší podle předpokládaného použití, a to v deklarované aktivitě, čistotě, formě

a stabilitě. Isolace enzymu je nákladná záležitost. Drahé čisté enzymy jsou přijatelné jen pro vědecké účely a některé vědecké aplikace. [25]

Vhodnost enzymového preparátu k té které aplikaci musí být posuzována z různých aspektů - legislativní, zdravotní, technologické a ekonomické. V poslední době je možno sledovat snahu o větší využívání tekutých enzymových preparátů, a to z toho důvodu, že se u nich snadno upravuje jejich aktivita (naředění inertním, případně stabilizačním činidlem). Výsledný technologický efekt použitého preparátu je závislý na aktivitě jednotlivých enzymů. Nízké koncentrace enzymů ve finálním výrobku se velmi často těžce prokazují, a proto byly vyvinuty metody, které mají vysokou citlivost. [25]

Lze konstatovat, že největší význam má zatím asi 10 typů enzymových preparátů, a to: bakteriální a plísňové proteázy, rostlinné proteázy, živočišná a mikrobiální syřidla, plísňové a bakteriální amylasy, glukosyláza, invertasa, glukosyltransferáza, pektolytické enzymy a celulózy. [25]

2.4.1. Celulózy

Celulóza je nejhodnotnější se vyskytující organický zdroj potravy, paliva a chemikálií, je složena z glukózových jednotek spojených pomocí 1, 4 - glykosidických vazeb. Typ vazby a vysoce uspořádaná krystalová forma této sloučeniny dělá celulosu více odolnou vůči trávení a hydrolyze, než například škrob. Mezi enzymy potřebné pro hydrolyzu celulosy patří endoglukanasy, exoglukanasy a β - glukosidasy. [25, 26]

Když je celulóza hydrolyzována endoglukanosou, dochází k produkci oligosacharidů, cellobiosy a glukosy. Exoglukanáza hydrolyzuje β - 1, 4- D- glykosidické vazby v celulóze, a tak se uvolňuje cellobiosa z neredukujícího konce řetězce. Glykosidázy termofilního původu se využívají ve farmaceutickém průmyslu pro hydrolyzu cellobiosy na glukosu. β - glykosidázy se považují jako součást systému celuláz, jelikož stimulují hydrolyzu celulosy, a to i přesto, že na celulózu nemají přímý účinek. [25, 26]

Degradace celulózy (její rychlost) je závislá na obsahu vody v prostředí, ale také na hodnotě pH a teplotě, při které degradace probíhá. Uvádí se, že pH optimum celuláz je pH 5-6 a optimální teplota je 30 – 50 °C. [26]

Tyto enzymy představují složitý enzymový systém katalyzující hydrolyzu nativní celulózy. Patří do enzymového vybavení některých mikroorganismů, prvoků a vyšších hub. Průmyslový význam, ale mají pouze celulózy mikrobiální. Je třeba si uvědomit, že u mikroorganismů musí být degradace celulózy spojena se schopností odbourávat složitější systémy lignocelulosových a hemicelulosových komplexů. Celulázové komplexy jsou vyráběny především za pomoci kmenů *Trichoderma viride* a *Aspergillus niger*. Dále byly studovány celulózy *Fusarium solani*, *Trichoderma koningii* a nebo například bakterie rodů *Sporocythophaga* a *Cytophaga*. [25]

2.4.1.1. Průmyslové aplikace celuláz

Aktuálně se celulózy enzymy v průmyslových procesech využívají k extrakci ovocných šťáv, v pracích prostředcích (v detergentech) jako změkčovače a také k zesvětlení barvy. Důležité je jejich využití při předběžné úpravě biomasy, která obsahuje celulózu (pro zlepšení nutriční kvality), nebo při předběžné úpravě průmyslových odpadů. [26]

Isolované celulázy se zatím používají k různým aplikacím také v zemědělství. Využívají se pro zvýšení extraktivnosti či rozpustnosti materiálu nebo k pozměnění jeho konzistence, čehož lze docílit částečnou hydrolyzou celulosové složky. Jedná se o aplikace při instantizaci různých produktů, a to například kávy a čaje. V laboratorní praxi jsou tyto enzymy využívány k izolaci různých látek z rostlinných materiálů. [25]

Produkce celulázy je také jedním z nejdražších kroků během produkce ethanolu z celulóзовé biomasy (představuje přibližně 40 % z celkových nákladů). V potravinářském průmyslu se využívají k degradaci celulosy kyseliny. Také je známo mnoho celulótických enzymů termofilního původu, jejichž funkce ale zůstává nejasná. [26]

Do aplikace celulótických enzymů se vkládají velké naděje. V poslední době lze pozorovat snahu o vyvinutí vhodných systémů enzymové hydrolyzy pro využití vzniklých produktů k výrobě sacharidů, bílkovin a mnoha dalších látek. Kromě využití izolovaných celulótických enzymů se zdají být nadějně technologie, které přímo využívají celulótické mikroorganismy. [25]

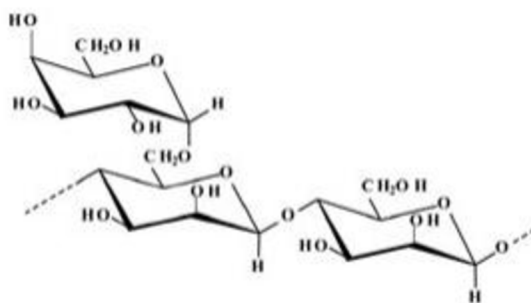
2.4.2. Mannázy

Mannan je druhou nejhoňější složkou hemicelulózy. Jsou obsaženy například ve dřevě, hlízách, rostlinných semenech a zrnech. Skládají se ze zbytků D- manózy (tzv. lineární mannan) nebo jsou kombinací zbytků D- manózy a D- glukózy (tzv. glukomannan), které jsou spojeny 1,4 vazbami. Mannan také může být spojen 1,6- vazbami s D- galaktózou (tzv. galaktomannan nebo glukogalaktomannan). [27]

Galaktoglukomannan je hlavní složkou hemicelulózy v měkkém dřevě jehličnatých stromů a tvoří asi 15 – 25 % hmotnosti suchého dřeva. Jelikož galaktomannan není komerčně dostupný, tak se pro výzkum využívá galaktoglukomannan. Zdrojem galaktomannanu jsou slupky akátu nebo rohovníku (*Ceretonia siliqua*).

Tyto enzymy jsou rozděleny do několika glykosid - hydrolyzových (GH) skupin, a to na základě sekvence aminokyselin, strukturální a mechanické podobnosti. Patří k nim enzym endo- 1, 4- D- mannáza, což je stěžejní enzym, který iniciuje degradaci odštěpením mannanu na 1, 4- manno- oligomery. [27]

Galaktomannan je heterogenní polysacharid, který je složený z mannanového jádra a laktofuranosylového postranního řetězce. Nachází se v buněčné stěně zejména plísní, hub, a to hlavně rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, ale je možné ho nalézt také u jiných druhů hub. [28]



Obrázek 10: Chemická struktura galaktomannanu [28]

2.4.3. Proteázy

Tyto enzymy jsou schopné hydrolyzovat peptidovou vazbu bílkovin. Vykazují esterovou, koagulační a také např. transpeptidasovou aktivitu. Lišit se ale můžou různými vlastnostmi – fyzikálně chemické vlastnosti, původ, působení (mechanismus) a jejich specifitou a praktickým využitím. Jejich funkcí je hydrolýza proteinů na peptidy a oligopeptidy hydrolyzují na aminokyseliny. [26]

Proteázy se obecně dělí do dvou kategorií: exopeptidázy, které štěpí aminokyseliny z konců proteinového řetězce a endopeptidázy, které štěpí peptidové vazby uvnitř proteinu. Proto se stávají hlavními průmyslovými enzymy - představují více než 65 % světového trhu. [26]

Proteázy můžou být živočišného, rostlinného nebo mikrobiálního původu. Mikrobiální proteolytické enzymy mají široké uplatnění v praxi. Proteázy, které jsou mikrobiálního původu lze dělit do dvou skupin – první skupina jsou enzymy bakteriální a druhá plísňové. Mezi nejpoužívanější patří alkalické proteázy. Neutrální proteázy mají optimum působení při pH 7 - 8, jsou bakteriálního (rod *Bacillus*) a plísňového původu (rod *Aspergillus*). Kyselé proteázy mají pH optimum mezi 3 - 5 a jsou vesměs živočišného původu. [25]

2.4.3.1. Průmyslové aplikace proteáz

Tyto enzymy jsou ve velké míře používány v potravinářském, farmaceutickém a textilním průmyslu. Jsou využívány při výrobě biodetergentů, v mlékárenském, kožedělném, pekárenském a masném průmyslu. Bílkovinné hydrolyzáty jsou připravovány pro farmaceutické preparáty nebo pro krmivářské účely. Podle toho k jakému účelu tento hydrolyzátní potřebujeme, se vybírá surovina, enzym i technologie. Například pro farmaceutické účely jsou většinou vyráběny trypsinové hydrolyzáty kaseinu, nebo pro potravinářský průmysl má největší význam hydrolýza soje. Bakteriální proteázy mají větší praktické využití, a proto jsou vyráběny ve velké míře. Plísňové proteázy mají uplatnění v pekárenském průmyslu. [25, 26]

K získání proteáz se využívá kultivace s plísní *Phanerochaete chrysosporium*. V závislosti na výběru plísně dochází k produkci enzymů, které mají různou substrátovou specifitu. [26]

Jejich aplikace se ale bude v budoucnu stále navyšovat, a tak bude potřeba stabilních biokatalyzátorů, které budou schopné odolat tvrdým podmínkám těchto průmyslových provozů. [26]

2.4.4. Lipasy

Lipázy jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu triacylglycerolů. Mezi jednotlivými lipázami ale existují rozdíly, které určují specifitu vzhledem k poloze hydrolyzované esterové vazby, vázané mastné kyseliny i v rychlosti štěpení. Lipázou katalyzovaná reakce probíhá v heterogenním systému (olej - voda), a proto je komplikovaná. [25]

Lipázy mikrobiálního původu jsou nejvíce univerzální enzymy a jsou známy tím, že zajišťují biokonverzní reakce, mezi které patří hydrolýza, interesterifikace, esterifikace, alkoholýza, acidolýza a aminolýza. Jejich jedinečné vlastnosti zahrnují substrátovou specifitu, stereospecifitu a schopnost katalýzy heterogenní reakce na rozhraní ve vodě rozpustných a ve vodě nerozpustných systémech. [26]

Lipázy jsou rozšířeny celosvětově, jsou součástí fauny i flory. Nejhojněji se nacházejí v bakteriích, houbách a kvasinkách. Většina těchto enzymů je aktivní při teplotě 60 °C a pH 7,0. [26]

2.4.4.1. Průmyslové využití lipáz

Produkové estery hrají velkou roli v potravinářském průmyslu jako složky chuti a vůně. Vzhledem k dlouhému řetězci methyl a ethyl esterů karboxylových skupin poskytují cenné oleo - chemické složky, které mohou fungovat jako palivo pro vznětové motory. Estery karboxylových kyselin s dlouhým řetězcem a alkoholových skupin (např. vosků) mají využití jako maziva a aditiva v kosmetických přípravcích. [26]

Tyto enzymy jsou používány k ovlivnění chuti a vůně v různých potravinářských výrobcích, též se používají k rychlému zrání a vytvoření charakteristické chuti čokoládové hmoty. Dále byly použity jako součást digestivních prostředků a perspektivní je také jejich použití při syntéze triacylglycerolů požadovaných vlastností. Mezi další aplikace patří hydrolýza mléčného tuku v mlékárenském průmyslu nebo odstranění necelulosových nečistot ze surové bavlny. Také se používá při výrobě buničiny v papírenském průmyslu, léků ve farmaceutickém průmyslu a v kožedělném průmyslu k odstranění tuku. S využitím imobilizované lipázy *Candida antarctica* se vyrábí bionafta z rostlinných olejů. [25, 26]

Žádoucími vlastnostmi lipáz při jejich výrobě jsou tepelná a alkalická tolerance. Ke splnění tohoto cíle je neustále hledán zdroj vysoce účinných lipolytických enzymů se zvláštní stabilitou vůči pH, teplotě, iontové síle a organickým rozpouštědlům. Některé lipasy jsou schopny pracovat i při teplotě 100 °C, ale jejich poločasy života jsou krátké. Ve většině průmyslových procesů byly lipázy použity při teplotách vyšších než 45 °C. Tyto enzymy tudíž vyžadují optimální teplotu 50 °C. [26]

2.5. Vybrané mikroorganismy

2.5.1. Plísně

Jako plísně jsou označovány mikroskopické vláknité mikroorganismy, které náleží mezi houby (*Fungi*). Podle přítomnosti a typu pohlavního rozmnožování se technicky důležité plísně dělí do následujících taxonomických jednotek:

1. Do třídy *Zygomycetes*, ta patří mezi *Zygomycotina* a pro plísně, které sem náleží je charakteristické jednobuněčné (nepřehrádkové) mycelium a pohlavním rozmnožováním a tvorbou tzv. zygospory; k nepohlavnímu rozmnožování tvoří endospory. [29]
2. Do podkmenu *Ascomycotina*, který je charakteristický přehrádkovaným myceliem a pohlavním rozmnožováním za tvorby askospor, které jsou tvořeny v asku; pro nepohlavní rozmnožování tvoří exospory. [29]
3. Do podkmenu *Deuteromycotina* (*Fungi imperfecti*, tj. houby nedokonalé, přesněji nedokonale známé) s přehrádkovaným myceliem, avšak pouze s nepohlavním rozmnožováním (pomocí exospor). [29]

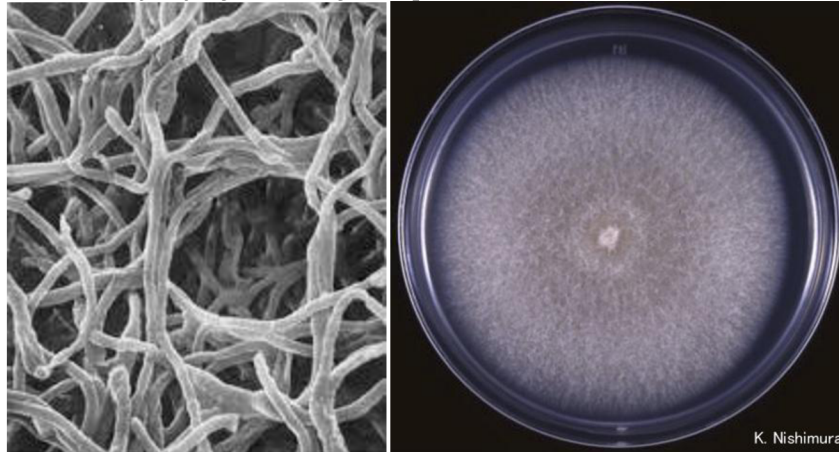
2.5.1.1. *Fusarium solani*

Rod *Fusarium* zahrnuje širokou a různorodou skupinu hub, které jsou důležité pro potravinářský a farmaceutický průmysl, lékařství a zemědělství. *Fusarium solani* je fytopatogenní houba a je důležitým původcem několika chorob plodin. Tento druh byl poprvé

popsán C. F. P. Von Martiniusem v roce 1842 jako *Fusisporium solani* ze shnilých hlíz bramboru. [30]

Hostitelé *Fusarium solani* jsou brambory, hrách, fazole, nebo například meloun, okurky a dýně. Některé kmeny také můžou působit nemoci u lidí. [30]

Kolonie se rychle rozrůstají, jsou vlnité se smetanově bílým vzdušným myceliem. Hyfy jsou přepážkovité a hyalinní. Makroskopická morfologie se může významně měnit v závislosti na médiu. Makrokonidie jsou mírně zakřivené, poměrně široké, silnostěnné a obvykle mají 3 - 5 přepažení. Mikrokonidie vyrůstají z dlouhých monofialid, mají jeden až tři póry, jsou oválné, nepravidelného tvaru a vyskytují se v hojném počtu. [30, 31]



Obrázek 11: Mikroskopický obraz plísně *Fusarium solani* [32], Obrázek 12: *Fusarium solani* na Petriho misce [33]

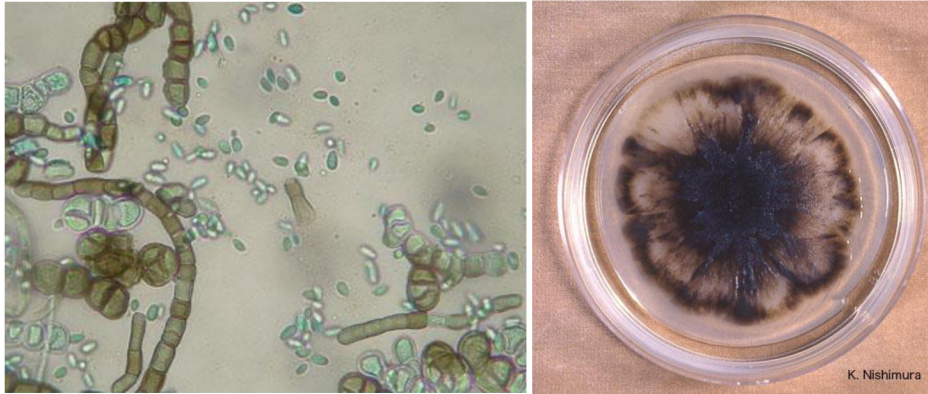
2.5.1.2. *Aureobasidium pulluans*

Tento mikroorganismus patří do třídy *Deuteromycetes*. Je to tzv. černý kvasinkový organismus. Rod *Aureobasidium* projevuje mnohé známky bazidiomycet, ale i askomycet. [34]

Je to převážně saprofytický organismus, ale vyskytuje se i jako parazit na rostlinách a může způsobit i choroby u zvířat. V moštu při kvašení může vytvářet nevzhlednou sytě černou masu. *Aureobasidium* je bohaté na různé hydrolytické enzymy, čehož se využívá v praxi. Rozkládá celulózu, hemicelulózu, xylany, lignin nebo například škrob. [34]

Kolonie jsou rychle rostoucí, hladké, pokryté slizkými konidii, které jsou smetanové, růžové až hnědé nebo černé barvy. Tento druh má dvě varianty. U jedné kolonie zůstávají růžové, světle hnědé nebo žluté, a to po dobu nejméně tří týdnů. Druhý typ brzy mění barvu na černou nebo zeleno - černou kvůli temným hyfám, které se často rozpadnou na jednotlivé buňky. [35]

Konidie vznikají synchronně v hustých skupinách, jsou hyalinní, mají hladké stěny a jsou jednobuněčné a elipsoidního tvaru. Rozmnožuje se pomocí blastokonidií, které pučí po stranách hyf. Tato konidie pučí v další sekundární konidii, která je menší než primární. Jednotlivé buněčné články starších hyf se mohou rozpadat v arthrospóry. V životním cyklu se vyskytují též chlamydo-spory, které v době zralosti uvolňují přežívající buňku, která potom vyklíčí. Střídání různých fází asexuálního vývoje bývá cyklické. [35]



Obrázek 13: *Aureobasidium pulluans* - mikroskopický obraz plísně [36], Obrázek 14: Plíseň *Aureb.pulluans* na Petriho misce [37]

2.5.1.3. *Phanerochaete chrysosporium*

Phanerochaete chrysosporium je jednou z plísni, která rozkládá dřevo. Tato plíseň tvoří velmi tenké plodnice, které způsobují bílý povlak dřeva. [38]

Je to bílá plíseň, jež produkuje unikátní extracelulární oxidační enzymy. Tyto enzymy degradují lignin stejně jako jemu příbuzné sloučeniny, které se nacházejí ve výbušných kontaminovaných materiálech, pesticidech a toxickém odpadu. Souhrnně jsou plísně rodu *Phanerochaete* označovány jako bílé, protože degradují hnědý lignin a zanechávají po sobě bílou celulózu. Patří mezi *Bazidiomyceta*, což je skupina hub, do které patří i jedlé houby stejně jako rostlinné patogeny jako jsou sněti a rzi. [39]

Vylučují řadu peroxidáz a oxidáz, které působí nescificky prostřednictvím generování volných radikálů ligninu. Tyto volné radikály následně procházejí spontánním štěpením. Tato plíseň je velmi užitečná, a to z několika důvodů. Za prvé, na rozdíl od některých bílých plísni ponechává celulózu dřeva prakticky beze změny. Za druhé, má velmi vysokou optimální teplotu, a to asi 40°C. Nescifická povaha a oxidační potenciál enzymů způsobili značný zájem o uplatnění plísně *Phanerochaete chrysosporium* v bioprocesech. [39]



Obrázek 15: Mikroskopický obraz plísně *Phaneroch.chrys.* [40], Obrázek 16: Plíseň *Phaneroch. chrys.* na Petriho misce [40]

2.5.2. Bakterie

Přestože jsou bakterie po fyziologické stránce velmi rozmanité, po morfologické stránce jsou mezi jednotlivými rody velké rozdíly. Tvar buněk bakterií je nejčastěji tyčinkovitý, méně

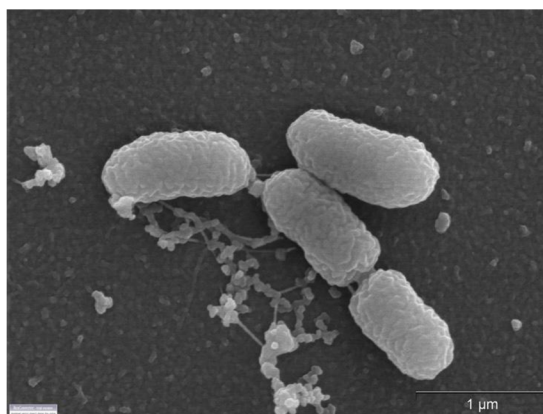
často kulovitý. Vlákňitý tvar se vyskytuje u poměrně rozsáhlé skupiny půdních bakterií patřících do rodu *Aktinomycetales* a u několika dalších rodů. [25]

Většina bakterií se rozmnožuje dělením. Dělení je charakterizováno tím, že ve střední části buňky začne z cytoplazmatické membrány vyrůstat prstencovitá vychlípenina směřující dovnitř buňky, až vytvoří přepážku. Bakterie obsahují v buněčné hmotě vodu, bílkoviny, sacharidy, lipidy a popel, jehož hlavními složkami jsou fosfáty. [25]

2.5.2.1. *Burkholderia cepacia*

Tyto bakterie jsou gramnegativní a aerobní, ve tvaru tyčinek a jsou pohyblivé. Jsou běžně rozšířené v přírodě, lze je nalézt v přírodní stojaté nebo tekoucí vodě a v půdě, v níž jsou většinou v symbióze s kořeny rostlin. [42]

Bakterie *Burkholderia cepacia* produkují katalázu, ale nefermentují laktózu. Jsou to oportunistní patogeny, což znamená, že tyto mikroorganismy vyvolávají onemocnění pouze u hostitele, který má poruchu imunity. U lidí může způsobit onemocnění plic jako je například zápal plic. Je u ní známo, že způsobuje plicní pneumonii, a to zejména u pacientů s cystickou fibrózou. [42]



Obrázek 17: Mikroskopický obraz bakterie *Burkholderia cepacia* [43]

2.5.3. Purifikace enzymů

Způsoby purifikace proteinů mohou být různé, liší od jednoduchých jednostupňových srážecích postupů až po velké výrobní procesy. Nejčastěji je k dosažení požadované čistoty potřeba více než jeden stupeň pročištění. [44]

Klíčem k úspěšnému a efektivní purifikaci proteinů je výběr nejvhodnější techniky, optimalizace jejich podmínek podle požadavků. Také je potřeba kombinovat je tak, aby bylo dosaženo co největšího výtěžku a zároveň byl minimalizován počet potřebných kroků. [44]

2.5.3.1. Ultrafiltrace

Technika oddělení molekul v roztoku na základě jejich velikosti, průchodem přes polopropustné membrány s póry o známých rozměrech. Od běžné filtrace se liší pouze velikostí částic, které jsou separovány. Filtrace se používá pro částice větší než 1 μm , ultrafiltrace pro částice 2 až 1000 nm. Membránový filtr zadrží většinu makromolekulárních látek, zatímco většina malých molekul projde membránou do filtrátu. Velmi malé molekuly jako soli, aminokyseliny a cukry obvykle procházejí membránou kvantitativně.

Protože membránou procházejí i molekuly rozpouštědla (vody), snižuje se objem roztoku nad membránou a koncentrace molekul, které membránou neprocházejí, se zvyšuje. [45, 46]

Membránovou filtraci lze tedy použít k odstranění rozpouštědla a solí z roztoku makromolekul, k výměně pufrů a ke zkoncentrování roztoku makromolekulárních látek. Membrány jsou vyráběny s různými velikostmi pórů a pro různé typy filtračních zařízení, která jsou konstruována pro objemy od několika mililitrů do několika litrů. Ultrafiltrace se obvykle provádí za mírně zvýšeného tlaku (0,1 – 1 MPa), čímž se zvýší průtoková rychlost a celý proces proběhne poměrně rychle. [46]

2.5.3.2. Dialýza

Tato separační technika využívá difúze nízkomolekulárních látek membránou, nepropustnou pro velké molekuly a částice, z roztoku o vyšší koncentraci do roztoku o koncentraci nižší. V okamžiku, kdy se koncentrace látek procházejících membránou na obou stranách membrány vyrovnají, proces se zastaví. Látka s nižší relativní molekulovou hmotností přechází rychleji, než látka s vyšší hodnotou M . Dialýza umožňuje v biochemii např. snadné oddělení soli od roztoku bílkovin, uplatňuje se při krystalizaci bílkovin. Dialýzou oddělujeme objemnější organické molekuly od rozpouštěných nízkomolekulárních anorganických solí. [45, 46]

Proces je pomalý a urychluje se kontinuálním nebo periodickým odvodem roztoku, do kterého látky rychle difundují. Vždy se snažíme, aby dialýza byla co nejrychlejší. Rychlost dialýzy závisí na koncentračním spádu (zpočátku je nejrychlejší, postupně se zpomaluje), který je především ovlivněn poměrem objemů vně a uvnitř membrány. Dále rychlost tohoto procesu závisí na teplotě, na počtu a velikosti pórů v membráně, na síle membrány, na elektrických vztazích mezi membránou a difundujícími částicemi a na velikosti plochy membrány. [45, 46]

2.5.3.3. Elektroforéza

Tato metoda je založená na migraci elektricky nabitých částic v elektrickém poli, ve stejnosměrném pohybu. Díky těmto podmínkám dochází k separaci látek. Elektrické pole je vytvořeno tak, že se mezi elektrody vloží stejnosměrné napětí, které je konstantní. Následně dochází k migraci elektricky nabitých částic – anionty migrují ke kladnému pólu, kationty naopak k zápornému. Ionty, které nejsou nabitě (jsou neutrální) nemigrují. Každá složka vzorku migruje jinou rychlostí, a tak během separace vznikají zóny, které přísluší daným složkám vzorku. [47, 48]

Jestliže použijeme standardy, jejichž molekulové hmotnosti známe, tak lze pomocí elektroforézy získat informaci o molekulové hmotnosti proteinu, který byl izolován. Ke stanovení molekulové hmotnosti je vhodné použít PAGE-SDS elektroforézu. [48]

2.5.3.4. PAGE-SDS

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu je elektroforéza, která probíhá buď v trubičkách, nebo na tenké vrstvě, v tomto případě mezi dvěma skleněnými deskami. Je to velmi praktická metoda, která se často využívá pro dělení makromolekul. Separace je závislá na velikosti molekul, protože velké molekuly jsou gelem více zachytávány, a tak se více zpouzdňují. Také závisí na elektroforetické pohyblivosti látek, které jsou elektroforézou děleny.

Polyakrylamidový gel je tedy jedním z nejčastěji používaným, protože má výhodné vlastnosti – je pevný, inertní a bezbarvý. [47, 48]

Tento gel vzniká tak, že dojde k polymeraci akrylamidu společně s N,N'-metylenbisakrylamidem). Při přípravě gelu se přidává TEMED, který stabilizuje volné radikály, které vznikají na začátku polymerace při rozkladu persíranu amonného. TEMED je zkratka pro N, N, N', N' - tetramethylendiamin. V závislosti na podílu akrylamidu v gelu jsou dány fyzikální vlastnosti a velikost pórů. Zásadní je, zda elektroforéza probíhá v kontinuálně nebo diskontinuálně – různě koncentrované gely, nebo gely o různém pH a iontové síle. Při diskontinuální elektroforéze se pro získání velmi ostrých zón využívají pufrů o různém pH a gely o různém složení. [46, 48]

Jelikož je proud konstantní, tudíž dochází k rovnoměrnému pohybu jednotlivých zón iontů. Ty jsou ostře ohraničeny. Jako indikátor pro pohyb čela se používá např. bromofenolová modř, která se přidá ke vzorku. Bromofenolová modř je nízkomolekulární barvivo. [46, 48] V přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS) dochází k dělení proteinů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu, a to podle jejich molekulové hmotnosti. Proteiny jsou obklopeny kladně nabitými molekulami SDS, které tak dávají proteinům opačný (záporný) náboj. Poté jsou jednotlivé molekuly separovány. Gel je obvykle složen z dělicího gelu a vrstveného gelu, ve kterém jsou proteiny zachycovány. [49]

3. CÍL PRÁCE

- Zpracování rešerše na téma extracelulární hydrolytické enzymy a jejich produkce plísněmi a bakteriemi, káva a vedlejší produkty, které vznikají při její výrobě
- Analýza produkce extracelulárních enzymů vybranými mikroorganismy.
- Optimalizace podmínek enzymatické reakce a kultivace, purifikace enzymů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Mikrobiální kmeny, chemikálie a přístrojové vybavení

4.1.1. Použité mikroorganismy

Plísně *Fusarium solani* CCM F-552, *Phanerochaete chrysosporium* CCM 8074 a *Aureobasidium pulluans* CCM F-148 i bakterie *Burkholderia cepacia* CCM 2656 byly zakoupeny z České sbírky mikroorganismů, Brno. Dále byl v práci použit doposud neidentifikovaný isolát plísně, která spontánně kontaminovala kávovou sedlinu.

4.1.2. Použité chemikálie

Albumine, bovin, AMRESCO (USA)
Azokasein, Serva (SRN)
Azo – galactomannan from carob, Sigma Aldrich (SRN)
Bakteriologický agar, HiMedia, Indie
Bromofenolová modř, Serva (SRN)
Cellulase from *Aspergillus niger*; Sigma Aldrich (SRN)
Cellulase from *Trichoderma reesei*; Sigma Aldrich (SRN)
Cellulase Ozonuka PS (*Trichoderma viridie*); Serva (SRN)
Citronan sodný p.a., Lachema (ČR)
Coomassie Brilliant Blue, Serva (SRN)
D- glukóza monohydrát, Lach-Ner (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lach-Ner (ČR)
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner
Dodecylsírán sodný (SDS), TCI CO (Japan)
Ethanol (96%) p.a., Merci (ČR)
Fosforečnan sodný dihydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Glycerin, Lachema (ČR)
Glycine, Sigma Aldrich (SRN)
Hemicellulase from *Aspergillus niger*; Sigma Aldrich (SRN)
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Lach-Ner
Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát p.a., Lachema (ČR)
Hydrogenuhličitan sodný p.a., Lachema (ČR)
Hydroxid sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Chlorid sodný p.a., Lachema (ČR)
Chlorid vápenatý p.a., Lachema (ČR)
Karboxymethylcelulosa, Sigma Aldrich (SRN)
Kongo červeň, Lachema (ČR)
Kyselina citronová p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina chlorovodíková (35%) p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina octová, Lach-Ner (ČR)
Kyselina sírová (96%) p.a., Lach-Ner (ČR)
Kyselina trichloroctová p.a., Lach-Ner (ČR)
Molybdenan amonný tetrahydrát p.a., Lachema (ČR)

Methanol, CH₃OH, Lach-Ner (ČR)
N, N, N', N'-tetramethylendiamin (TEMED), Sigma Aldrich (SRN)
p-nitrofenol, Sigma Aldrich (SRN)
p-nitrofenyl palmitate, Sigma Aldrich (SRN)
Pectinase from *Aspergillus niger*; Sigma Aldrich (SRN)
Persíran amonný (APS), Serva (SRN)
Síran amonný p.a., Lach-Ner (ČR)
Síran hořečnatý heptahydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Síran měďnatý pentahydrát p.a., Lach-Ner (ČR)
Síran sodný p.a., Lach-Ner (ČR)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Lach-Ner (ČR)
Triton X-100, Sigma Aldrich (SRN)
Uhlíčan sodný p.a., Lachema (ČR)
Vinan sodno-draselný p.a., Lachema (ČR)
3,5-dinitrosalicylová kyselina, Sigma Aldrich (SRN)

4.1.3. Přístroje a pomůcky

Očkovací box Aura Mini (Bioair Instruments, UK)
Třepačka UNIMAX 1010
Nanofotometr PEARL IMPLIN
Inkubátor, LTE SCIENTIFIC
Vortex Real Top, Heidolph
Centrifuga U-32-R, Boeco (Německo)
Centrifuga Sigma 1-14 (Německo)
Mikrocentrifuga Hemle Z-100
Analytické váhy Boeco (Německo)
Fluorescenční mikroskop pro biotechnologii, LABOMED
Filtlační zařízení pro biotechnologii KrosFlo, Spectrum laboratories
Analytické váhy, OHAUS
Sada pro elektroforézu MINI PROTEAN Tetra System, BIO-RAD
Elektroforetický zdroj SH-300X, E-C Apparatus Corporation
pH-metr SENSODIRECT PH 200
Systém pro dokumentaci gelů PC, ULTRALUM

4.2. Použité odpadní substráty

Kávová sedlina

4.3. Kultivace

Kultivace plísně *Fusarium solani*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Aureobasidium pulluans*, bakterie *Burkholderia cepacia* a *Isolátu*. Tyto mikroorganismy byly kultivovány na tuhém a tekutém médiu.

4.3.1. Tuhé kultivační médium

Tabulka 3: Složení pevného média *Fusarium solani*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Aureobasidium pulluans*, *Burkholderia cepacia* a *Isolátu*

složky	množství
Bakteriologický agar	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄	11,1 g
MgSO ₄	0,2 g
kávová sedlina	20 g
voda	1000 ml

Toto médium bylo použito na uchování plísní *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Aureobasidium pulluans*, *Isolát* a bakterie *Burkholderia cepacia*. Kultury byly sterilovány po dobu 40 minut v tlakovém hrnci a následně byly uchovávány při 4°C na Petriho miskách.

4.3.2. Tekuté kultivační médium

Tabulka 4: Složení minerálního média vybraných plísní a bakterie

složky	množství
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄	11,1 g
MgSO ₄	0,2 g
kávová sedlina	20 g
voda	1000 ml

Kultury jednotlivých plísní - *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Aureobasidium pulluans*, *Isolát* a bakterie *Burkholderia cepacia* byly zočkovány z Petriho misky do 100 ml sterilního média ve 200 ml Erlenmeyerově baňce. Sterilní médium bylo pasterováno v autoklávu po dobu 40 minut. Následná kultivace probíhala při teplotě 30 °C, a to bez třepání – staticky.

4.4. Postupy při stanovení enzymových aktivit

4.4.1. Stanovení proteolytické aktivity

Jako substrát byl použit roztok azokaseinu (5 mg/ml). Azokasein je chemicky modifikovaný mléčný protein kasein s navázanou oranžovou sulfanilamidovou skupinou. Enzymatickou hydrolýzou (37°C, 60 min) se uvolňují barevné peptidy rozpustné v trichloroctové kyselině, které jsou následně detekovány při $\lambda = 440$ nm. Rozdíl mezi absorbancí blanku a supernatantu je následně přepočten na enzymovou aktivitu proteolytických enzymů. Jednotka aktivity je pak definována jako množství enzymu katalyzující přeměnu substrátu doprovázenou nárůstem absorbance o 0,001 za 1 minutu při podmínkách testu.

4.4.2. Stanovení lipolytické aktivity

Stanovení lipolytické aktivity s využitím p-nitrofenylpalmitátu je založeno na schopnosti lipolytických enzymů štěpit tento substrát za vzniku žlutě zbarveného produktu p-nitrofenolu, který je stanoven spektrofotometricky při 410 nm.

4.4.2.1. Stanovení kalibrační křivky p-nitrofenolu

Kalibrační křivka byla neměřena a následně sestrojena pomocí základního roztoku p-nitrofenolu, jehož koncentrace byla 0,5 mmol/l. Z roztoku p-nitrofenolu byla následně připravena kalibrační řada p-nitrofenolu, a to naředěním základního roztoku pomocí 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 8,2. Koncentrace roztoků kalibrační řady byly v rozmezí od 0,005 do 0,05 mmol/l. Takto připravené roztoky byly dobře promíchány a jejich absorbance byla proměřena na spektrofotometru při $\lambda = 410$ nm.

4.4.2.2. Příprava substrátu

Do odměrné baňky bylo odváženo 0,00695 g p-nitrofenylpalmitátu a následně doplněn destilovanou vodou na 100 ml. Tento roztok byl poté uchován při teplotě 4 °C.

4.4.2.3. Stanovení lipolytické aktivity

Do zkumavek bylo napipetováno 0,1 ml supernatantu, 2,5 ml substrátu a 2,5 ml pufru pH 8. Vzorky byly po dobu 30 minut inkubovány při laboratorní teplotě. Blank byl připraven stejným způsobem jako vzorky, ale nebyl inkubován. Následně byla proměřena absorbance roztoků vzorků proti roztoku blanku a to při vlnové délce 410 nm.

4.4.3. Stanovení celulázové aktivity – stanovení pomocí karboxymethyl celulózy

Aktivita celuláz byla stanovena spektrofotometricky měřením přírůstků redukujících skupin metodou podle Somogyiho a Nelsona, jako substrát byl použit 1 % roztok CMC.

Vzorky byly připraveny tak, že 0,5 ml 1 % CMC bylo smícháno s 4 ml citrátového pufru pH 5 a s 0,5 ml supernatantu. Následně byly vzorky inkubovány při teplotě 30 °C po dobu 60 minut.

Poté bylo k 1 ml takto připraveného vzorku přidáno 0,5 ml roztoku I a 0,5 ml roztoku II. Zkumavky s těmito roztoky byly ponořeny na dobu 10 minut do vroucí lázně. Po uplynutí 10 minut byly zkumavky ochlazeny a bylo do nich přidáno 0,5 ml roztoku III a každý roztok byl dobře promíchán tak, aby se rozpustila sraženina. Nakonec byl obsah zkumavky doplněn destilovanou vodou na 10 ml (7,5 ml vody). Absorbance byla proměřena při vlnové délce 720 nm proti blanku, jehož příprava byla stejná jako příprava ostatních vzorků, ale 0,5 ml 1 % roztoku CMC bylo nahrazeno 0,5 ml citrátovým pufrem pH 5. Jednotka aktivity pak byla definována jako množství enzymu, který katalyzuje rozklad CMC (substrát) doprovázený nárůstem absorbance v čase.

4.4.3.1. Příprava činidel

Činidlo I: 24 g uhličitanu sodného, 16 g hydrogenuhličitanu sodného a 12 g vinanu sodno-draselného bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody. Tento roztok byl následně smíchán se 600 ml roztoku síranu sodného, který byl připraven tak, že v 600 ml vody bylo rozpuštěno 144 g síranu sodného.

Činidlo II: Ve 200 ml destilované vody bylo rozpuštěno 24 g síranu sodného a 4 g pentahydrátu síranu měďnatého.

Činidlo III: toto činidlo bylo připraveno tak, že ve 450 ml vody bylo rozpuštěno 25 g molybdenanu amonného a následně byla přidána koncentrovaná kyselina sírová o objemu 21 ml a 3 g heptahydrátu hydrogenarseničnanu sodného. Tento roztok byl uchován po dobu 48 hodin při 37 °C.

4.4.3.2. Sestrojení kalibrační křivky

Pro sestrojení kalibrační křivky pro změření celulózové aktivity byl využit základní roztok glukózy, jehož koncentrace byla 3 g/l. Následně byla z tohoto roztoku naředěním připravena kalibrační řada o koncentraci od 0,3 g/l do 1,5 g/l. Z každého roztoku byl odebrán 1 ml a k němu bylo přidáno 0,5 ml Somogyiho činidla I a II. Zkumavky s těmito roztoky byly na 10 minut ponořeny do vroucí lázně, následně ochlazeny a bylo do nich přidáno 0,5 ml činidla III. Blah ve zkumavkách byl dobře promíchán, a to až do rozpuštění vzniklého Cu_2O . Destilovanou vodou (7,5 ml) byl obsah zkumavky doplněn na 10 ml. Roztoky byly dobře promíchány a poté byla při 720 nm proměřena jejich absorbance proti blanku. Blank byl připraven tak, že do roztoku byl místo 1 ml roztoku glukózy přidán 1 ml destilované vody.

4.4.4. Stanovení mannázové aktivity

Aktivita mannáz byla stanovena spektrofotometricky měřením přírůstku redukujících skupin. Využívá se schopnosti štěpit galaktomanan na mannózu a redukující cukry. Vzorky byly připraveny z 0,5 ml supernatantu a 0,5 ml galaktomannanu. Tyto roztoky byly následně inkubovány při 30°C po dobu 10 minut. Následně byl ke každému roztoku přidáno 2,5 ml ethanolu a takto připravené roztoky byly po promíchání 10 minut ponechány při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly centrifugovány při 3000 otáčkách po dobu 10 minut. Absorbance byla proměřena při vlnové délce 590 nm proti blanku. Blank byl tak, že bylo nejdříve smícháno 2,5 ml ethanolu s 0,5 ml galaktomannanu a až po 10 minutové inkubaci při 30 °C bylo do roztoku přidáno 0,5 ml supernatantu. Jednotka aktivity pak byla definována jako množství enzymu, který katalyzuje rozklad galaktomannanu (substrát) doprovázený nárůstem absorbance.

4.4.4.1. Příprava substrátu

1 g přípravku práškového enzymu azo-carob galaktomannan byl přidán do 100 ml 0,2 M pufru octanu sodného (pH 4) a poté byl tento roztok opatrně 15 minut míchán. Jen pokud je to nutné, je třeba tento roztok zfiltrovat a dále zředit 0,2 M puftrem octanu sodného (pH 4), podle potřeby pro dosažení správné koncentrace.

4.5. Výběr vhodného mikrobiálního kmene

Dle testů enzymových aktivit byly zjištěny celulózové, mannázové, lipázové a proteázové aktivity pro zvolené kmeny. K těmto testům byly použity minerální média, na nichž byly kultivovány plísně *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Aureobasidium pulluans*, *Isolat* a bakterie *Burkholderia cepacia* (viz tekuté kultivační médium).

4.5.1. Optimalizace kultivačních podmínek

Byly optimalizovány kultivační podmínky pro plíseň *Isolat*, což byl dle stanovených enzymových aktivit nejvhodnější mikroorganismus.

Byl sledován růst biomasy a enzymová aktivita v závislosti na pH, použití různého množství vody, na způsobu kultivace – statická nebo na třepačce a také časová závislost kultivace (optimální počet dní kultivace plísně).

4.5.1.1. Množství vody a způsob kultivace

V tomto měření bylo stanoveno optimální množství vody, ve které je plíseň *Isolat* kultivována. Kultivace probíhala ve třech zvolených množstvích minerálního média, a to 40, 60 a 100 ml. Toto minerální médium bylo připraveno stejně jako v kapitole 4.3.2. Jako další kritérium pro optimální kultivaci vybrané plísně bylo třeba zjistit, zda je vhodnější kultivace statická nebo kultivace, která probíhala při třepání.

Byly připraveny 2 sady roztoků, které obsahovaly 40, 60 a 100 ml vody. První byla kultivována staticky a druhá na třepačce. Kultivace probíhala při 30 °C. Pro obě dvě sady roztoků byly proměřeny enzymové aktivity.

4.5.1.2. pH optimum

V tomto měření bylo stanoveno optimální pH pro kultivaci plísně *Isolat*. Zvolené hodnoty pH byly: 4,0; 4,8, 5,4; 5,8; 6,6; 7,0; 7,6; 8,0.

Aktivita celuláz byla stanovena spektrofotometricky měřením přírůstku redukujících skupin metodou podle Somogyiho a Nelsona, jako substrát byl použit 1 % roztok CMC. Vzorky pro měření této aktivity byly připraveny smícháním 0,5 ml 1 % roztoku karboxymethyl celulázy s 0,5 ml supernatantu, kterým byl v tomto případě roztok, který měl ve stanovení optimálního množství vody a optimálním způsobu kultivace nejvyšší aktivity, a to roztok se 100 ml vody a byl kultivován staticky. Následně byly ke vzorkům přidány 4 ml citrátového pufru. Pufry byly připraveny dle zvolené hodnoty pH, a to smícháním kyseliny citronové s Na_2HPO_4 v různých poměrech.

Inkubace těchto vzorků probíhala při 30 °C po dobu 60 minut. Po uplynutí této doby byl z každého vzorku odebrán 1 ml a k němu přidáno 0,5 ml roztoku I a 0,5 ml roztoku II. Po desetiminutovém povaření ve vroucí lázni byly zkumavky se vzorky ochlazeny a d každého z nich bylo napipetováno 0,5 ml roztoku III. Nakonec byly vzorky promíchány a každý byl doplněn destilovanou vodou na 10 ml.

Absorbance byla proměřena při vlnové délce 720 nm proti blanku, jehož příprava byla stejná jako příprava ostatních vzorků, ale 0,5 ml 1 % roztoku CMC bylo nahrazeno 0,5 ml citrátovým pufrem. Jednotka aktivity pak byla definována jako množství enzymu, který katalyzuje rozklad CMC (substrát) doprovázený nárůstem absorbance v čase.

4.5.1.3. Počet dní kultivace

Pro zjištění časové závislosti produkce enzymů izolovanou plísní bylo připraveno minerální médium, a to stejným způsobem jako v kapitole 4.3.2. Po jeho sterilizaci byla do roztoku minerálního média očkována vybraná plíseň a následně byla kultivována v termostatu při 30 °C. Enzymová aktivita byla sledována v 1., 3., 5., 7. a 9. dni kultivace.

4.6. Izolace a purifikace enzymů

4.6.1. Vertikální PAGE SDS elektroforéza

K této elektroforetické separaci proteinů byla použita aparatura Mini-PROTEAN 3 cell. Jako nosič byl použit polyakrylamidový gel a k následné detekci enzymů byl využito barvení pomocí Coomassie brilliant blue. Jako standardy byly použity směsi: *Bio-Rad Dual color standard* (obsahuje deset rekombinačních proteinů o přesně známé molekulové hmotnosti od 10 do 250 kDa, včetně osmi modrých pásem daných skupin a dvou růžových – referenční pásma).

4.6.1.1. Roztoky

Elektrodový pufr: 3,03 g Tris + 14,4 g glycin + 1,0 g SDS do 1000 ml redestilované vody

Iniciační činidlo: 100 mg APS (persíran amonný) do 1 ml redestilované vody

Separáčn (dělící) pufr pH 8,8: 18,2 g Tris + 2,8 ml 32% HCl do 100 ml redestilované vody

Zaostřovací pufr: 6,0 g Tris + 6 M HCl + 60 ml redestilovaná voda

Vzorkovací pufr: 3,0 ml glycerol + 0,2 ml 0,5 % bromofenolová modř + 1,25 ml zaostřovací pufr pH 6,8 (0,5 M Tris) + 5,55 ml redestilovaná voda – doplnění na objem 10 ml

Zásobní roztok: AA/BIS

4.6.1.2. Příprava polyakrylamidového gelu

Pro elektroforézu vzorků enzymů byl použit 12 % polyakrylamidový gel. Ten byl připraven tak, že bylo napipetováno 2,5 ml separačního (dělícího) pufru o pH 8,8; 4,0 ml akrylamidu; 3,4 ml redestilované vody a 0,1 ml 10% SDS. Jako iniciační činidlo bylo přidáno 6 μ l TEMED a 60 μ l APS. Tato směs byla opatrně zamíchána v kádince, tak aby se do ní nedostaly bublinky vzduchu a následně byla pipetována do prostoru mezi dvě skla ve stojanu na elektroforézu. Po napipetování byl mezi tato skla vložen platový hřebínek, jehož pomocí byly vytvořeny jamky pro nanášení vzorků. Gel byl poté dvě hodiny nechán polymerovat.

4.6.1.3. Příprava vzorků

Vzorky enzymů, které byly připraveny kultivací na kávové sedlině, byly smíchány se vzorkovacím pufrem, a to v poměru 1:1 a následně byly po dobu 4 minut vloženy do vroucí vody.

Vzorky komerčních enzymů (*Hemicellulase from Aspergillus niger*; *Albumin, bovin*; *Cellulase from Trichoderma reesei*; *Cellulase Onozuka PS*; *Cellulase from Aspergillus niger*; *Pectinase from Aspergillus niger*) byly smíchány se vzorkovacím pufrem a připraveny stejně jako vzorky připravené na kávové sedlině. Tyto vzorky byly následně uchovány pro další použití při -15 °C.

4.6.1.4. Provedení elektroforézy

Poté, co gel mezi skly zpolymeroval a ztuhnul, z něj byl vyjmut plastový hřebínek. Skla, ve kterých byl gel, byla přenesena do aparatury a upevněna tak, aby elektrodový pufr, který byl v elektrodovém prostoru, nevytékal. Poté byl do aparatury nalit elektrodový pufr a vzorky enzymů byly nanášeny do jamek, a to v množství 10 - 15 μ l. Poté byla aparatura přikryta víkem a připojena ke zdroji napětí. Byl nastaven proud 300 mA, napětí 180 V po dobu 2 hodin.

4.6.1.5. Barvení gelu

Odbarvovací roztok: 500 ml ethanol + 100 ml kyselina octová + 400 ml redestilovaná voda

Barvicí roztok: 200 ml odbarvovací roztok + 0,5 g Coomassie brilliant blue.

Poté, co byla elektroforéza ukončena, byl gel opatrně pomocí stříčky s destilovanou vodou přenesen do misky, ve které byl barvicí roztok. Gel byl poté ponechán v barvicím roztoku minimálně po dobu 5 hodin. Miska s gelem byla přemístěna na třepačku, kde byl gel během barvení protřepáván. Po barvení byl gel promýván odbarvovacím roztokem, a to minimálně 6krát po dobu 30 minut. Na konci procesu barvení a odbarvování byl gel opatrně, tak aby se nepřetrhl, přenesen mezi dvě fólie a naskenován. Pomocí standardů, jež měly známou molekulovou hmotnost, byly určeny velikosti fragmentů proteinů, které byly separovány.

4.6.2. Zymografie

Tento typ elektroforézy byl proveden stejným způsobem jako první typ elektroforézy. Byla použita aparatura Mini – PROTEAN 3 cell a 12 % polyakrylamidový gel, do kterého byl přidán roztok polysacharidů, a to 0,2 % karboxymethyl celulózy. Po provedení elektroforézy a promytí gelu v 2,5 % roztoku Triton X – 100 a v citrátovém pufru pH 4,5 byl gel barven 0,1 % roztokem Kongo červeně. Jako standard byla použita směs: *Bio-Rad Dual color standard*.

4.6.2.1. Roztoky

Elektrodotový pufr: 3,03 g Tris + 14,4 g glycin + 1,0 g SDS do 1000 ml redestilované vody

Iniciační činidlo: 100 mg APS (persíran amonný) do 1 ml redestilované vody

Separáčnický (dělicí) pufr pH 8,8: 18,2 g Tris + 2,8 ml 32% HCl do 100 ml redestilované vody

Zaostřovací pufr: 3,0 ml 0,5 M Tris pH 6,8 (příprava viz kap 4.6.1.1) + 47,0 ml redestilované vody

Vzorkovací pufr: 1,0 ml glycerol + 0,3 g SDS + 8,7 ml zaostřovací pufr pH 6,8 (30 mM Tris)

Zásobní roztok: AA/BIS

4.6.2.2. Příprava polyakrylamidového gelu

12 % polyakrylamidový gel: 1,0 ml 0,2 % CMC; 2,5 ml separáčnického (dělicího) pufru o pH 8,8; 4,0 ml AA/BIS; 2,4 ml redestilované vody; 0,1 ml 10% SDS; 6 µl TEMED a 60 µl APS (iniciační činidla). Postup přípravy gelu byl poté stejný jako v kapitole 4.6.1.2.

4.6.2.3. Příprava vzorků

Vzorky byly připraveny smícháním supernatantů připravených na kávové sedlině nebo roztoků enzymů (viz kap 4.6.1.3) se vzorkovacím pufrem v poměru 1 : 1. Poté byly po dobu 1 minuty povařeny ve vroucí vodě.

4.6.2.4. Provedení elektroforézy

Elektroforéza byla provedena za stejných podmínek jako v kapitole 4.6.1.4.

4.6.2.5. Barvení gelu

Po ukončení elektroforézy byl gel pomocí stříčky opatrně přenesen do misky, ve které byla redestilovaná voda. V té byl gel vymýván po dobu 30 minut a následně byl vymýván 60 minut v 2,5 % roztoku Triton X - 100. K dalšímu promytí byl použit citrátový pufr pH 4,5. Toto promývání trvalo 12 hodin a bylo provedeno při laboratorní teplotě. K barvení gelu byla

požita 0,1 % Kongo červeň, ve které byl gel ponechán na jednu hodinu a následně byl gel hodinu ponechán v roztoku 1 M NaCl. Nakonec byl gel opatrně přenesen mezi dvě fólie a naskenován. Pomocí standardu, který měl známou molekulovou hmotnost, byly určeny velikosti fragmentů proteinů, které byly separovány.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Výběr mikroorganismů na základě schopnosti růst na médiu s kávovou sedlinou

5.1.1. Kultivace na tuhém médiu

Nejdříve bylo pomocí kultivace na tuhém médiu, které obsahovalo kávovou sedlinu jako jediný uhlíkatý substrát, vybrány ty mikroorganismy, které se nejlépe rozrostly (viz Obrázek 18, Obrázek 19).



Obrázek 18: Kultivace MO - vlevo bakterie *Burkholderia cepacia*, vpravo izolát plísně



Obrázek 19: Kultivace MO - vlevo plíseň *Fusarium solani*, vpravo plíseň *Phanerochaete chrysosporium*

Z tohoto pozorování bylo zjištěno, že plísně *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, izolovaná plíseň a bakterie *Burkholderia cepacia* se na médiu s kávovou sedlinou rozrůstají dobře. Naopak plíseň *Aureobasidium pulluans* se na tomto médiu vůbec nerozrostla, a tak nebyla pro další měření použita.

5.1.2. Kultivace na tekutém médiu

Kultivací jednotlivých mikrobiálních kmenů v tekutém médiu, které obsahovalo kávovou sedlinu jako jediný substrát, byla zjištěna stejně jako v předchozí kapitole schopnost těchto mikroorganismů růst na médiu s kávovou sedlinou.

Následně bylo pomocí mikroskopu, na kterém bylo nastaveno 40x přiblížení, pozorováno, jak se jednotlivé kmeny rozrostly (Obrázek 20). V příloze 1 jsou obrázky Erlenmeyerových baněk, ve kterých probíhala tato kultivace.



Obrázek 20: Kultivace MO na tekutém médiu s kávovou sedlinou: Mikroskop 40x - vlevo *Fusarium solani*; uprostřed izolovaná plíseň; vpravo *Burkholderia cepacia*

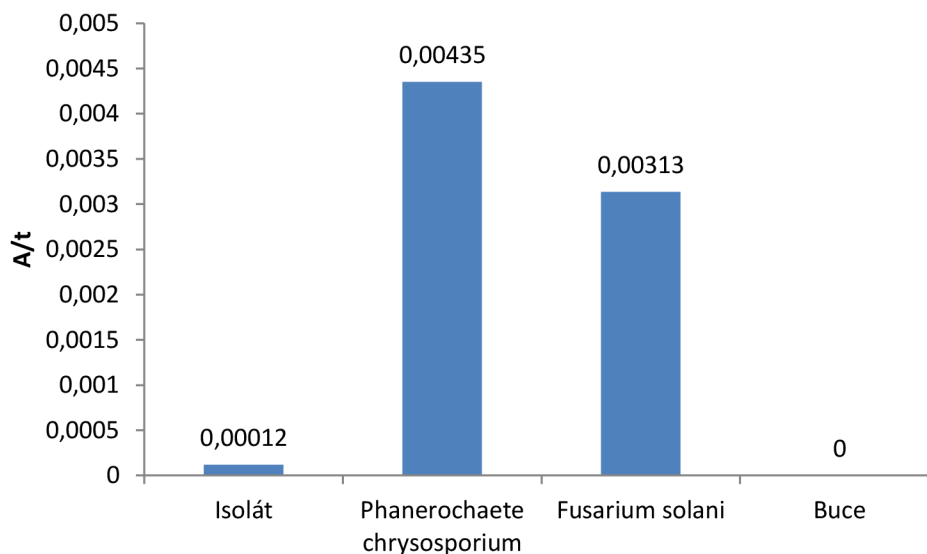
Ze snímků pořízených z mikroskopu lze vidět, že dobře se rozrostla plíseň *Fusarium solani* a izolovaná plíseň. Také bylo možné pozorovat kolonie bakterie *Burkholderia cepacia*. Plísně *Aureobasidium pulluans* a *Phanerochaete chrysosporium* se rozrostly málo, a tak nebylo možné na mikroskopu pořídit snímek jejich hyf.

5.2. Stanovení enzymových aktivit vybraných plísní a bakterií

Dle postupů, které byly uvedeny v kapitole 4.4, byly u plísní *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Isolát* a bakterie *Burkholderia cepacia* stanoveny enzymové aktivity. Produkce daných enzymů byla u těchto vybraných druhů plísní a bakterie sledována po 7 dnech kultivace.

5.2.1. Stanovení proteolytické aktivity

Jako substrát se při tomto stanovení využívá roztoku azokaseinu. Aktivita proteázy se vyjadřuje jako nárůst absorbance při rozkladu azokaseinu. Množství substrátu, jež byl rozložen působením enzymů, se vyjadřuje v podobě výsledné aktivity – absorbance, která je vztažena na čas inkubace. V grafu č. 1 jsou uvedeny závislosti aktivit proteáz na tom, jakou plísní byly produkovány v 7. dni kultivace.



Graf 1: Stanovení proteolytické aktivity pro vybrané mikrobiální kmeny

Při kultivaci *Phanerochaete chrysosporium* na minerálním médiu s kávovou sedlinou jako jediným substrátem byla naměřena nejvyšší proteázová aktivita.

Proteázová aktivita při kultivaci *Fusarium solani* na minerálním médiu se ukázala být druhou nejvyšší.

Při kultivaci izolované plísně byla aktivita proteáz spíše nízká a u bakterie *Bukholderia cepacia* nebyla detekována žádná proteázová aktivita.

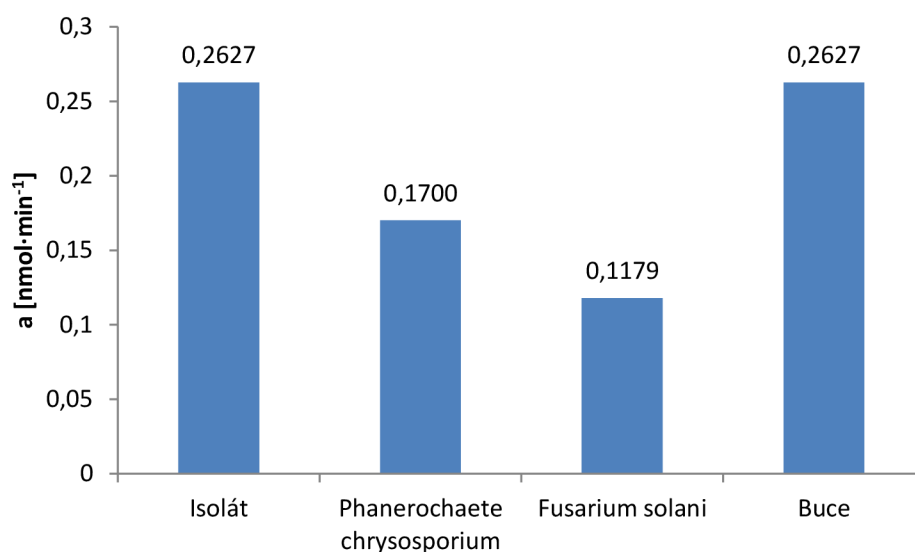
5.2.2. Stanovení celulózy aktivy

Pro stanovení této aktivity byla sestavena kalibrační křivka – závislost, dle které lze stanovit redukující cukry metodou Somogyi-Nelsona. K tomu, aby bylo možné odečíst množství glukózy v připraveném médiu od množství všech redukujících cukrů a následovně možné provést korekci na množství glukózy (uvolněné ze substrátu), byla tato kalibrační závislost stanovena na glukózu, data pro sestavení kalibrace stejně tak i kalibrační přímka samotná jsou obsahem přílohy 2.

5.2.2.1. Stanovení celulózy aktivy na CMC

V tomto měření byla aktivity celulózy stanovena množstvím redukujících cukrů – glukózy, která byla uvolněna ze substrátu připraveného z celulózy, působením enzymu. Aktivita byla vztahována na čas [nmol/min]. Pro stanovení této aktivity byl použit 1% roztok karboxymethyl celulózy.

V grafu č. 2 jsou uvedeny závislosti aktivit celulózy na tom, jakou plísní byly produkovány v 7. dni kultivace.



Graf 2: Stanovení celulózy aktivy pro vybrané mikrobiální kmeny

Při kultivaci na kávové sedlině byla nejvyšší hydrolytická aktivita vůči CMC detekována u izolované plísně a překvapivě také u bakterie *B. cepacia*.

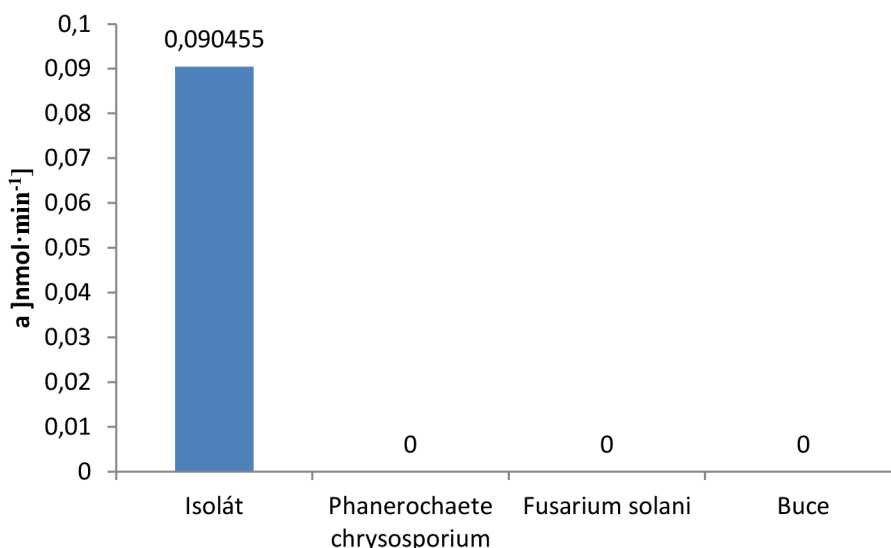
Produkce celulózy plísní *Phanerochaete chrysosporium* na kávové sedlině měla při tomto měření třetí nejvyšší hodnotu.

Nejmenší produkce celulózy byla zjištěna u plísně *Fusarium solani*.

5.2.3. Stanovení lipázové aktivity

Pro stanovení tohoto enzymu bylo potřeba stanovit kalibrační křivku. Závislost byla stanovena pro p-nitrofenol a je obsahem přílohy č. 3. Následně byla stanovena aktivita lipázy, a to jako množství p-nitrofenolu, které byl uvolněno ze substrátu působením enzymu. Toto množství bylo vztaženo na čas [nmol/min]. Substrátem pro toto stanovení byl p-nitrofenylpalmitát.

V grafu č. 3 je uvedena závislost aktivity lipázy na tom, jakou plísní byla produkována v 7. dni kultivace.



Graf 3: Lipázová aktivita pro vybrané mikrobiální kmeny

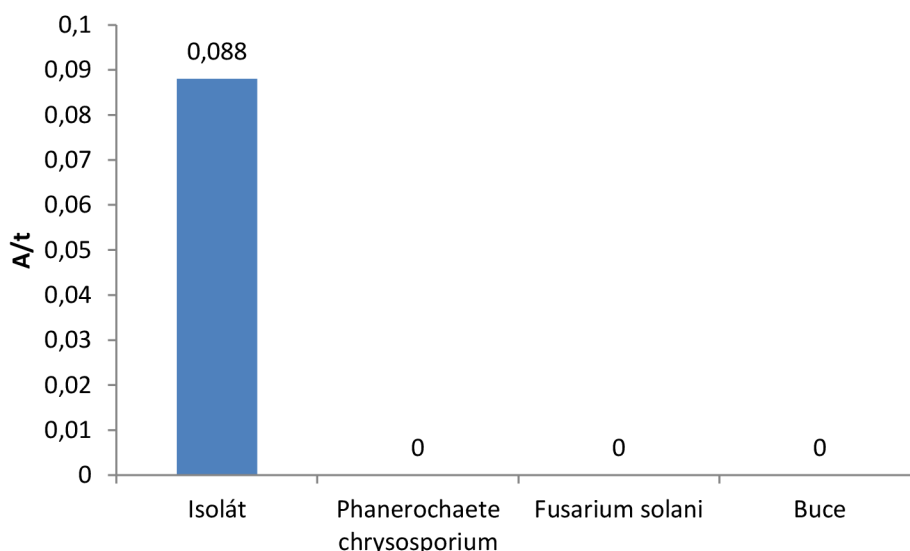
U izolované plísně kultivované na minerálním médiu za s kávovou sedlinou byla zjištěna nejvyšší lipázová aktivita.

Bakterie *Burkholderia cepacia*, plísně *Fusarium solani* a *Phanerochaete chrysosporium* nejevily žádnou lipolytickou aktivitu.

5.2.4. Stanovení aktivity mannázy

Aktivita mannázy byla vyjádřena jako nárůst absorbance při rozkladu substrátu. Substrát se štěpí a měří se krátké fragmenty, které se etanolem nesráží. Výsledná aktivita byla vyjádřena jako množství absorbance vztažená na čas.

V grafu č. 4 je uvedena závislost aktivity mannázy produkováne vybranými mikroorganismy.



Graf 4: Mannázová aktivita pro vybrané mikrobiální kmeny

Isolovaná plíseň na minerálním médiu produkovala největší množství mannázy.

V případě plísní *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani* a bakterie *Burkholderia cepacia* byly aktivity velmi nízké, dokonce nulové.

Tabulka 5: Výsledné enzymové aktivity pro vybrané mikroorganismy

mikroorganismus	proteáza A/t	celuláza a [nmol·min ⁻¹]	lipáza a [nmol·min ⁻¹]	mannáza A/t
isolovaná plíseň	0,000117	0,2627	0,090455	0,088
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	0,004350	0,1700	0	0
<i>Fusarium solani</i>	0,003133	0,1179	0	0
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	0,2627	0	0

Na základě stanovení jednotlivých aktivit byl z těchto mikroorganismů vybrán jeden, pro který byly v dalším měření stanoveny optimální podmínky kultivace. Tímto vybraným mikroorganismem byla izolovaná plíseň. Ta měla nejvyšší celulózu aktivitu a zároveň jako jedinájevila aktivitu všech stanovovaných enzymů.

5.3. Optimalizace podmínek

Z předešlých měření aktivit byla zjištěna vysoká aktivita enzymů, které produkovala izolovaná plíseň. V následujících analýzách byly optimalizovány podmínky její kultivace. Bylo vybráno ideální množství vody, které plíseň k produkci enzymů potřebuje. Dalším kritériem pro optimalizaci byl způsob kultivace, a to zda je statická nebo probíhala při třepání na třepače. Také bylo stanoveno pH optimum enzymatické reakce a ideální doba kultivace. Plíseň byla kultivována na minerálním médiu a následně u nich byla zjištěna enzymová aktivita pro proteázu, celulózu, lipázu a mannázu.

5.3.1. Optimalizace množství vody a způsobu kultivace

Pro izolovanou plíseň byly optimalizováno množství vody (resp. minerálního média), ve kterém je tato plíseň kultivována. Kultivace probíhala v Erlenmeyerových baňkách a do každé z nich bylo přidán 10 g kávové sedliny. Následně bylo přidáno zvolené množství

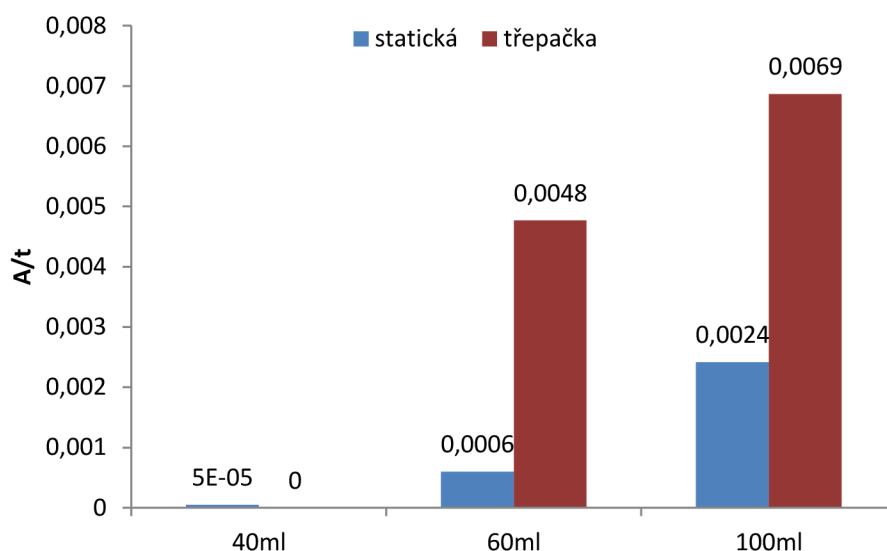
minerálního média, a to v rozmezí od 40 ml do 100 ml. Nakonec byla do tohoto média naočkována izolovaná plíseň. Takto připravené roztoky byly poté kultivovány při 30°C. První řada roztoků byla kultivována na třepačce a druhá staticky, tj. bez třepání v termostatu.

Po sedmidenní kultivaci byly roztoky zfiltrány za sníženého tlaku a následně u nich byly proměřeny enzymové aktivity. Stanovena byla proteolytická, celulázová, lipolytická a mannázová aktivita, a to stejnými způsoby jako v předchozích kapitolách.

5.3.1.1. Stanovení proteolytické aktivity

Substrátem je v tomto stanovení enzymové aktivity azokasein, jehož rozkladu se využívá ke stanovení aktivity proteázy. Aktivita proteázy se vyjadřuje jako nárůst absorbance při rozkladu azokaseinu.

V grafu č. 5 jsou uvedeny závislosti aktivit proteáz na tom, jaké množství vody bylo při kultivaci použito a zda byla kultivace statická nebo probíhala na třepačce.



Graf 5: Proteolytická aktivita - optimální množství vody a způsob kultivace

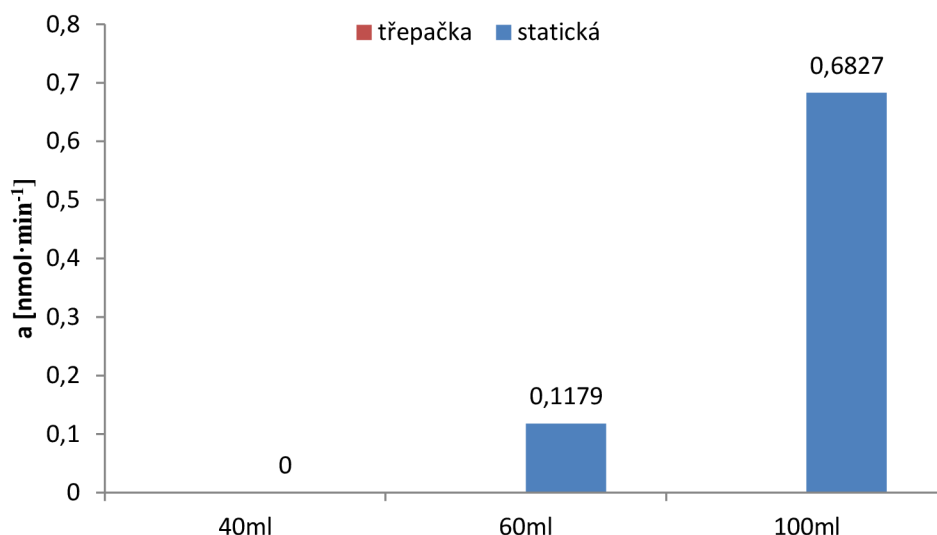
Z grafu lze pozorovat, že nejvyšší aktivitu měl roztok, který obsahoval nejvíce množství vody a jeho kultivace probíhala na třepačce při 30°C.

Při kultivaci, která probíhala staticky, byly aktivity proteáz mnohem nižší, přičemž nejvyšší aktivitu měl roztok s největším množstvím vody, stejně jako u druhého způsobu kultivace. Celkově z tohoto měření lze pozorovat, že největší proteázové aktivity měly vzorky, které obsahovaly 100 ml vody, což znamená, že čím větší množství kultivačního média je použito, tím vyšší hodnoty proteázových aktivit získáme. Také byl zjištěno, že izolovaná plíseň produkuje větší množství enzymů při kultivaci, která probíhá při třepání na třepačce.

5.3.1.2. Stanovení celulázové aktivity

Substrátem při stanovení této enzymové aktivity byl 1 % roztok karboxymethyl celulózy. Aktivita celulázy byla stanovena nárůstem množství redukujících cukrů a glukózy, které byly uvolněny při rozkladu celulázového substrátu. Aktivita byla vztažena na čas [nmol/min].

V grafu č. 6 jsou uvedeny závislosti aktivit celuláz na tom, jaké množství vody bylo při kultivaci izolované plísně použito a zda byla tato kultivace statická nebo probíhala na třepačce.



Graf 6: Celulázová aktivita - optimální množství vody a způsob kultivace

Celulázová aktivita produkovaná izolovanou plísní byla vypočítána pomocí rovnice kalibrační křivky, která je uvedena v příloze č. 2.

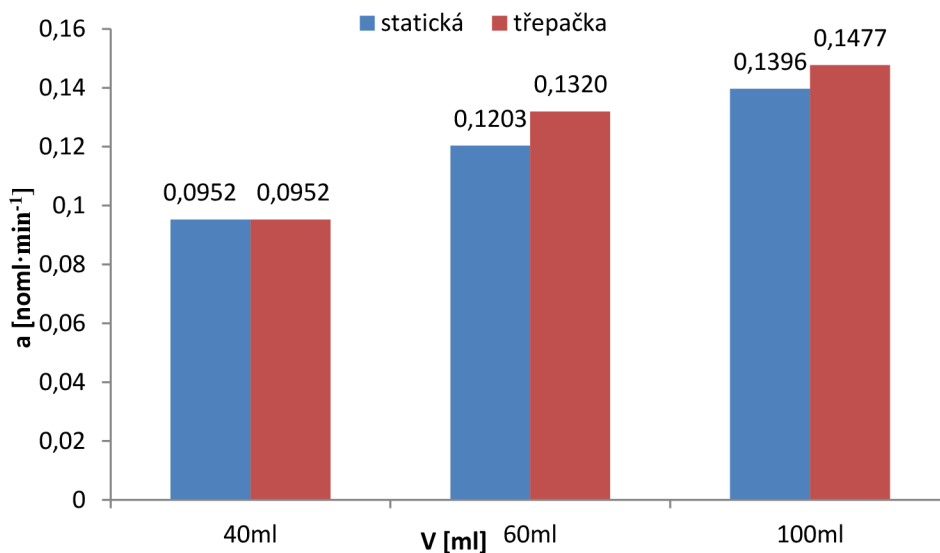
Ze sestrojeného grafu lze konstatovat, že izolovaná plíseň produkuje celulázy pouze při kultivaci, která je statická. Přičemž nejvyšší aktivitu jeví celulázy, když je v kultivačním médiu více vody. Nejvyšší aktivitu měl roztok, jež obsahoval 100 ml vody a jeho kultivace byla statická.

V případě, kdy kultivace vybrané plísně probíhala na třepačce, nebyla zjištěna žádná celulázová aktivita.

5.3.1.3. Stanovení lipolytické aktivity

V tomto měření byla stanovena aktivita lipázy, kterou produkovala izolovaná plíseň, aby byly vybrány optimální podmínky. Substrátem pro toto stanovení byl p-nitrofenylpalmitát. Aktivita byla stanovena jako množství p - nitrofenolu, které bylo uvolněno ze substrátu působením enzymu. Toto množství bylo vztaženo na čas [nmol/min].

V grafu č. 7 jsou uvedeny závislosti aktivit lipáz na tom, jaké množství vody bylo při kultivaci izolované plísně použito a zda kultivace probíhala na třepačce nebo staticky.



Graf 7: Lipázová aktivita - optimální množství vody a způsob kultivace

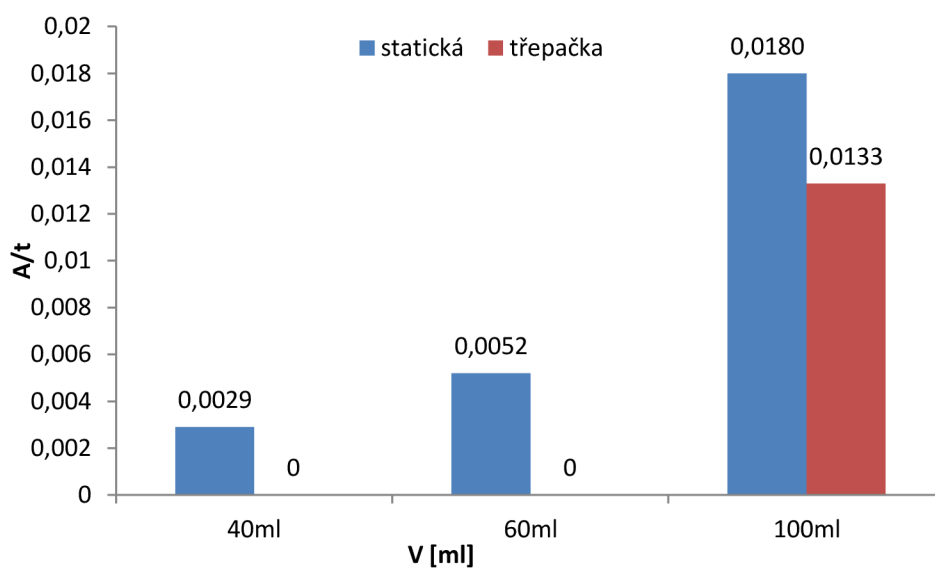
Lipázová aktivita produkovaná izolovanou plísní byla vypočítána pomocí rovnice kalibrační křivky, která je uvedena v příloze č. 3.

Isolovaná plíseň produkuje při kultivaci na třepačce největší množství lipolytických enzymů v případě, kdy je v kultivačním médiu velké množství vody. Také při statické kultivaci vykazuje tato plíseň největší produkci lipáz v roztoku, který obsahoval vody nejvíce.

5.3.1.4. Stanovení mannázové aktivity

Jako substrát byl v tomto stanovená aktivity použit galaktomannan.

V grafu č. 8 jsou uvedeny závislosti aktivit mannáz na tom, jaké množství vody bylo při kultivaci vybrané plísně použito a zda byla tato kultivace statická nebo probíhala na třepačce.



Graf 8: Mannázová aktivita - optimální množství vody a způsob kultivace

Produkce mannázy izolovanou plísní kultivované na kávové sedlině byla nejvyšší u kultivace s největším použitým množstvím vody. To platí jak v případě statické kultivace i kultivace, která probíhala na třepačce.

Z grafu lze pozorovat, že při kultivaci na třepačce byly u nižších množství použité vody aktivity nulové, ale až u 100 ml vody vykazovaly mannázové enzymy aktivitu. Větší aktivitu ale měly roztoky, u kterých probíhala statická kultivace při 30°C.

Nejvyšší produkci mannáz měla izolovaná plíseň při kultivaci statické za použití 100 ml vody.

5.3.2. Optimalizace podmínek – pH optimum enzymatické reakce

V předchozí kapitole bylo stanoveno optimální množství vody a způsob kultivace izolované plísně. Ve většině měření aktivit bylo zjištěno, že největší enzymovou aktivitu měl roztok, který obsahoval 100 ml vody a byl kultivován staticky. Proto bylo pH optimum enzymu stanoveno právě pro tento vzorek.

Optimální pH enzymu produkované vybranou plísní bylo zjištěno stanovením celulózy aktivitu. Ta byla stanovena metodou podle Somogyiho a Nelsona, spektrofotometricky měřením přírůstků redukujících skupin. Substrátem při stanovení této enzymové aktivity byl 1% roztok CMC. Jelikož je známo, že plísně mají nejvyšší produkci enzymů při pH 6-7, tak v následujícím měřeno bylo vybráno pro měření pH v rozmezí od 4,0 do 8,0.

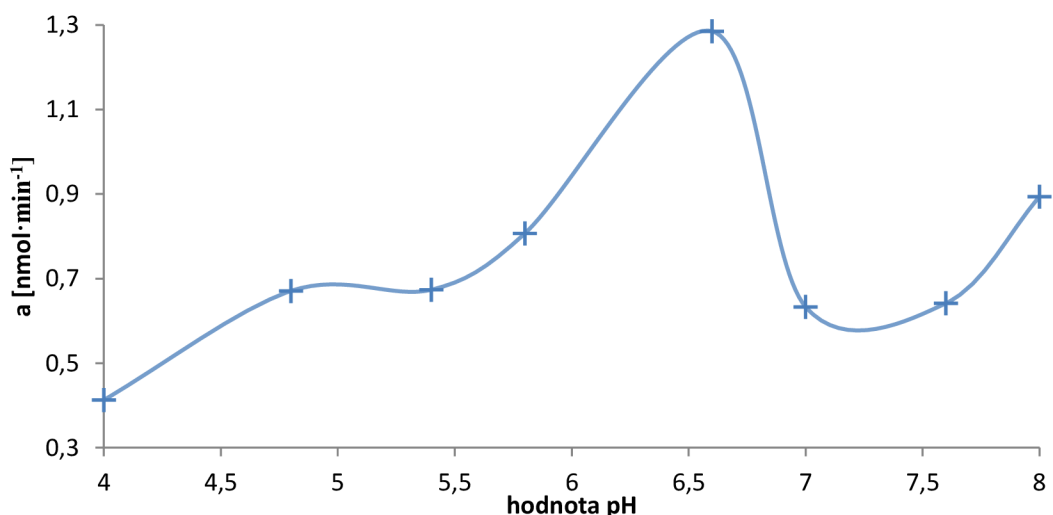
5.3.2.1. Stanovení celulózy aktivity

Substrátem při stanovení této enzymové aktivity byl 1 % roztok CMC. Aktivita celulózy byla stanovena nárůstem množství redukujících cukrů a glukózy, které byly uvolněny při rozkladu celulózy substrátu. Aktivita byla vztažena na čas [nmol/min].

Tabulka 6: Stanovení pH optima – příprava citrátového pufru

vzorek číslo	pH	V _{CH₃COOH} [ml]	V _{Na₂HPO₄} [ml]	skutečné pH
1	4,0	2,60	1,40	3,88
2	4,8	2,00	2,00	4,73
3	5,4	1,75	2,25	5,30
4	5,8	1,60	2,40	5,67
5	6,6	1,10	2,90	6,50
6	7,0	0,70	3,30	6,92
7	7,6	0,25	3,75	7,54
8	8,0	0,10	3,90	7,95

V grafu č. 9 jsou uvedeny závislosti aktivit celulózy na pH citrátového pufru, ze kterého byly vzorky supernatantů izolované plísně připraveny.



Graf 9: Stanovení pH optima

Dle grafu, který byl pro tuto enzymovou aktivitu sestaven, lze soudit, že v kyselé oblasti pH je celulózová aktivita nízká. Se zvyšujícím se pH se ale zvyšuje i aktivita celulózy. Nejvyšší produkci celulózy má izolovaná plíseň asi při pH 6,6. Po změření přesné hodnoty pH přidávaného pufru pomocí pH metru bylo zjištěno, že daný pufr měl pH 6,46. V alkalické oblasti byly hodnoty celulózové aktivity nízké stejně jako u oblasti kyselé.

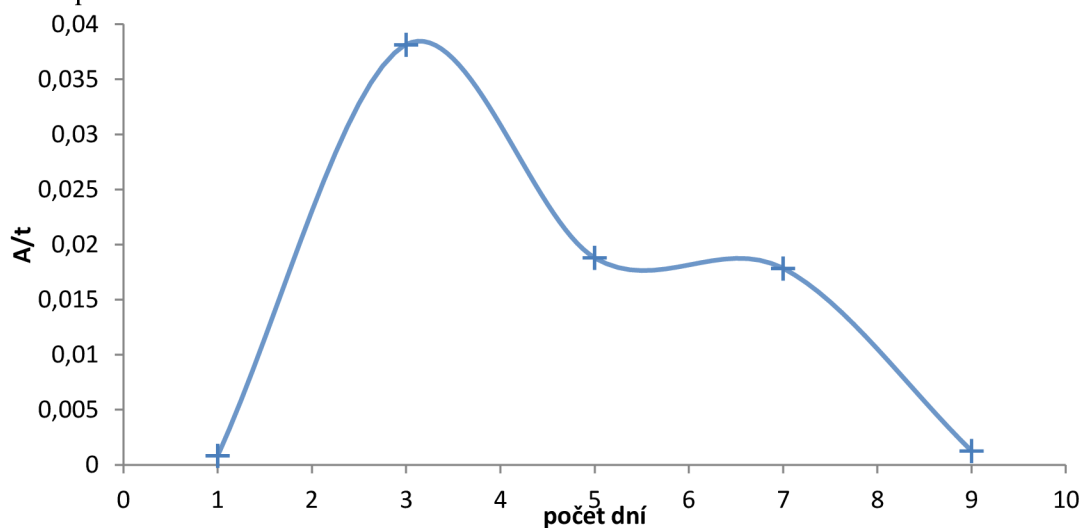
5.3.3. Optimalizace podmínek – počet dní kultivace

V předchozích kapitolách bylo stanoveno optimální množství vody, způsob kultivace izolované plísně a také pH optimum enzymatické reakce.

Dalším cílem práce bylo stanovit vliv doby kultivace na profil extracelulárních enzymů produkovaných při kultivaci na kávové sedlině. Jednotlivé enzymatické aktivity byly měřeny v pravidelných intervalech stejným způsobem jako v předchozích experimentech.

5.3.3.1. Stanovení proteolytické aktivity

V grafu č. 10 jsou uvedeny závislosti aktivit proteáz na počtu dní, během kterých byla izolovaná plíseň kultivována.

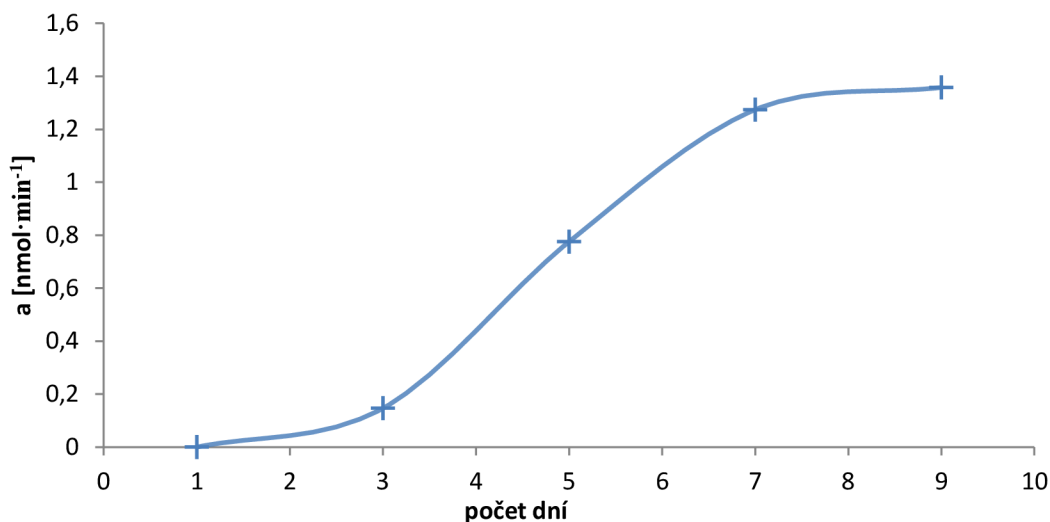


Graf 10: Proteolytická aktivita - počet dní kultivace

Z grafu sestrojeného pro produkci proteáz izolovanou plísní lze vyčíst, že největší produkci těchto enzymů měla plíseň ve 3. dni kultivace. Poté se aktivita proteáz snižovala. Nejvyšší hodnota proteolytické aktivity tedy byla vypočítána na $a = 0,0381$.

5.3.3.2. Stanovení celulózové aktivity

V grafu č. 11 je znázorněna závislost aktivity celuláz na počtu dní, během kterých byla izolovaná plíseň kultivována.



Graf 11: Celulózová aktivita - počet dní kultivace

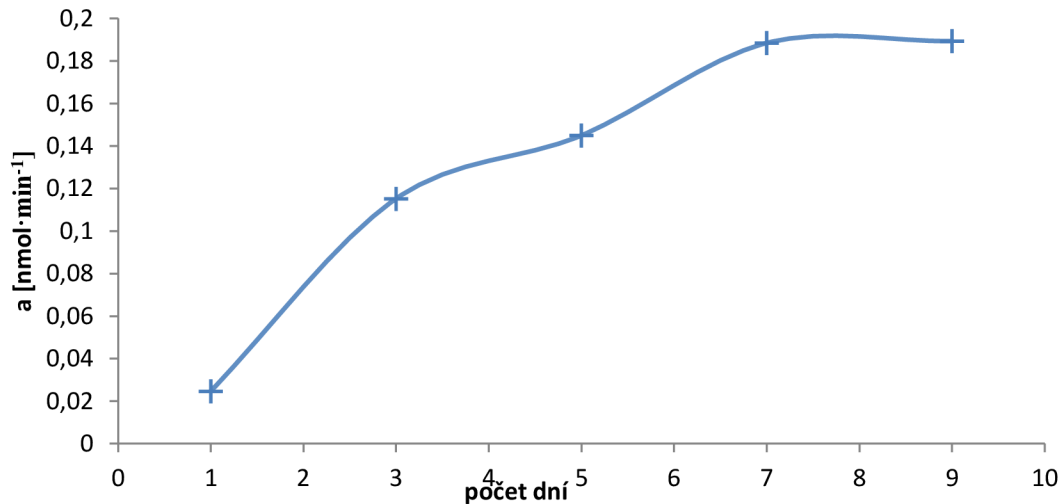
Při měření časové závislosti kultivace vybrané plísně bylo zjištěno, že se produkce celuláz s časem zvyšuje. To znamená, že čím déle je plíseň kultivována, tím vyšší je aktivita těchto enzymů.

Nejvyšší aktivitu měl vzorek, který byl kultivován po dobu 9 dní, a to $a = 1,3576 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$.

5.3.3.3. Stanovení lipolytické aktivity

V tomto měření byla sledována produkce lipáz plísní *Isolat* během 9 dní. Substrátem pro toto stanovení byl p-nitrofenylpalmitát. Aktivita byla stanovena jako množství p-nitrofenolu, které bylo uvolněno ze substrátu působením enzymu. Toto množství bylo vztaženo na čas [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$].

V grafu č. 12 je zobrazena závislost aktivit lipázy na počtu dní, během kterých byla izolovaná plíseň kultivována.

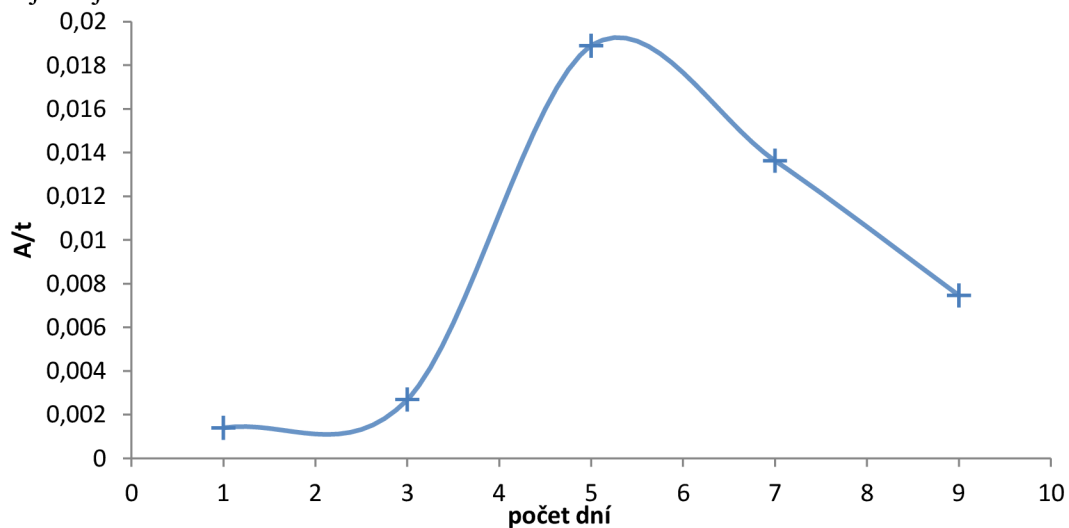


Graf 12: Lipolytická aktivita - počet dní kultivace

Z grafu časové závislosti kultivace izolované plísně lze vyčíst, že se produkce lipáz s časem zvyšuje. Čím delší je její kultivace v termostatu při 30 °C, tím vyšší je lipolytická aktivita. Nejvyšší aktivitu lipáz měl roztok, který byl kultivován po dobu 9 dní, a to $a = 0,1894 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$. Roztok, který byl kultivován 7 dní, měl enzymovou aktivitu jen nepatrně nižší $a = 0,1885 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$.

5.3.3.4. Stanovení mannázové aktivity

V grafu č. 13 je uveden průběh aktivity mannáz během kultivace izolované plísně na kávové sedlině jako jediném substrátu.



Graf 13: Mannázová aktivita - počet dní kultivace

V tomto měření závislosti mannázové aktivity na počtu dní kultivace plísně *Isolat*, bylo zjištěno, že se daná aktivita s časem zvyšuje až do 5. dne kultivace. Po 5. dni už ale aktivita mannáz klesá. V prvním a třetím dnu byla produkce mannáz velmi nízká, oproti tomu v sedmém dni měla plíseň ještě relativně vysokou mannázovou aktivitu. Hodnota, která byla zjištěna jako maximální je $A/t = 0,0189$.

5.4. Purifikace a identifikace enzymů

5.4.1. Ultrafiltrace

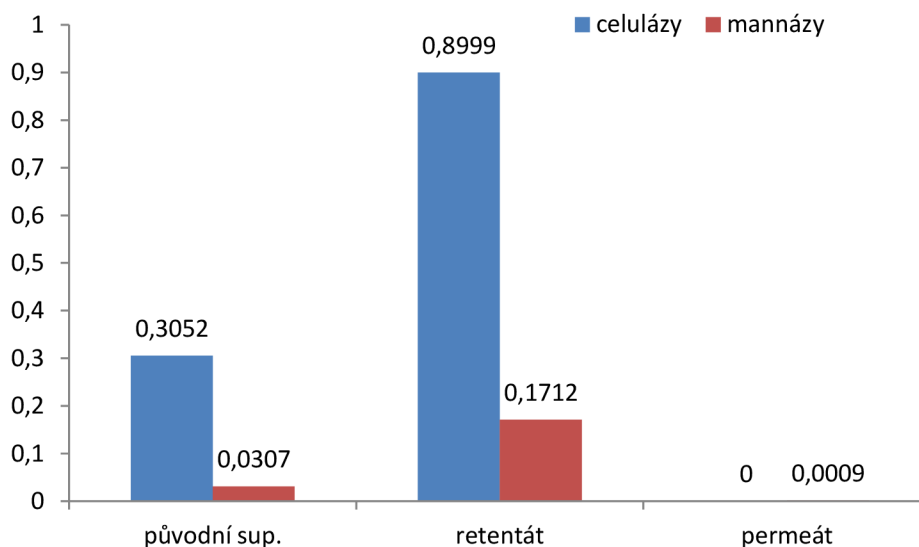
Cílem dalších experimentů bylo ověřit různé techniky pro zkoncentrování a částečnou purifikaci extracelulárních hydrolytických enzymových koktejlů, které produkovala vybraná plíseň při kultivaci na kávové sedlině. První testovanou technikou byla ultrafiltrace za pomoci ultrafiltračního zařízení KrosFlo. Toto zařízení umožňuje ultrafiltraci relativně velkých objemů kapalin a dobrou kontrolu procesu ultrafiltrace. V našem případě bylo ke zkoncentrování vzorků použita ultrafiltrační kolona na bázi technologie hollow-fibre o hodnotě cut-off 30 kDa.

Při ultrafiltraci bylo použito 200 ml vzorku. Tento roztok byl zkoncentrován na 50 ml, což znamená, že byl 4 x koncentrovanější než původní roztok. Tak bylo získáno 50 ml retentátu a 150 ml permeátu. Následně byl vzorek retentátu doplněn destilovanou vodou a ještě jednou ultrafiltrován, a tak byl získán další vzorek, který byl 8 krát koncentrovanější než původní roztok. Ten byl ale použit pouze pro PAGE-SDS elektroforézu.

Pro roztoky, které byly získány ultrafiltrací včetně původního supernatantu vybrané plísně, byla stanovena celulázová a mannázová aktivita.

5.4.1.1. Stanovení enzymových aktivit

Pro vzorky získané ultrafiltrací, bylo provedeno stanovení mannázové a celulázové aktivity. Jejich výsledky jsou uvedeny v grafu č. 14.



Graf 14: Celulázová a mannázová aktivita - původní supernatant, permeát, retentát

Ultrafiltrace s použitím membránového filtru o hodnotě cut-off 30 kDa se ukázala být vhodnou technikou pro zkoncentrování vzorku extracelulárních enzymů produkovaných námi testovanou plísní. V obou případech byly enzymy zadržovány v retentátu, v permeátu byla jejich aktivita nulová nebo zanedbatelná. Nárůst aktivity enzymů v retentátu dosáhl u celuláz 3 násobku a u mannáz pak přibližně 6 násobku původní hodnoty. Vzhledem k tomu, že faktor zkoncentrování vzorku byl 4, je možné konstatovat, že u celuláz došlo během ultrafiltrace ke ztrátě cca 25% aktivity. Naopak u mannáz došlo k výraznému navýšení aktivity o cca 50% nad teoretický maximální výtěžek. Je možné, že v průběhu ultrafiltrace a následné

ultradialýzy došlo k odstranění některých nízkomolekulárních látek (polyfenolů, peptidů, atd.), které v původní vzorku částečně inhibovaly mannázovou aktivitu.

Tabulka 7: Výsledná celulózová aktivita - původní supernatant, permeát, retentát

vzorek	celulózy a [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1}$]	mannázy A/t
původní supernatant	0,3052	0,0307
retentát	0,8999	0,1712
permeát	0,0	0,0009

5.4.2. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE – SDS)

5.4.2.1. První elektroforéza

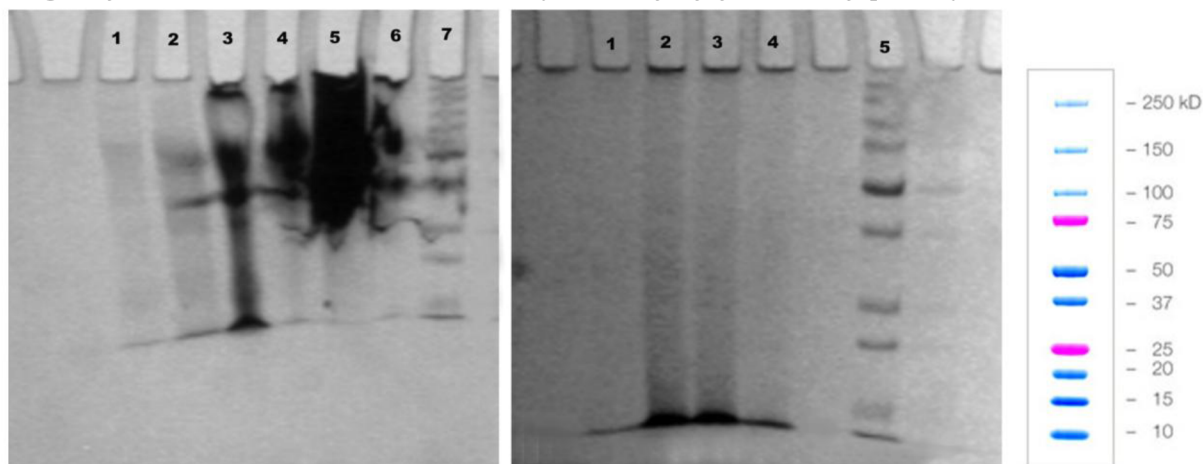
Závěrečným cílem práce bylo stanovit distribuci molekulární hmotnosti extracelulárních enzymů námi testované plísně a to pomocí metody PAGE-SDS. Zároveň byly proměřeny molekulové hmotnosti komerčních enzymatických preparátů používaných při hydrolýze komplexních lignocelulózových materiálů.

Jako standard byla použita proteinová směs *Bio-Rad Dual color standard*.

Na první gel byly nanášeny vzorky komerčních enzymatických preparátů, jejichž vzorky byly připraveny rozpuštěním 100 mg (případně 100 μl) daného enzymu v 1 ml redestilované vody.

Na druhý gel byly nanášeny vzorky supernatantů izolované plísně: původní roztok, retentát a permeát, které byly získány předešlou ultrafiltrací.

Na gel byl standard nanášen v množství 6 μl , vzorky byly nanášeny po 15 μl .



Obrázek 21: PAGE-SDS elektroforéza (1): vlevo obrázek gelu s enzymovými preparáty, uprostřed gel se vzorky supernatantů izolované plísně; napravo obrázek standardu *Bio-Rad Dual color standard* [50]

Tabulka 8: Nanášení vzorků - gel č. 1

číslo jamky	vzorek – komerční enzymatické preparáty	velikosti bendů [kDa]
1	<i>Hemicellulase from Aspergillus niger</i>	75
2	<i>Albumin, bovine</i>	75; 50
3	<i>Cellulase from Trichoderma reesei</i>	-
4	<i>Cellulase Ozonuka PS (Trichoderma viridie)</i>	-
5	<i>Cellulase from Aspergillus niger</i>	-
6	<i>Pectinase from Aspergillus niger</i>	75; 50
7	<i>Bio-Rad Dual color standard</i>	-

Tabulka 9: Nanášení vzorků - gel č. 2

číslo jamky	vzorek – supernatanty izolované plísně	velikosti bendů [kDa]
1	permeát	-
2	retentát (8krát koncentrovanější)	-
3	retentát (4krát koncentrovanější)	-
4	původní supernatant	-
5	<i>Bio-Rad Dual color standard</i>	-

U komerčních enzymů je možné vidět separátní zóny příslušející jednotlivým enzymům, případně v některých případech je v jednotlivých bězcích možné vidět i více zón, což naznačuje ne příliš dokonalou purifikaci těchto komerčních enzymatických preparátů. Vzorek 5 byl bohužel příliš koncentrovaný a v gelu pak vznikla skvrna, která znemožnila odečíst molekulovou hmotnost. U vzorků extracelulárních enzymů plísně bohužel nebylo i přes použití ultrafiltrace dosaženo dostatečné koncentrace proteinů, takže v jednotlivých bězcích nejsou vidět zóny odpovídající jednotlivým enzymům.

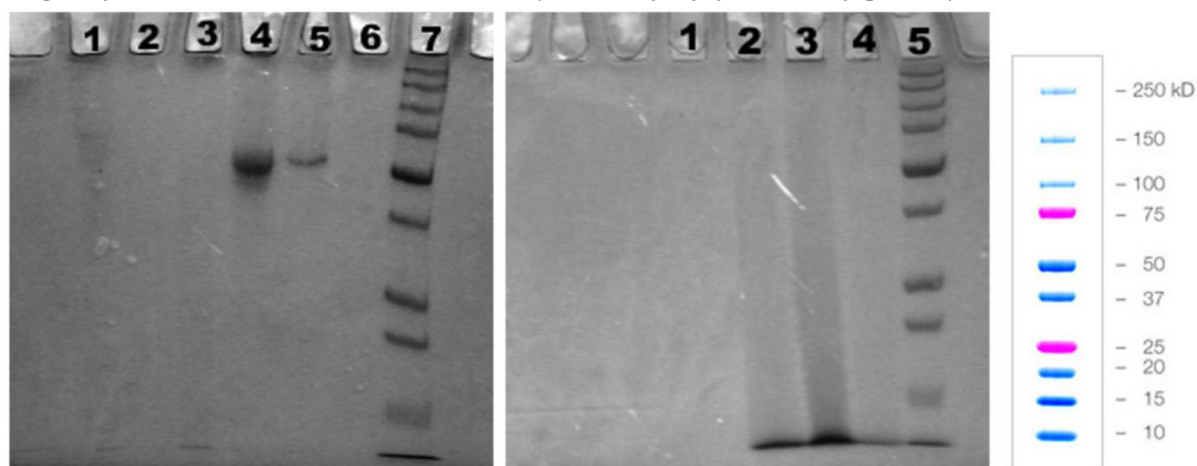
5.4.2.2. Druhá elektroforéza

Elektroforéza byla ještě jednou provedena se stejnými vzorky, ale ty byly připraveny jinak koncentrované, aby došlo k přehlednějšímu rozdělení proteinů dle jejich molekulové hmotnosti. Stejně jako v předešlé elektroforéze, byla elektroforéza provedena ve 12 % polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS. Standardem využitým v této metodě byla proteinová směs *Bio-Rad Dual color standard*.

Na první gel byly nanášeny vzorky komerčních enzymatických preparátů. Vzorek *Albumin, bovine* byl připraven rozpuštěním 30 mg v 1 ml redestilované vody. Ostatní vzorky enzymů byly připraveny rozpuštěním 50 mg enzymu v 1ml redestilované vody.

Na druhý gel byly nanášeny vzorky supernatantů izolované plísně: původní roztok, retentát a permeát, které byly získány předešlou ultrafiltrací.

Na gel byl standard nanášen v množství 6 μ l, vzorky byly nanášeny po 15 μ l.



Obrázek 22: PAGE-SDS elektroforéza(2): vlevo obrázek gelu s enzymovými preparáty, uprostřed gel se vzorky supernatantů plísně Isolát, napravo obrázek standardu *Bio-Rad Dual color standard* [50]

Tabulka 10: Nanášení vzorků - gel č. 1

číslo jamky	vzorek	velikosti bendů [kDa]
1	<i>Hemicellulase from Aspergillus niger</i>	100
2	<i>Albumin, bovine</i>	-
3	<i>Cellulase from Trichoderma reesei</i>	-
4	<i>Cellulase Ozonuka PS (Trichoderma viridie)</i>	75
5	<i>Cellulase from Aspergillus niger</i>	75
6	<i>Pectinase from Aspergillus niger</i>	-
7	<i>Bio-Rad Dual color standard</i>	-

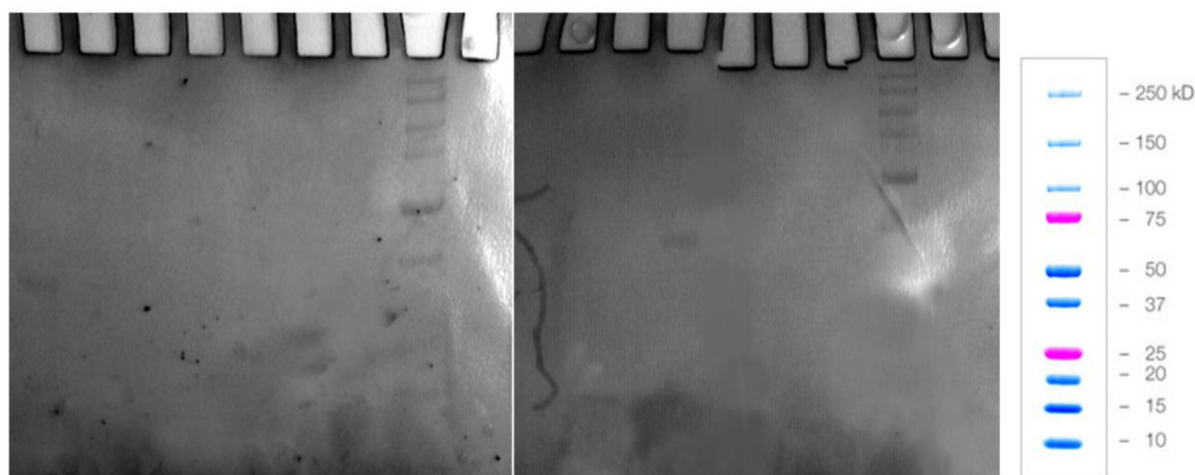
Tabulka 11: Nanášení vzorků - gel č. 2

číslo jamky	vzorek	velikosti bendů [kDa]
1	permeát	-
2	retentát (8krát koncentrovanější)	-
3	retentát (4krát koncentrovanější)	-
4	původní supernatant	-
5	<i>Bio-Rad Dual color standard</i>	-

Při použití nižších koncentrací komerčních enzymů bylo možné vidět separátní zóny příslušející jednotlivým enzymům jen v případě vzorku 1, 4 a 5. U ostatních vzorků není vidět jednotlivé zóny v bězcích, jelikož jejich koncentrace byla příliš nízká, což znamená, že u nich nelze odečíst molekulovou hmotnost.

Elektroforéza vzorků extracelulárních enzymů byla stejná jako v předešlém případě. I přes použití ultrafiltrace nebylo dosaženo dostatečné koncentrace proteinů. Nejsou tedy vidět zóny odpovídající jednotlivým enzymům.

5.4.3. Zymografie



Obrázek 23: Zymogram - vlevo obrázek gelu s enzymovými preparáty, uprostřed gel se vzorky supernatantů plísně Isolat, vpravo obrázek standardu Bio-Rad Dual color standard

Na gel byly vzorky nanášeny stejně jako v předešlých elektroforézách. U žádného vzorku, a to u komerčně dostupných enzymů ani u vzorků extracelulárních enzymů plísně, nelze vidět jednotlivé zóny v bězcích. Je možné, že i přes použité ultrafiltrace byla koncentrace proteinů

ve vzorcích nízká, nebo nebyla elektroforéza provedena správně, a tak nebyl získán zymogram, ze kterého by bylo možno rozeznat jednotlivé zóny.

5.5. Příprava enzymu

Posledním úkolem bylo v této práci zjištění enzymových aktivit v minerálním médiu izolované plísně. To bylo připraveno stejně jako v kapitole 4.3.2. Následně u něj byla provedena ultrafiltrace, aby byl vzorek zkoncentrován. Nakonec byly proměřeny enzymové aktivity supernatantu i retentátu.

Vzorek, který byl získán ultrafiltrací, následně použila Monika Vašíčková pro analýzy ve své experimentální části práce, jež má název *Biotechnologická produkce polyhydroxyalkanoátů s využitím odpadů kávového průmyslu*.

5.5.1. Ultrafiltrace

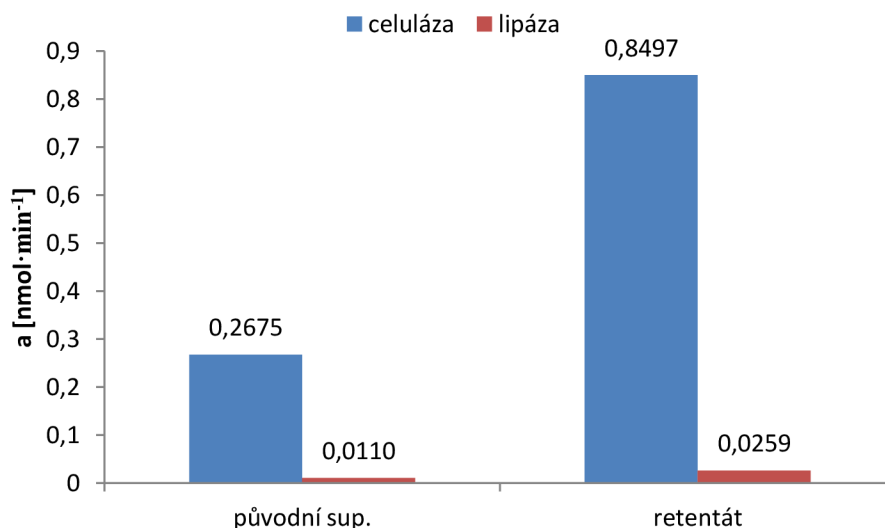
Tato metoda byla použita pro purifikaci roztoku, a to pomocí ultrafiltračního zařízení KrosFlo. Ke zkoncentrování vzorků byla použita ultrafiltrační kolona na bázi technologie hollow-fibre o hodnotě cut-off 30 kDa.

Ke zkoncentrování bylo použito 200 ml původního supernatantu. Tento vzorek byl zkoncentrován na 30 ml, což znamená, že retentát byl přibližně 6,5x koncentrovanější než původní roztok.

5.5.2. Stanovení enzymových aktivit

5.5.2.1. Celulázová a lipázová aktivita

V grafu č. 15 jsou uvedeny aktivity celulázy a lipázy, a to pro roztok původního supernatantu a retentátu, který byl získán ultrafiltrací.

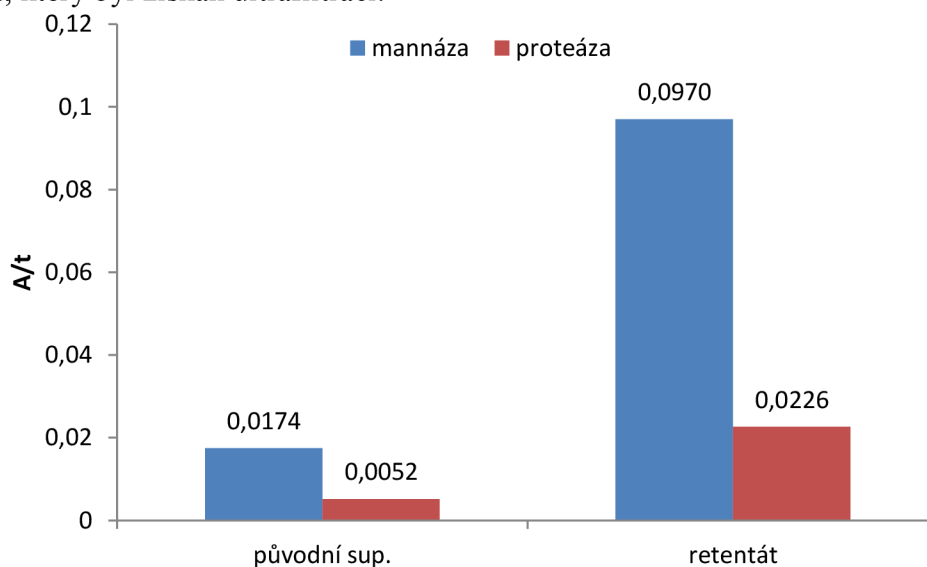


Graf 15: Příprava enzymu - celulázová a lipázová aktivita

Z grafu lze pozorovat, že aktivita celulázy v retentátu byla mnohem vyšší než aktivita lipázy. Nárůst aktivity enzymů v retentátu dosáhl u celulázy 3 násobku a u lipázy pak 2 násobku původní hodnoty. V průběhu ultrafiltrace tedy došlo k odstranění látek, které v původní vzorku částečně inhibovaly celulázovou a lipázovou aktivitu.

5.5.2.2. Mannázová a proteázová aktivita

V grafu č. 16 jsou uvedeny aktivity mannáz a proteáz, a to pro roztok původního supernatantu a retentátu, který byl získán ultrafiltrací.



Graf 16: Příprava enzymu - mannázová a proteázová aktivita

V grafu lze pozorovat, že u mannáz došlo díky ultrafiltraci k navýšení aktivity, a to přibližně 6 násobně oproti původnímu roztoku. U proteáz pak došlo k 4 násobnému navýšení aktivity. Lze tedy konstatovat, že pomocí ultrafiltrace byly odstraněny látky, které v původním vzorku aktivity těchto enzymů inhibovaly.

Tabulka 12: Příprava enzymu - výsledné enzymové aktivity

vzorek	proteáza A/t	celuláza a [nmol·min ⁻¹]	lipáza a [nmol·min ⁻¹]	mannáza A/t
původní sup.	0,0052	0,2675	0,0110	0,0174
retentát	0,0226	0,8497	0,0259	0,0970

6. ZÁVĚR

- V teoretické části této práce byla vypracována rešerše, který se zabývá kávou, vedlejšími produkty při její výrobě, extracelulárními hydrolytickými enzymy a vybranými druhy mikroorganismů.
- Nejdříve byl sledován růst vybraných mikroorganismů na pevném minerálním médiu, které obsahovalo kávovou sedlinu jako jediný substrát. Kultivace probíhala při 30 °C v termostatu. Mikroorganismy *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, izolovaná plíseň a bakterie *Burkholderia cepacia* byly vybrány pro další měření, protože se na rozdíl od plísně *Aureobasidium pulluans* na tomto médiu rozrostly.
- U kmenů, které byly vybrány, byly stanoveny enzymové aktivity – proteázová, celulázová, manázová a lipolytická aktivity. Ze získaných dat byla pro další měření vybrána izolovaná plíseň, jejíž aktivity byly: proteolytická $a = 0,000117$; celulázová $a = 0,2627 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$; manázová $a = 0,090455$; lipolytická $a = 0,00012 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$.
- Pro izolovanou plíseň byly optimalizovány podmínky její kultivace, a to zda probíhala kultivace staticky nebo na třepačce a také obsah vody v kultivačním médiu. Obecně lze říci, že enzymatická aktivita všech sledovaných enzymů rostla s rostoucím obsahem vody v kultivačním médiu. Dále platí, že statická kultivace podporuje spíše produkci extracelulárních enzymů hydrolyzujících substráty na bázi sacharidů, třepání pak navýší výtěžek lipáz a proteáz. Další optimalizovanou podmínkou byla doba, po kterou tato kultivace probíhala.
- Jako poslední bylo stanoveno pH optimum enzymové, a to celulázové reakce této plísně.
- Při stanovení optimální doby kultivace byla použita statická kultivace, a tak bylo zjištěno, že nejvyšší enzymové aktivity má tato plíseň při kultivaci, která trvala 7 dní.
- Nakonec byla provedena purifikace enzymů pomocí ultrafiltrace a elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Díky ultrafiltraci byl získán vzorek supernatantu izolované plísně, který byl výrazně koncentrovanější. Při následné elektroforéze PAGE-SDS byly separovány vzorky supernatantů plísně, které byly kultivovány na kávové sedlině a vzorky komerčně dostupných enzymů. U komerčních enzymů bylo možno rozeznat jednotlivé separované zóny, které přísluší jednotlivým enzymům. Naopak u vzorků extracelulárních enzymů plísně bylo zjištěno, že i přes použití ultrafiltrace nebyla koncentrace proteinů ve vzorku dostatečně vysoká, a tak nebylo možné rozeznat jednotlivé zóny, které přísluší enzymům.
- Také byla provedena zymografie. U té ale nedošlo k rozlišení jednotlivých extracelulárních enzymů.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. MURTHY, Pushpa S. a M. Madhava NAIDU. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*. 2012, vol. 66, s. 45-58. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>.
2. *Technologie zpracování kávy. Kávovník [online]*. [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: <http://www.kavovnik.cz/clanky/technologie-zpracovani-kavy/>
3. CHANAKYA, H.N., A.A.P. De ALWIS, W. PELUPESSY, W. PELUPESSY, F. DESCROIX, J. SNOECK, David ELKIN, Chris STEVENS a Reinhold G. MUSCHLER. *Environmental Issues and Management in Primary Coffee Processing: the global coffee chain. Process Safety and Environmental Protection*. 2004, vol. 82, issue 4, s. 291-300.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1205/095758204323162319>
4. NARITA, Yusaku a Kuniyo INOUE. Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Research International*. 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.023>.
5. ESQUIVEL, Patricia, Victor M. JIMÉNEZ, M. N. CLIFFORD a L.C. TRUGO. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*. 2012, vol. 46, issue 2, 488–495. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>.
6. ZUORRO, Antonio a Roberto LAVECCHIA. Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*. 2012, vol. 34, s. 49-56.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.12.003>.
7. Murthy PS, Madhava Naidu M. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation utilizing coffee by-products. *World Applied Science Journal* 2010;8(2):199–205.
8. Sathyanarayana A, Khan AB. An eco-biological approach for resource recycling and pathogen (*Rhizoctoniae Solani* Kuhn.) suppression. *Journal of Environmental Protection Science* 2008;2:36–9.
9. Nigam Singh P, Pandey A. *Biotechnology for agro-industrial residues utilization, vol. XVIII; 2009, 470 p. 9 illus. in color, Hardcover ISBN: 978-1-4020-9941*
10. Machado EMS, Rosa M, Rodriguez-Jasso, José A, Teixeira, Solange I, Mussatto. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. *Biochemical Engineering Journal* 2012;60:87–90.
11. Saha BC, Cotta MA. Fuel ethanol production from agricultural residues: current status and future prospects. *Journal of Biotechnology* 2008;136:285–6.
12. Rathanivelu R, Graziosi G. Potential alternative use of coffee waste and by-products. In: *ICO, proceedings, ED 1967/05; 2005*.
13. AL-HAMAMRE, Zayed, Sascha FOERSTER, Franziska HARTMANN, Michael KRÖGER a Martin KALTSCHMITT. Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*. 2012, vol. 96, s. 70-76.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2012.01.023>.

14. Nogueira WA, Nogueira FN, Devens DC. *Temperature and pH control in composting of coffee and agricultural wastes. Water Science and Technology* 1999;40(1):113–9.
15. Nakamura T, Hirata M, Kawasaki N, Tanada S, Tamuro T, Nakahori Y. *Decolorization of indigo carmine by charcoal from extracted residue of coffee beans. Journal of Environmental Science and Health Part A* 2009;3:555–62.
16. Fki I, Allouche Nandsayadi S. *The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill waste water for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. Food Chemistry* 2005;93:197–204.
17. Murthy PS, Naidu MM. *Production and application of xylanase from Penicillium sp. utilizing coffee by-products. Food and Bioprocess Technology* 2010a;5(2):657–64.
18. Stintzing FC, Carle R. *Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. Trends in Food Science & Technology* 2004;15(1):19–38.
19. Madahava Naidu M, Vijayanada P, Usha Devi A, Vijayalakshmi MR, Ramalakshmi K. *Utilization of coffee by-products in food industry, preparation of jam using coffee pulp as raw material, Placrosym XIV, Plantation crops research and development in the new millennium; 2004. p. 201–203.*
20. Mazzafera P. *Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated husk and pulp in animal feeding. Sceintia Agricola* 2002;59(4): 821–51.
21. PUJOL, D., C. LIU, J. GOMINHO, M.À. OLIVELLA, N. FIOL, I. VILLAESCUSA a H. PEREIRA. *The chemical composition of exhausted coffee waste. Industrial Crops and Products.* 2013, vol. 50, s. 423-429. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.07.056.
22. JOOSTE, T., M. P. GARCÍA-APARICIO, M. BRIENZO, W. H. ZYL a J. F. GÖRGENS. *Enzymatic Hydrolysis of Spent Coffee Ground. Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2013, vol. 169, issue 8, s. 2248-2262. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-013-0134-1>.
23. CHIYANZY, Idan, Michel BRIENZO, Maria GARCÍA-APARICIO, Roberto AGUDELO a Johann GÖRGENS. *Spent coffee ground mass solubilisation by steam explosion and enzymatic hydrolysis. Journal of Chemical Technology.* 2014, n/a-n/a. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.4313>.
24. MUSSATTO, Solange I., Livia M. CARNEIRO, João P.A. SILVA, Inês C. ROBERTO a José A. TEIXEIRA. *A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. Carbohydrate Polymers.* 2011, vol. 83, issue 2, s. 368-374. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.063>.
25. VODRÁŽKA, Zdeněk, Jan KÁŠ a Pavel RAUCH. *Enzymologie. 3. přepřac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 171 s. ISBN 80-708-0330-4.*
26. HAKI, G. *Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource Technology.* 2003, vol. 89, issue 1, s. 17-34. DOI: 10.1016/S0960-8524(03)00033-6.

27. MALGAS, Samkelo, Susan J. VAN DYK a Brett I. PLETSCHKE. *B-Mannanase (Man26A) and α -galactosidase (Aga27A) synergism – A key factor for the hydrolysis of galactomannan substrates*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2015, vol. 70. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2014.12.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022914002178>
28. *Detection of Galactomannan in Serum by Platelia™ Aspergillus Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. BALA, Shukal. BIORAD. U.S. Food and Drug Administration [online]. 2011 [cit. 2015-03-31]. Dostupné z: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM420236.pdf>
29. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
30. LUGINBUHL, Sarah. NC STATE UNIVERSITY. 2010 [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium_solani.htm
31. *Doctor Fungus*. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.doctorfungus.org/thefungi/Fusarium_solani.php
32. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTt3DvlSs2tgmYPpnW_MxtRQ3h3KULi0YffCCXPIXAZTODWIWUA
33. [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/img/fungi/f/Fusarium_solani_colony.jpg
34. AUREOBASIDIUM PULULANS *Viala et Boyer. VŠCHT: Miniatlas mikroorganismů* [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/aureob.htm>
35. *Aureobasidium pullulans*. THE UNIVERSITY OF ADELAIDE. *Mycology online* [online]. [cit. 2015-04-10]. Dostupné z: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_%28dematiaceous%29/Aureobasidium/
36. [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/aureo2.jpg>
37. [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.moldlibrary.ca/wp-content/uploads/2013/08/aureobasidium-pullulans.jpg>
38. *Plant teaching collection: Tom Volk's Fungus of the Month for May 1997. The Virtual Foliage*[online]. 2004 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/may97.html
39. *Phanerochaete chrysosporium*. JOINT GENOME INSTITUTE: UNITED STATES DEPARTMENT OF ENERGY [online]. 2015 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://genome.jgi-psf.org/Phchr1/Phchr1.home.html>
40. [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://genome.jgi-psf.org/Phchr1/whiterot.gif>
41. [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.corpuscoli.com/wp-content/uploads/2013/11/officina-corpuscoli-the-ephemeral-icon-phanerochaete-chrysosporium-plastic-plate2.jpg>

42. BURKHOLDERIA CEPACIA. CEPACIA WEB [online]. 2004 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://cepacia.wz.cz/burkholderia.html>
43. [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://genome.jgi-psf.org/burgr/burgr.jpg>
44. Amersham Pharmacia Biotech: Protein Purification. Handbook, 1999, 18-1132-29
45. Klouda, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
46. Kaš, J.; Kodiček, M.; Valentová, O.: Laboratorní techniky biochemie. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006. ISBN 80-7080-586-2.
47. Mini-PROTEAN® 3 Cell: Instruction Manual. BIO-RAD. Ergonomics: University of California[online]. [cit. 2015-04-13]. Dostupné z: <http://ergo.berkeley.edu/be115/protean3.pdf>
48. Márová I., Vránová D. : Praktikum z biochemie – pracovní sešit. FCH VUT v Brně, Brno 200
49. SDS-PAGE. Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine. Springer Berlin Heidelberg, 2006, s. 1728. DOI: 10.1007/3-540-29623-9_8639. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/3-540-29623-9_8639
50. Precision Plus Protein™ Dual Color Standards #161-0374. Bio-Rad [online]. [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/products/electrophoresis/sku_view/global/161-0374_view.jpg

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

a	aktivita
AA	akrylamid
APS	persíran amonný
BIS	N,N'-methylenbisakrylamid
c	koncentrace
CMC	karboxymetylcelulosa
MO	mikroorganismus
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
SDS	dodecylsírán sodný
SSF	solid state fermentacion
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

9. PŘÍLOHY

Příloha 1



Obrázek 24: Kultivace na tekutém médiu - vlevo plíseň *Fusarium solani*, vpravo plíseň *Phanerochaete chrysosporium*



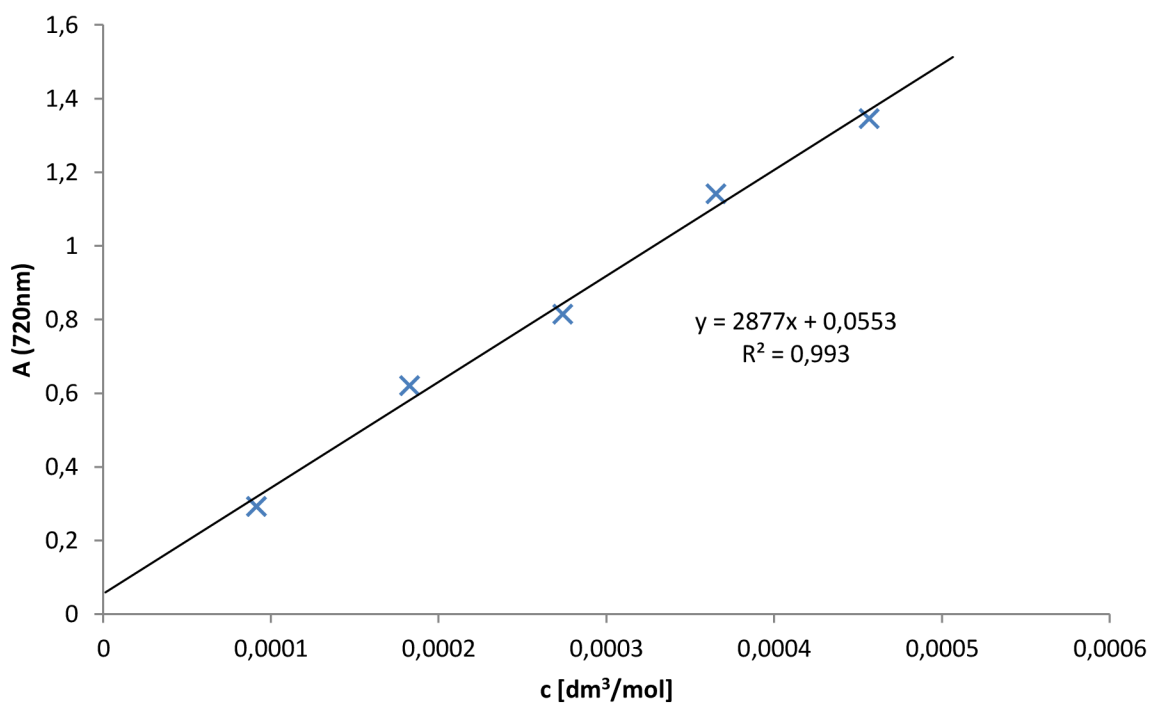
Obrázek 25: Kultivace na tekutém médiu - vlevo bakterie *Burkholderia cepacia*, vpravo izolovaná plíseň

Příloha 2

Celulázová aktivita – kalibrační křivka

Tabulka 13: Data pro sestavení kalibrační křivky

c [mol/dm ³]	absorbance (720nm)
$9,13104 \cdot 10^{-5}$	0,293
$1,82621 \cdot 10^{-4}$	0,621
$2,73931 \cdot 10^{-4}$	0,815
$3,65242 \cdot 10^{-4}$	1,142
$4,56552 \cdot 10^{-4}$	1,346



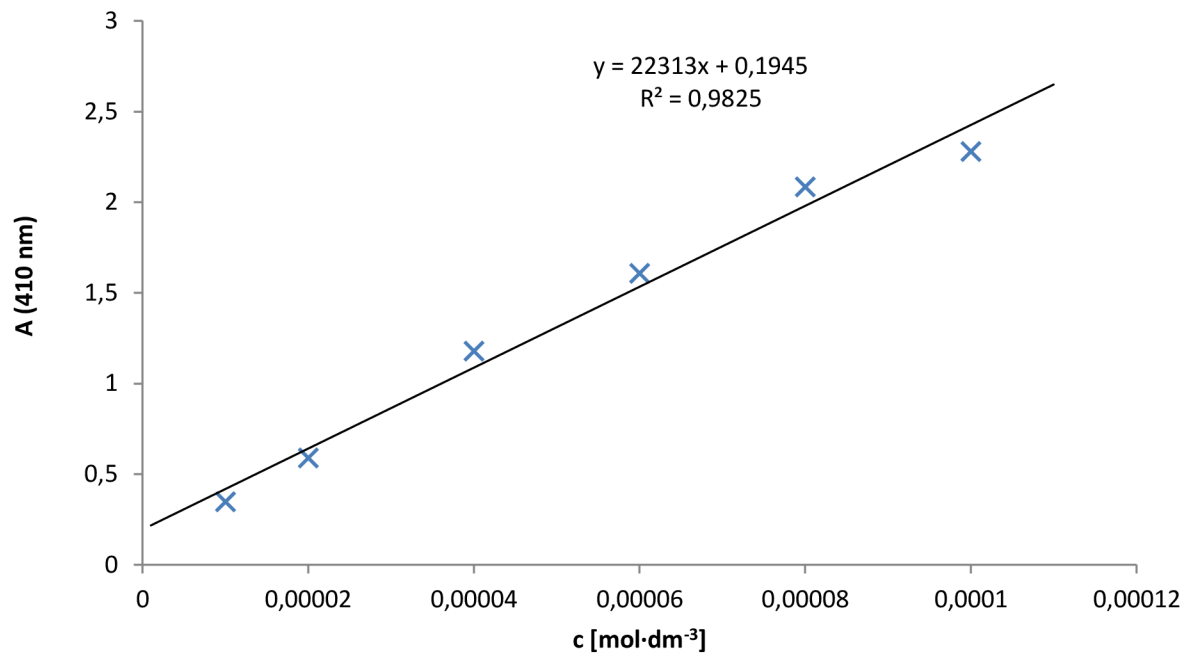
Graf 17: Kalibrační křivka celulózy

Příloha 3

Lipolitycká aktivita – kalibrační křivka

Tabulka 14: Data pro sestavení kalibrační křivky

c [mol/dm ³]	absorbance (410 nm)
$1 \cdot 10^{-5}$	0,347
$2 \cdot 10^{-5}$	0,589
$4 \cdot 10^{-5}$	1,178
$6 \cdot 10^{-5}$	1,607
$8 \cdot 10^{-5}$	2,084
$1 \cdot 10^{-4}$	2,279



Graf 18: Kalibrační křivka lipázy